



# Ikan Zebra (*Danio rerio*) sebagai Binatang Model pada Penelitian Biomedis dan Cara Pemeliharaannya

Husnul Khotimah<sup>a</sup>, M. Muljohadi Ali<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

<sup>b</sup>Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jakarta, Indonesia

## Keywords

Zebrafish (*Danio rerio*), Animal model, Biomedical research

## Abstract

Biomedical research requires suitable model organisms to be able to understand the pathogenesis of disease at the cellular and molecular level and the suitability of systems for the development and testing of new therapies. The choice of model organisms for biomedical research depends very much on the research objectives. Basically, the selection of model organisms is based on several aspects, namely: biological, technical and historical aspects. The general criteria for selecting model organisms are: small size, fast reproduction time, low and easy maintenance, easy experimental techniques, complete basic information. The development of research using animal models further leads to the level of genetic functional conservation in the basic processes of cell biology between mammals and invertebrates such as fruit flies (*Drosophila melanogaster*) and nematode worms (*Caenorhabditis elegans*). However, there are significant limitations between mammals and invertebrates, among others due to differences in organ systems and their development, so now widely used zebra fish (*Danio rerio*) as model organisms that bridge between invertebrates and vertebrates. In addition to these reasons there are several other scientific reasons that make zebra fish a superior organism model for biomedical research, namely: having a high homology with humans (75%), transparent

embryos, high levels of fecundity, fast embryogenesis, relatively fast life span, procurement and maintenance is relatively inexpensive, complete basic information and genetic information (whole genome sequencing), has a cardiovascular system, nerves, immune system and digestive system similar to mammals, sensitive to environmental changes so that many bio-indicators are used for toxicity testing and testing and development drug.

© 2020 SMJ, Jakarta

## “Zebrafish (*Danio rerio*) as Animal Model for Biomedical Research and Its Rearing”

## Abstrak

Penelitian biomedis membutuhkan organisme model yang sesuai untuk dapat memahami patogenesis penyakit pada tingkat seluler dan molekuler serta kesesuaian sistem untuk pengembangan dan pengujian terapi baru. Pemilihan organisme model untuk penelitian biomedis sangat tergantung pada tujuan penelitian. Pada dasarnya pemilihan organisme model dilakukan atas dasar pertimbangan beberapa aspek yaitu : aspek biologis, teknis dan sejarah. Kriteria umum pemilihan organisme model adalah : berukuran kecil, waktu reproduksi yang cepat, pemeliharaannya murah dan mudah, kemudahan teknik percobaan, informasi dasar yang lengkap. Perkembangan penelitian menggunakan binatang model selanjutnya mengarah pada tingkat konservasi fungsional genetik pada proses dasar biologi sel antara mamalia dengan invertebrata seperti lalat buah (*Drosophila melanogaster*) dan cacing nematoda (*Caenorhabditis elegans*). Namun terdapat keterbatasan yang cukup signifikan antara mamalia dan invertebrata antara lain karena perbedaan sistem organ dan perkembangannya, maka saat ini banyak digunakan ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai organisme model yang menjembatani antara invertebrata dan vertebrata. Selain alasan tersebut terdapat beberapa alasan ilmiah lainnya yang menjadikan ikan zebra menjadi organism model unggulan untuk penelitian biomedis, yaitu : memiliki homologi yang tinggi dengan manusia (75%), embryo yang transparan, tingkat fekunditas yang tinggi, embryogenesis yang cepat, masa hidup relatif cepat, pengadaan dan pemeliharaan relatif murah, lengkapnya informasi dasar dan informasi genetik (whole genome sequencing), memiliki sistem kardiovaskuler, syaraf, sistem imun dan sistem pencernaan yang mirip dengan mamalia, sensitif terhadap perubahan lingkungan sehingga banyak digunakan bioindikator untuk uji toksisitas serta pengujian dan pengembangan obat.

## Kata Kunci:

Ikan zebra (*Danio rerio*), Organisme model, Penelitian biomedis

## Pendahuluan

Penelitian biomedis sangat membutuhkan binatang model yang sesuai untuk dapat memahami patogenesis penyakit pada tingkat seluler dan molekuler serta kesesuaian sistem untuk pengembangan dan pengujian terapi baru (Lieschke and Currie, 2007 ; Belyaeva, et al., 2009). Model mamalia seperti tikus merupakan model unggulan untuk penyakit-penyakit pada manusia, terutama karena homologinya yang kuat dengan manusia dan berbagai persamaan pada beberapa aspek mulai dari anatomi sampai biologi sel dan fisiologi. Faktor lain yang perlu dipertimbangkan adalah kedekatan evolusi dan persamaan anatomi pada animal disease model. Sebagai contoh, mamalia seperti tikus atau domba memiliki fisiologi dan ukuran organ yang hampir sama dengan manusia sehingga sangat menguntungkan untuk pengembangan intervensi pada terapi

terkait pembedahan (Lieschke and Currie, 2007).

Perkembangan penelitian menggunakan binatang model selanjutnya mengarah pada tingkat konservasi fungsional genetik pada proses dasar biologi sel antara mamalia dengan invertebrata seperti lalat buah (*Drosophila melanogaster*) dan cacing nematoda (*Caenorhabditis elegans*). Diyakini bahwa terjadinya suatu penyakit pada spesies yang berbeda merupakan akibat dari gangguan proses selular yang terkonservasi sehingga dapat digunakan sebagai model akurat pada tingkat genetik dan molekuler serta memungkinkan untuk dilakukan rekayasa genetika. Namun demikian, invertebrata memiliki keterbatasan pada struktur dan sistem organ sehingga umumnya menyebabkan perbedaan patologis suatu penyakit pada manusia (Lieschke and Currie, 2007).

Pemilihan organisme model untuk penelitian biomedis sangat tergantung pada tujuan penelitian. Prinsip dasar pemilihan organisme model adalah berdasarkan 3 pertimbangan dasar yaitu : (a) aspek biologis kesesuaian organisme model, (b) pertimbangan teknis yang meliputi biaya, peralatan dan luasan yang dibutuhkan, kemudahan penanganan dan pengembangbiakan, (c) pertimbangan sejarah, yaitu informasi dasar yang dibutuhkan tentang organisme model (Murphy, 2003). Pada umumnya dipilih organism model dengan kriteria : berukuran kecil, waktu reproduksi yang cepat, pemeliharaannya murah dan mudah, kemudahan teknik percobaan, informasi dasar yang lengkap. Namun demikian selalu ada keterbatasan atau kekurangan dari setiap jenis organism model.

Secara umum, berbagai binatang model memiliki kelebihan dan keterbatasan masing-masing. Keterbatasan tersebut antara lain : (1) Jamur (*Saccharomyces cereviceae*) : tidak memiliki jaringan yang jelas ; (2) Nematoda (*Caenorhabditis elegans*) : keterbatasan eksternal morfologi, kesamaan gen dengan manusia hanya 43%, analisa pola ekspresi gen belum lengkap, kesulitan manipulasi embryologis ; (3) lalat buah (*Drosophila melanogaster*) : kesulitan manipulasi embryologi, kesulitan pencarian target gen ; (4) Golongan Tikus : kesulitan transfer gen, kesulitan mempelajari fenotip mutan pada awal embryo karena diresorpsi oleh induk, kesulitan manipulasi embryo karena berada di dalam induknya, perkembangan dan siklus hidupnya relatif lama (bulan), tingginya biaya baik binatangnya sendiri maupun fasilitas ; (5) Monyet : kesulitan percobaan yang terkait kematian (keterbatasan jumlah), tidak ada referensi genetik, tingginya harga binatang dan fasilitas ; (6) Manusia : kesulitan pada eksperimen yang terkait kematian, tidak ada eksperimen yang langsung dilakukan pada manusia (Hsu, et al., 2007). Selain itu keterbatasan poin 4-6 adalah kendala terkait etika penelitian.

Ikan termasuk golongan teleost yang telah memiliki rangkaian tulang belakang (vertebrata). Ikan ini relatif mudah didapat dan cara perawatannya mudah dan murah (Raible and Granato, 2011). Pada artikel ini akan dibahas tentang penggunaan zebrafish sebagai hewan model dan cara pemeliharaannya.

Kingdom : *Animalia*  
 Phylum : *Chordata*  
 Class : *Actinopterygii*  
 Order : *Cypriniformes*  
 Family : *Cyprinidae*  
 Genus : *Danio*  
 Species : *D. rerio*



Gambar 1. Taksonomi dan Morfologi Ikan Zebra *Danio* (Detrich, et al., 2009).

### Karakteristik dan Sejarah Penggunaan Ikan Zebra (*Danio rerio*) sebagai Hewan Model Penelitian Biomedis

Ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan ikan air tawar asli India dan Asia Selatan termasuk Indonesia yang memiliki panjang tubuh hingga 4.5 cm dan bergaris horizontal putih perak dan biru pada badan dan siripnya (Gambar 2.1). Ikan termasuk golongan teleost yang telah memiliki rangkaian tulang belakang (vertebrata) (Raible and Granato, 2011).

Embrio ikan zebra berkembang relatif cepat. Fungsi kardiovaskuler dan sistem syaraf dapat diamati 3 hari setelah fertilisasi. Pada hari ke empat embrio telah menetas (Gambar 2.2) dan dapat berenang serta makan. Sel epithelial intestinal memproduksi berbagai enzim pencernaan, hepatosit memproduksi empedu, serta sel-sel pancreas memproduksi insulin dan karboksipertidase. Pengamatan mikroskopis masa perkembangan sangat memungkinkan karena embrio yang transparan. Embrio ikan zebra dengan cepat dapat menyerap senyawa dengan berat molekul rendah yang ada di dalam larutan sekitarnya melalui kulit sedangkan pada usia 7 hari pasca fertilisasi penyerapan terjadi melalui insang. Masa hidup ikan zebra berkisar antara 3-5 tahun (Langhenrich, 2003).

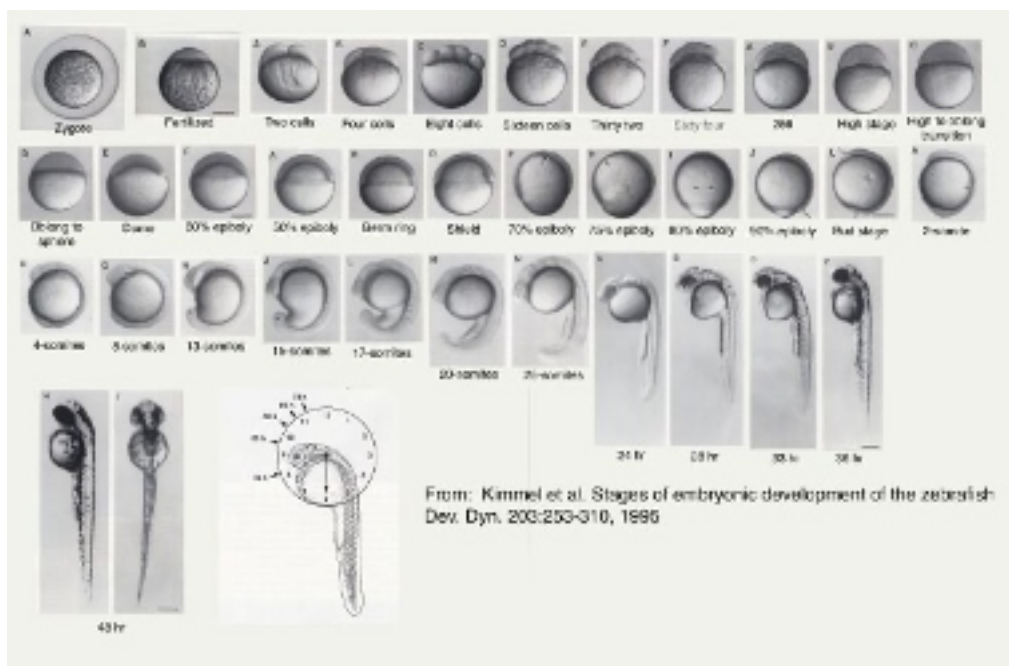
Tahun 1960-an George Stressinger dari Universitas Oregon memulai penelitian menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai binatang model dan mempublikasikan hasil penelitian tentang analisa perkembangan vertebrata melalui pendekatan genetis. Stressinger melihat keunggulan ikan zebra jika dibandingkan jenis binatang model lainnya yaitu : waktu generatif yang pendek (2-3 bulan), tingginya tingkat fekunditas (100-300 embrio per mating), reproduksi secara ovipar, embrio yang transparan sehingga memudahkan pengamatan sel dan organ saat embrio (Detrich, et al., 2009). Pada tahun 1974, Stressinger mengkaji organisasi dan perkembangan embriologi vertebrata melalui strain mutan khususnya tentang mekanisme pembentukan koneksi sinaps dan signal yang meregulasi axon spesifik menemukan target gen setelah sebelumnya mengeksplorasi produksi keturunan homozygote diploid dari maternal germline (gynogenesis) (Stressinger, et al., 1981).

Tahun 1990 diselenggarakan konferensi ikan zebra di Eugene, Oregon dan dari pemetaan gastrula diketahui bahwa organisasi pada perkembangan awal embrio ikan zebra serupa dengan mamalia lainnya. Pada tahun ini juga telah dilakukan transplantasi untuk menghasilkan embrio yang memiliki mosaik genetic untuk menguji otonomi fungsi gen. Pada tahun 1993 di Tübingen, Jerman dan Boston, Amerika Serikat

dilakukan pemindaian sistematis dalam skala besar pada embryonic-lethal mutation. Konferensi pertama tentang genetika dan perkembangan ikan zebra (Cold Spring Harbour Conference) yang dihadiri 350 peneliti ikan zebra yang dianggap sebagai binatang model ideal. Pada tahun ini juga pertama kali ditemukan mutasi genetik dengan fenotip ikan zebra tanpa ekor. Tahun 1996 telah dipublikasikan hasil pemindaian perkembangan embriologi ikan zebra dalam Development, volume 123. Pada pertengahan sampai akhir 1990-an dikembangkan kaitan antara pemetaan anatomi embrio dan sumber genomiknya, juga dimulai insersi mutagenesis skala besar. Akhir tahun 1990 sampai awal tahun 2000 dilakukan kloning pada berbagai mutasi dan beberapa gen yang berefek pada proses umum dikaitkan dengan jalur molekuler. Sehingga saat ini dapat ditemukan berbagai publikasi ilmiah dengan ikan zebra sebagai binatang model (Leischke and Currie, 2007).

### Berbagai model Penelitian Biomedis yang menggunakan Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Karakteristik yang menyebabkan ikan zebra populer sebagai binatang model adalah (1) ikan zebra memiliki larva yang transparan. Embrio yang transparan memungkinkan pengamatan seluruh sel, jaringan dan organ secara in vivo dan real-time sampai pada tahap perkembangan awal larva (Eisen, 1996 ; Fishman, 1999). (2) Embriogenesis yang cepat dan tingginya tingkat fekunditas menyebabkan jumlah embrio yang dihasilkan sangat besar. Dalam kondisi optimum ikan zebra betina dapat menghasilkan 300 telur per minggu sehingga sangat menguntungkan untuk kajian meiosis dan cloning. Di samping itu rendahnya biaya perawatan yang sangat signifikan jika dibandingkan perawatan binatang model mamalia (Hsu, et al., 2007). (3) Keseluruhan sekuensing genom ikan zebra telah selesai diidentifikasi pada akhir tahun 2010 (Zfin, 2011) sehingga kajian molekuler dan genetik sangat memungkinkan untuk kajian penentuan ekspresi gen, fungsi gen melalui pengembangan transgenik, antisense gene knockdown dan mutagenesis dalam skala besar (Driever, et al., 1996; Knapik et al., 1998). (4) Ikan zebra memiliki sistem kardiovaskuler, syaraf dan sistem pencernaan yang mirip dengan mamalia. Ikan zebra yang tergolong vertebrata ini memiliki berbagai macam organ dan tipe sel yang serupa dengan mamalia. Proses organogenesis terjadi relatif cepat yaitu organ-organ utama telah terbentuk setelah 5-6 hari pasca fertilisasi (dpf). (5) Tingkat konservasi



Gambar 2. Perkembangan Embrio Ikan Zebra (Kimmel, et al., 1995)

yang tinggi antara genom ikan zebra dengan manusia (persamaannya sekitar 75%) (Hsu, et al., 2007).

### a. Model Neurodegeneratif

Xi, et al., (2011) menggunakan ikan zebra untuk penelitian neurodegenerative seperti Parkinson, Huntington dan Alzheimer karena kedekatan homologi dan fungsi yang terkonservasi terkait etiologi penyakit neurodegenerative antara ikan zebra dan manusia. Dopaminergik neuron pada ikan zebra terdeteksi pada 18 jam setelah fertilisasi (hpf) dan sistem syaraf pusat (CNS) telah berkembang sempurna pada 72 hpf. Beberapa gen ortolog terkait Parkinson telah terdeteksi ada pada ikan zebra misalnya parkin, pink1, dj-1, and lrrk2 (Xi, et al., 2011). Gen parkin pada ikan zebra mengkode 458 asam amino sangat terkonservasi antara ikan zebra dan manusia dengan kesamaan fungsional domain mencapai 92% (Flin, et al., 2009).

Gen Huntingtin (HTT) yang mengkode asam amino glutamin berperan pada penyakit Huntington, terdapat kemiripan 70% antara ikan zebra dan manusia (Karlovich, et al., 1998). Antisense morpholino knockdown pada protein Htt ikan zebra memungkinkan kajian penyakit Huntington pada perkembangan awal embrio, sedangkan null mutation gen ini pada mencit mengalami kematian (Zeitlin, et al., 1995). Gen terkait penyakit Alzheimer antara lain amyloid- precursor protein (APP) gen. Ikan zebra memiliki 2 gen yang identik dengan APP pada manusia yaitu appa dan appb (Musa, et al., 2001).

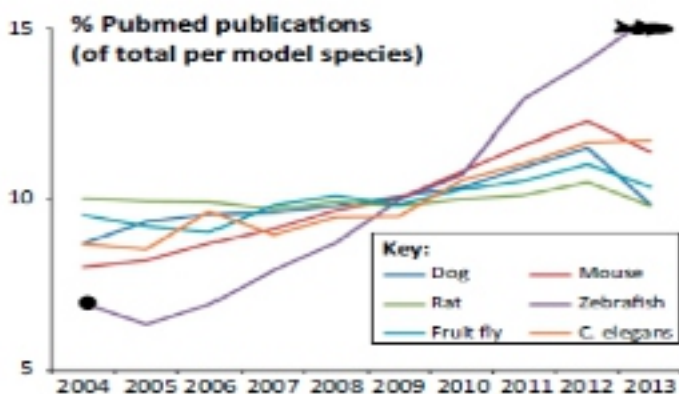
Ikan zebra model Parkinson's tidak hanya dapat dibuat secara genetik dengan 'knock out' gen Park1, DJ1 ataupun Pink1, namun penggunaan salah satu bahan kimia seperti rotenone, 6-OHDA dan MPTP dapat menyebabkan parkinsonism. Khotimah, et al (2015), menggunakan rotenone konsentrasi 5 µg/L selama 28 hari untuk mendapatkan tanda-tanda parkinson seperti gangguan motilitas, penurunan kadar dopamine dan peningkatan ekspresi α-synuclein.

### b. Toksikologi dan Penemuan Obat

Embrio dan ikan zebra dewasa dapat digunakan untuk menguji toksisitas akut terhadap berbagai bahan (misalnya logam berat, pestisida dan senyawa-senyawa lainnya yang menyebabkan kontaminasi lingkungan atau polusi). Uji toksisitas akut meliputi penentuan LC50 (konsentrasi yang dapat membunuh 50% ikan). Pendekatan serupa juga dapat dilakukan untuk penapisan toksisitas akut senyawa obat. Terdapat beberapa standar uji toksisitas yang direkomendasi oleh International Standardization Organization (ISO) misalnya Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), dan telah ada rekomendasi internasional untuk pengujian toksisitas akut baik pada embrio maupun ikan zebra dewasa (OECD, 2006).

Paparan pestisida 12,5 ppm dapat menyebabkan stunting pada larva zebrafish (Khotimah, et al., 2018). Berbagai logam berat juga dapat menyebabkan gangguan tumbuh kembang embrio zebrafish. Paparan logam berat cadmium 30 µM (Risnawati, et al., 2019), Timbal asetat 2,5 ppm





Gambar 3. Persen Publikasi pada Pubmed yang Menggunakan Berbagai Hewan Model (Stewart, et al., 2014).

(Octaviana, et al., 2019), Aluminium klorida 50  $\mu$ M (Supriadi, et al., 2019) konsentrasi rendah pada saat embryogenesis membuktikan adanya gangguan perkembangan neurodevelopment secara molekuler mulai ectodermis, mesodermis maupun endodermis.

Berbagai percobaan menggunakan herbal juga telah dilakukan pada zebrafish baik pada tahap embrio, larva maupun dewasa. Ekstrak pegagan dapat melindungi larva zebrafish yang mengalami hipoksia dengan kadar oksigen 4.3 mgO<sub>2</sub>/L (Ariani, et al., 2019).

### c. Model untuk Penyakit Genetik

Kesamaan homologi gen antara ikan dan manusia sebelumnya tidak seorangpun meyakini, sampai akhirnya Postlethwait, et al., (1998) membuktikan adanya kesamaan lokus kromosom antara ikan dan manusia. Hal ini membuka peluang untuk eksplorasi kesamaan genetik antara ikan zebra dan manusia berdasarkan data Human Genome Project. Selanjutnya diketahui bahwa persamaan genetik antara ikan zebra dan manusia adalah 75%. Diawali oleh Streisinger, et al., (1981) yang memberikan landasan kuat untuk eksplorasi gen pada ikan zebra terkait penyakit pada manusia.

Pengembangan kajian genomik pada ikan zebra didukung oleh Trans-NIH Zebrafish initiative. Kemudahan manipulasi genetik dengan menggunakan morpholino oligonucleotide antisense yang diinjeksi pada embrio akan menghentikan sebagian proses translasi pada mRNA merupakan cara yang cukup potensial untuk pengembangan kajian genetik (Ekker, 2000 ; Nasevicius and Ekker, 2000).

### d. Model untuk penyakit Kanker

Proses pertumbuhan pembuluh darah merupakan hal konservatif pada vertebrata, dan embrio ikan zebra telah berhasil dikembangkan sebagai model vertebrata untuk pengamatan efek obat pada angiogenesis. Sebagaimana diketahui bahwa angiogenesis diperlukan untuk pertumbuhan

Tabel 1. Berbagai Kesamaan Linkage antara Ikan Zebra dan Manusia (Barbazuk, et al., 2000)

Zebrafish linkage group	Human chromosome
1	1, 2, 4, 13, 14
2	1, 2, 3, 7, 8, 9, 19
3	7, 11, 16, 17, 19
4	3, 7, 11, 12
5	5, 9, 11, 14, 17, 19, X
6	2, 12, 13, 19
7	7, 11, 16, 19
8	1, 3, 4, 5, 7, 8, X
9	2, 11, 21, X
10	3, 4, 11, 21
11	1, 3, 8, 12, 17
12	2, 10, 17, 22
13	4, 6, 10, 19
14	5, 11, X
15	3, 11, 17
16	3, 6, 8, 17, 19
17	2, 4, 14, 20
18	11, 15, 19, 22
19	1, 3, 6, 7
20	2, 4, 6, 20
21	5, 6, 9, 10, 11
22	1, 2, 7, 12, 19
23	1, 3, 6, 7, 12, X
24	8, 10
25	5, 11, 15, 22

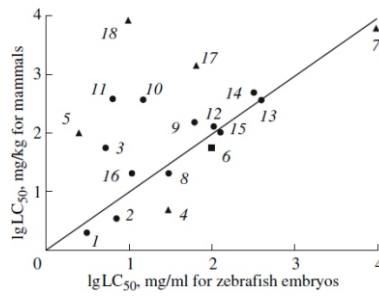
tumor dan metastase serta penyembuhan luka (Balyaeva, et al., 2009). Perbandingan antara genom manusia dan ikan zebra memiliki tingkat konservasi dan homologi yang tinggi untuk proses siklus sel, tumor supresor dan onkogen. Karena kesamaan tersebut ikan zebra merupakan model unggulan untuk penelitian berbagai macam kanker (Patton and Zon, 2001).

### e. Model untuk Penyakit Kardiovaskuler dan Olah Raga

Terdapat banyak kesamaan antara jantung manusia dengan ikan yaitu berfungsi memompa darah dengan arah dan ritme yang sama serta dibentuk oleh sel myosit yang terkonservasi. Perkembangan jantung ikan zebra sempurna pada 22 jam pasca fertilisasi (hour post fertilization = hpf), sedangkan pada tikus 12 hari setelah fertilisasi (day post fertilization = dpf) dan pada manusia 35 dpf. Jantung ikan zebra mulai berdetak pada 22 hpf mula-mula seperti geombang peristaltik dan berkembang menjadi kontraksi yang terkoordinasi pada 36 hpf. Ikan zebra hanya memiliki 2 ruang jantung dan tidak memiliki sirkulasi pulmonal. Meskipun demikian, terdapat konservasi yang signifikan dengan mamalia pada perkembangan jantung baik secara morfologi, fisiologi dan genetiknya sehingga bermanfaat untuk penelitian penyakit kardiovaskuler (Rocke, et al., 2009).

### f. Model untuk Kajian Oksidatif Stress dan Apoptosis

Stres Oksidatif terkait dengan proses aging dan berbagai penyakit lain. Belum banyak penelitian yang mengeksplorasi anging pada ikan. Namun demikian telah diketahui bahwa respon adaptif terhadap toksikan oksidatif stressor pada ikan mirip dengan mamalia (Kelly, et al., 1998). Ikan memiliki konsentrasi antioksidan enzimatis relatif lebih tinggi dibanding pada burung dan mamalia (Hsu, et al., 2009)



Gambar 4. Perbandingan toksisitas dari berbagai Senyawa pada Ikan Zebra dan Mamalia. Senyawa yang diuji: (1) geladanamycin; (2) didemnin B; (3) merbarone; (4) Fujisawa peptide; (5) trithiophene; (6) 4-ipomeanol; (7) ethanol; (8) doxorubicin; (9) cyclosporineA; (10) naproxen; (11) ibuprofen; (12) aspirin; (13) dexamethasone; (14) acetaminophen; (15) caffeine; (16) tacrine; (17) dichloroacetic acid; (18) polychlorinated biphenyls. Masing-masing adalah nilai LC50 untuk ikan zebra (mg/l) berbanding LC50 (mg/kgBB) untuk rodensia: mencit (lingkaran), tikus (segitiga), dan kelinci (kubus). Garis lurus menunjukkan koinsiden antara kedua nilai (Balyaeva, et al., 2008).



Gambar 5. Pemeliharaan dilakukan pada akuarium dengan aliran semi static dengan bantuan pompa air dan siklus gelap terang diatur dengan bantuan timer.

## g. Model untuk Angiogenesis

Pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) dan regulasi propagasi pembuluh darah (anti-angiogenesis) sangat penting bagi kesehatan terutama untuk penyembuhan luka dan pertumbuhan jaringan. Ikan zebra berperan penting sebagai model kajian vascular embriogenesis karena kemudahan eksplorasi genetik, embrio tumbuh secara eksternal dan transparan. Telah dikembangkan metode visualisasi pembuluh darah Ikan zebra termasuk whole-mount in situ hybridization (Forquet, et al., 1997), deteksi aktivitas alkalin fosfatase endogen dan mikroangiografi (Weinstein, et al., 1995). Kidd dan Weinstein (2003), melaporkan pemetaan dan perkembangan vaskuler ikan zebra, sehingga dapat dikembangkan kajian terapetik angiogenesis. Pembuluh darah embrio dapat diwarnai dan diamati di bawah mikroskop. Sistem vaskuler yang impermeable dapat diwarnai dengan pewarna fluorescence (Balyaeva, 2009).

Berbagai topik penelitian lain seperti diabetes, osteoporosis, gangguan ginjal, liver, infeksi mikroba, virologi, kajian imunologi bahkan pembuatan vaksin telah dilakukan.

## Metode Perawatan Ikan Zebra

Pemeliharaan ikan zebra relatif lebih mudah disbanding hewan model lainnya terutama rodensia. Karena membutuhkan tempat yang leratif kecil dan sarana prasarana yang relative murah. Ikan ini hidup di air tawar (salinitas 0–0,6) dengan suhu 28 1C, siklus gelap terang 10:14, pemberian pakan 2-3 kali sehari (flakes pellet untuk dewasa dan artemia untuk larva), fertilitas lebih dari 70%, oksigen terlarut lebih dari 60%, survival rate embrio 90%. Konduktifitas air antara 200 samapi 1500S, (Lammer et al., 2009).

Untuk larva pemeliharaan dilakukan dalam embrionik medium (E3) dengan komposisi CaCl 0.25 gr, KCl 0.15 gr, NaCl 5 gr, MgSO4 0.815 gr ditambahkan aquades sampai volume 500 mL. Cairan ini dibuat dalam konsentrasi yaitu 10x, sehingga untuk pemakaiannya harus dilarutkan 10 kali (Khotimah, 2018)

## Referensi

- Ariani, Niati, R., Khotimah, Ali, M.M., 2019. *The effect of ethanol extract of Centella asiatica on tactile motility and body length of hypoxic larval zebrafish*. AIP roceeding Conference. 020001
- Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J.A., McPherson, J.D., Johnson, S.J., 2000. *The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Belyaeva, N.F., Kashirtseva, V.N., Medvedeva, N.V., Khudoklinove, Y.Y., Ipatova, O.M., Archakov, A.I., 2009. Zebrafish as A Model System for Biomedical Studies. *Biomedical Biochemistry*. Vol. 3. No. 4. Pp. 343-350.
- Detrich, H.W., Westerfield, M., Zon, L.I., 2009. *Essential Zebrafish Method : Genetics and Genomics*. Elsevier. 1st edition. UK.
- Driever, W, Solnica-Krezel, L, Schier, AF, Neuhauss, SC, Malicki, J, Stem- ple, DL, Stainier, DY, Zwartkruis, F, Abdelilah, S, Rangini, Z, Belak, J, and Boggs, C., 1996. A Genetic Screen for Mutations Affecting Embryo- genesis in Zebrafish. *Development* 123: 37-46.
- Eisen, J.S., 1996. Zebrafish Make a Big Splash. *Cell* Vol 87. Pp 969-977.
- Fishman, M.C., 1999. Zebrafish Genetics: The Enigma of Arrival. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol 96. Pp 10554-10556. www.zfin.org
- Fourquet, B., Weinstein, B.L., Serluca, F.C., Fishman, F.C., 1997. Vessel Patterning in the Embryo of Zebrafish : Guidance by Notochord. *Dev Biol*. Vol 183. Pp 37-48.
- Hsu, C.H., Wen, Z.H., Lin, C.S., Chakraborty, C., 2007. The Zebrafish Model: Use in Studying Cellular Mechanisms for a Spectrum of Clinical Disease Entity. *Curr Neurovascular Res*. Vol 4. Pp 111-120.
- Kelly, K.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998. Oxidative Stress in Toxicology : Establish Mammalian and Piscine Model System. *Environ Health Perspec*. Vol 106. Pp 375-384.
- Khotimah H, Darwitri D, Yuliyani T, Nuraenah E, Zahara E, Kalsum U, Nurdiana N, Ali M. M., 2018. Centella Asiatica Increased the Body Length Through the Modulation of Antioxidant in Rotenone-Induced Zebrafish Larvae. *Biomed Pharmacol J*;11(2).
- Khotimah, H., Ali, M.M., Sumitro, S.B., Widodo, M.A., 2015. Decreasing  $\alpha$ -synuclein aggregation by methanolic extract of Centella asiatica in zebrafish Parkinson's model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(11):948-954
- Khotimah H, Darwitri D, Yuliyani T, Nuraenah E, Zahara E, Kalsum U, Nurdiana N, Ali M. M. Centella Asiatica Increased the Body Length Through the Modulation of Antioxidant in Rotenone-Induced Zebrafish Larvae. *Biomed Pharmacol J* 2018;11(2).
- Kidd, K.R., Weinstein, B.M., 2003. Fishing for Nover Angiogenic Therapies. *Brithis H of Phar*. Vol 180. Pp 585-594.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullman, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Journal of Developmental Dynamics*.
- Knapik, E.A., Goodman, M., Ekker, M., Chevrette, J., Delgado, S., Neuhauss, N., Shimoda, W., Driever, M., Fishman, J.H., 1998. A Microsatellite Genetic Linkage Map for Zebrafish (Daniorerio). *Nat genet* 18: 338-343.
- Langheinrich, U., 2003. *Bioassays*. Vol. 25, pp. 904–912.
- Leischke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal Models for Human Disease : Zebrafish Swim into View. *Nat Pub Group*. Vol 8. Pp 353-367.
- Murphy, P., 2003. *Model Organism*. Developmental Biology.
- Patton, E.E., Zon, L.I., 2001. The Art and Design of Genetic Screen : Zebrafish. *Nat Rev Genet*. Vol 2. Pp 956-966.
- Raible, D., Granato., M., 2011. *Zebrafish Development and Genetics*. Marine Biological Library. USA.
- Risnawati., Diestika, Y., Khotimah, H., Ali, M.M., Widodo., M.A., Nurdiana, Kalsum., U., 2019. Development of cadmium-induced zebrafish larvae improved by Centella asiatica AIP roceeding Conference. 2108, 020032 Octaviana, R., Wari, F.E., Noviasari, D., Khotimah, Ali, M.M., Nurdiana, Kalsum, U., 2019. Effect of Centella asiatica to developmental process of lead-induced zebrafish larvae. *AIP proceeding Conference*. 2108, 020033
- Supriadi, R.F., Permata, T.R., Norisa, N., Khotimah, H., Ali, M.M., Widodo, M.A., Nurdiana, Kalsum, U., 2019. Centella asiatica protect the development of aluminum-induced zebrafish larvae. *AIP proceeding Conference*. 2108, 020030
- Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R and Kalueff AV, 2014 Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends in Neurosci* Vol. 37, 5.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. & Singer, F., 1981. Production of Clones of Homozygous Diploid Zebra Fish (Brachydaniorerio). *Nature* 291, pp: 293–296
- Weinstein, B.M., Stemple, D.L., Driever, W., Fishman, M.C., 1995. Gridlock, a Localize Heritable Vascular Patterning Defect in Zebrafish. *Nat Med*. Vol 1. Pp 1143-1147.