

## Larva Ikan Zebra (*Danio rerio*) Sebagai Model Hewan untuk Uji Toksisitas

Susana E. Sudradjat

Departemen Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan  
Universitas Kristen Krida Wacana  
Alamat Korespondensi : susana.sudrajat@ukrida.ac.id

### 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 kardiotosik, neurotoksik dan hepatotoksik dapat dilakukan pada hewan yang sama dengan ketepatan dan ketelitian yang tinggi.

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

### *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 optimasi 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 sudah diketahui dengan pendekatan *invitro*.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup> Menurut regulasi etik internasional, larva ikan zebra yang berumur sampai lima hari sesudah fertilisasi (*five days post-fertilization/5 dpf*) disamakan dengan uji *in vivo* dan diterima sebagai alternatif hewan coba.<sup>2</sup>

Ikan zebra telah menjadi model hewan vertebrata untuk berbagai penyakit dan telah berkontribusi pada penemuan obat berbasis fenotip.<sup>3</sup> 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 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.<sup>3</sup> Ikan dan larva ikan zebra telah digunakan untuk penelitian diabetes dan komplikasinya.<sup>4</sup> Pada tahun 2000, telah ditemukan obat baru pertama yang menggunakan ikan zebra hidup dalam *multiwell plate*.<sup>4</sup> 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.<sup>4</sup> Secara filogenetik hubungan manusia dengan hewan pengerat lebih dekat daripada dengan ikan zebra, tetapi ikan zebra memiliki 70% gen yang berhubungan dengan penyakit manusia.<sup>5</sup>

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.<sup>6</sup> Karakteristik fisik dan fisiologis ikan zebra yang unik menjadikan alat yang penting untuk penemuan obat dan uji toksisitas.<sup>6</sup> Sekarang ini analisa toksisitas larva ikan zebra telah digunakan sebagai metode alternatif hewan dalam penilaian bahaya/risiko dan penelitian ilmiah.<sup>7</sup>

### 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. Toksisitas organ yang diinduksi obat dapat dideteksi dalam tahap larva sehingga memungkinkan prediksi yang kuat seperti pada manusia.<sup>8</sup> 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.<sup>8</sup>

Senyawa yang dapat menyebabkan toksisitas antara lain senyawa-senyawa kardiotoxik, neurotoksik dan hepatotoksik. Sebelum dilakukan uji kardiotoxik, hepatotoksik dan neurotoksik, terlebih dahulu dilakukan uji 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%).<sup>9</sup>

*No Observed Effect Concentration* (NOEC) dapat memengaruhi fisiologis organ ketika terjadi efek samping. Untuk menganalisa perkembangan organ dapat digunakan larva ikan zebra berumur 96 *hours post fertilization* (hpf) atau 96 jam setelah fertilisasi.<sup>10</sup> Tujuan utamanya adalah mengetahui pengaruh obat terhadap fisiologis dan fungsi organ. Kardiotoxik diamati pada 100 hari setelah fertilisasi (100 hpf), neurotoksik 120 hpf dan hepatotoksik 132 hpf.<sup>11</sup>

Dietilaminobenzaldehid (DEAB) merupakan penghambat asam retinoat yang meningkatkan mortalitas dan teratogenik (NOEC) seperti terlihat pada Tabel 1.<sup>11</sup> DEAB

digunakan sebagai kontrol positif. LOEC merupakan konsentrasi terendah dimana efek obat dapat diamati, sedangkan LC<sub>50</sub> adalah

konsentrasi yang menyebabkan 50% larva ikan zebra mati.<sup>11</sup>

**Tabel 1. NOEC, LOEC dan LC<sub>50</sub> Senyawa pada Larva Ikan Zebra 96 hpf**  
(Diadaptasi dari Cornet *et al.* 2017)

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

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

**Tabel 2. Contoh Senyawa yang Menyebabkan Toksisitas pada Manusia dan Larva Ikan Zebra<sup>11</sup>**

Obat	Kardiotoksisitas	Neurotoksisitas	Hepatotoksisitas
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*.<sup>9</sup> MPTP digunakan sebagai kontrol positif obat neurotoksik.<sup>11</sup> Etanol dan asetaminofen digunakan sebagai obat kontrol positif hepatotoksik.<sup>11</sup> 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.<sup>12</sup>

### Analisis Kardiotoksisitas

Dalam dekade terakhir, ikan zebra telah menjadi model organisme utama untuk studi perkembangan dan organogenesis.<sup>12</sup> Aritmia jantung menjadi tantangan utama bagi penemuan obat modern. Ikan zebra dapat digunakan sebagai model, khususnya untuk biologi kardiovaskular.<sup>13</sup> Embrio ikan zebra dapat digunakan untuk penelitian kardiotoksisitas yang diinduksi obat.<sup>5</sup> Obat-obatan seperti *astemizole*, haloperidol, *pimozide*, dan terfenadin yang menyebabkan perpanjangan QT pada manusia juga memberikan hasil yang serupa pada ikan zebra.<sup>14</sup>

Sebagai kontrol positif digunakan haloperidol dan uji kardiotoksisitas dilakukan pada larva ikan zebra berumur 96 hpf ketika detak jantung ikan zebra sudah stabil.<sup>11</sup> Obat diinkubasi selama empat jam dan setelah itu dianalisa dengan perangkat lunak ZeCardio®.<sup>11</sup> Haloperidol, *cisapride*, *docetaxel*, *dofetilide*, *pindolol*, *riluzole*, *trifluoperazine HCL*, dan *vincristine* dapat mengurangi detak jantung permenit (BPM) dibandingkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif.<sup>11</sup>

### Analisis Hepatotoksisitas

Ikan zebra merupakan perantara antara evaluasi berbasis sel dengan pengujian hepatotoksisitas pada hewan konvensional.<sup>15</sup> Semua obat yang diuji hepatotoksik pada mamalia memberikan hasil yang sama pada larva ikan zebra, seperti degenerasi hati dan pengurangan ukuran hati.<sup>14</sup> 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.<sup>15</sup>

Perkembangan hati ikan zebra dapat dibagi dalam tiga tahap yaitu: spesifikasi, diferensiasi, dan perkembangan.<sup>16</sup> Larva ikan zebra yang berumur 5 dpf mempunyai hati berbentuk lonjong yang berfungsi penuh dan terdiri dari tiga lobus.<sup>17</sup> 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.<sup>18</sup>

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

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

Model penyakit hati karena alkohol (*ALD/Alcoholic Liver Disease*) yang terjadi pada larva ikan zebra dapat mengidentifikasi gen dan jalur yang berkontribusi terhadap steatosis.<sup>21</sup> 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.<sup>21</sup> Penambahan etanol 2% selama 32 jam pada medium larva ikan zebra menyebabkan kadar etanol 80 mM intraseluler dan regulasi hepatik menunjukkan bahwa etanol dimetabolisme serta menyebabkan stres oksidatif.<sup>21</sup>

### Analisis Neurotoksisitas

Sudah banyak penelitian mengenai pemeriksaan toksisitas pada larva ikan zebra berbasis organ dan perilaku.<sup>22</sup> Analisa neurotoksisitas dilakukan pada tahap perkembangan karena sistem sarafnya lebih rentan terhadap dampak bahan kimia daripada sistem saraf ikan zebra dewasa. Larva ikan zebra memperlihatkan banyak pola perilaku yang sangat mirip dengan tikus dan manusia.<sup>22</sup> Dari tahun 1995 hingga 2014 banyak dilakukan pengujian dengan larva ikan zebra yang berumur kurang dari tujuh hari setelah fertilisasi (dpf).<sup>22</sup> Etanol, valproat dan pentilenetetrazol digunakan sebagai bahan model.<sup>22</sup> Ternyata larva ikan zebra dapat membantu meningkatkan studi perilaku di masa depan.<sup>22</sup>

Salah satu penyakit yang diuji dengan ikan zebra adalah Penyakit Parkinson (PD).<sup>23</sup> Fenotip, peran berbagai gen dan protein untuk parkinsonisme diuji dan dievaluasi pada ikan zebra dengan menggunakan pendekatan perilaku, molekuler dan proteomik.<sup>23</sup> Bahan kimia haloperidol yang diberikan pada ikan zebra menunjukkan penurunan gerakan pola berenang dan peningkatan ketenangan.<sup>24</sup> Ikan zebra dapat digunakan sebagai sistem model potensial untuk menjaring calon molekul obat untuk PD.<sup>23</sup>

Larva ikan zebra peka terhadap obat neuroaktif dan respons lokomotifnya mirip dengan mamalia.<sup>25</sup> 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.<sup>25</sup> 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.<sup>26</sup> Hasil yang sama juga dihasilkan pada larva ikan zebra enam hari pasca fertilisasi (6 dpf).<sup>25</sup> 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.<sup>11</sup>

Larva ikan zebra yang berusia tujuh hari diinduksi aktifitas lokomotornya dengan pentilen tetrazol (PTZ) kemudian diberi obat antiepilepsi natrium valproate (VPA).<sup>27</sup> 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.<sup>27</sup> Obat antikonvulsan dapat diketahui dari penurunan aktifitas lokomotor larva ikan zebra yang diukur dengan alat Zebrabox.<sup>27</sup>

## Penutup

Larva ikan zebra merupakan model hewan yang ideal untuk uji senyawa kardiotoxik, 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, El Abdellaoui N, Van Pomeran M, Legler J. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014;22, 16277–89.
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.* 2010;33–79.
3. Gaikwad S, et al. Constructing the habituome for phenotype-driven zebrafish research. *Behav Brain Res.* 2012;236:110–7.
4. Calum AMR, Randal TP. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2015;14:721–31.
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. JörgensK, Hillebrands JL, Hammes HP, KrollJ. Zebrafish: A model for understanding diabetic complications. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes.* 2012;120(4):186–7.
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.
18. Howarth DL, Yin C, Yeh K, Sadler KC. 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. 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. Afrikanova T, et al. Validation of the zebrafish pentylene tetrazol seizure model: Locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One*. 2013;8(1):1–9.
26. Maximino C, et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behav Brain Res*. 2010;214(2):157–71.
27. Liu C, Zhou J. Validation of the zebrafish pentylene tetrazol seizure model: Behaviour assay for assessing anti-epileptic drug efficacy. *Biochem Anal Biochem*. 2016;5(2).