

PENGARUH VARIASI DIET LEMAK TERHADAP HIPERPLASIA DAN FUSI LAMELA SEKUNDER INSANG IKAN ZEBRA BETINA (*Danio rerio*)

Aliyah, Noer Aini*, Dini Sri Damayanti***

*Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, **Pusat Studi Integrasi Kedokteran Islam, Bioinformatika dan Obat Tradisional Indonesia (PSIKIBiOTI)

ABSTRAK

Pendahuluan: Obesitas merupakan masalah kesehatan global dan salah satu faktor risiko utama terjadinya obesitas adalah pola konsumsi diet tinggi lemak, sehingga banyak digunakan sebagai model eksperimental dalam penelitian metabolik. Ikan zebra betina (*Danio rerio*) dipilih sebagai hewan model karena kemiripan jalur metabolisme lipid dengan mamalia dan peran estrogen dalam regulasi lipid. Insang, sebagai organ dengan struktur lamela sekunder yang tipis dan sensitif, diduga rentan terhadap perubahan histopatologi akibat stres metabolik dari asupan lemak berlebih.

Metode: Penelitian ini merupakan eksperimental *in vivo* dengan *Posttest-Only Control Group Design* pada ikan *Danio rerio* dewasa betina yang dibagi dalam empat kelompok ($n = 8$) dan diberi variasi diet lemak selama 28 hari, yaitu P1: pelet standar; P2: campuran kuning telur + pelet; P3: *Artemia salina*; P4: campuran kolesterol murni 4% + pelet. Histopatologi derajat hiperplasia dan fusi lamela sekunder insang dievaluasi dan dianalisis menggunakan uji One-Way ANOVA yang dilanjutkan dengan *post hoc test* Tukey HSD.

Hasil dan Pembahasan: Hiperplasia dan fusi lamela sekunder terjadi pada seluruh kelompok perlakuan. Kelompok P2, P3, dan P4 signifikan meningkatkan derajat hiperplasia lamela sekunder insang *Danio rerio* dewasa berturut-turut 12,07%, 13,52%, dan 15,59% dibandingkan kelompok P1. Pada parameter fusi lamela sekunder, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antar kelompok.

Simpulan: Pemberian diet campuran kuning telur + pelet, *Artemia*, serta campuran kolesterol 4% + pelet terbukti signifikan meningkatkan derajat hiperplasia lamela sekunder insang dibandingkan diet pelet, tetapi tidak berbeda signifikan terhadap fusi lamela sekunder insang ikan zebra betina.

Kata Kunci: Obesitas, Stress Oksidatif, Hiperkolesterolemia, Hewan Model

#Penulis Korespondensi: Dini Sri Damayanti (dinisridamayanti@unisma.ac.id)

Jl. MT. Haryono No. 193, Kota Malang, 65144

THE EFFECT OF DIETARY FAT VARIATIONS ON SECONDARY LAMELLAE HYPERPLASIA AND FUSION OF THE GILLS IN FEMALE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Aliyah, Noer Aini*, Dini Sri Damayanti***

*Faculty of Medicine, Universitas Islam Malang, **Center for the Integration of Islamic Medicine, Bioinformatics, and Indonesian Traditional Medicine (CIIMBITM)

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a global health problem, and one of its primary risk factors is a high-fat dietary pattern, which is widely used as an experimental model in metabolic research. Female zebrafish (*Danio rerio*) were selected as the animal model due to their similarity in lipid metabolism pathways to mammals and the role of estrogen in lipid regulation. The gills, as an organ with thin and sensitive secondary lamellae structures, are presumed to be susceptible to histopathological changes resulting from metabolic stress induced by excessive fat intake.

Methods: This study was an *in vivo* experimental study with a *Posttest-Only Control Group Design* involving adult female *Danio rerio* divided into four groups ($n = 8$) and given dietary fat variations for 28 days, namely P1: standard pellets; P2: egg yolk + pellet mixture; P3: *Artemia salina*; P4: 4% pure cholesterol + pellet mixture. The histopathological degree of secondary lamellae hyperplasia and fusion was evaluated and analyzed using One-Way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc test*.

Results and Discussion: Secondary lamellae hyperplasia and fusion were observed in all treatment groups. Groups P2, P3, and P4 significantly increased the degree of secondary lamellae hyperplasia in adult *Danio rerio* gills by 12.07%, 13.52%, and 15.59%, respectively, compared to group P1. No significant difference was found among groups for the secondary lamellae fusion parameter.

Conclusion: Administration of the egg yolk + pellet mixture diet, *Artemia*, and the 4% cholesterol + pellet mixture diet was proven to significantly increase the degree of gill secondary lamellae hyperplasia compared to the pellet diet, but did not differ significantly in terms of secondary lamellae fusion in female zebrafish gills.

Keywords: Obesity, Oxidative Stress, Hypercholesterolemia, Animal Model

#Corresponding Author: Dini Sri Damayanti (dinisridamayanti@unisma.ac.id)

Jl. MT. Haryono No. 193, Kota Malang, 65144

PENDAHULUAN

Obesitas merupakan masalah kesehatan global yang terus meningkat, dengan lebih dari 890 juta kasus pada tahun 2022 (43% populasi dewasa dunia), naik dari 25% pada 1990. Di Indonesia, prevalensinya mencapai 23,4% pada 2023, meningkat dari 21,8% pada 2018 (1). Diet tinggi lemak dan kalori menjadi faktor risiko utama, menyebabkan ketidakseimbangan energi, akumulasi lipid ektopik, serta stres oksidatif dan inflamasi kronik sistemik yang berdampak luas, termasuk pada organ respirasi seperti insang. Ikan zebra (*Danio rerio*) banyak digunakan sebagai model diet tinggi lemak karena kesamaan jalur metabolisme lipidnya dengan mamalia (2), sehingga perubahan histopatologis organnya menjadi indikator gangguan metabolik yang sensitif.

Hiperplasia lamela sekunder, berupa peningkatan sel epitel akibat proliferasi kompensatorik terhadap kerusakan, merupakan respons histopatologis yang umum terjadi akibat akumulasi lipid sistemik, produk peroksidasi lemak, dan inflamasi dari diet tinggi lemak, selain dari kualitas air buruk, infeksi, dan hipoksia (3,4). Bila persisten, proliferasi epitel mengisi ruang interlamelar hingga lamela berdekatan menyatu membentuk fusi (5), menurunkan luas permukaan pertukaran gas dan efisiensi respirasi hingga berdampak fatal (6). Karena itu, keduanya dapat dijadikan penanda histopatologis yang sensitif terhadap stres metabolik dan toksik pada ikan (7).

Diet tinggi lemak pada ikan meningkatkan trigliserida dan kolesterol plasma, menginduksi akumulasi lemak ektopik di insang, serta memicu inflamasi kronik via NF- κ B (8). Kolesterol bersifat toksik langsung terhadap membran dan endotel melalui oksisterol/ox-LDL, sedangkan trigliserida dan PUFA merusak lewat jalur tidak langsung yang membutuhkan paparan lebih lama (8,9). Perbedaan sumber dan komposisi diet, seperti pelet yang tinggi karbohidrat, kuning telur kaya trigliserida/fosfolipid, Artemia salina tinggi protein/PUFA, dan kolesterol murni, dapat menghasilkan respons metabolik berbeda. Pemberian kuning telur-pelet dapat menginduksi obesitas dan hiperlipidemia, Artemia dosis tinggi memicu hipertrigliseridemia dan hiperglikemia (10,11). Di sisi lain, kolesterol murni 4% menginduksi hiperkolesterolemia lebih parah (12).

Namun demikian, penelitian yang membandingkan langsung pemberian pelet, kuning telur, Artemia, dan kolesterol murni terhadap hiperplasia dan fusi lamela sekunder insang dalam satu model, khususnya pada ikan zebra betina, masih terbatas. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi perbedaan derajat hiperplasia dan fusi lamela sekunder insang ikan zebra betina (*Danio rerio*) akibat variasi diet lemak selama 28 hari, sebagai kontribusi ilmiah mengenai insang sebagai biomarker histopatologis gangguan metabolik pada model obesitas ikan zebra.

METODE

Desain Penelitian

Penelitian eksperimental *in vivo* dengan desain *Posttest-Only Control Group* pada ikan zebra betina (*Danio rerio*) dewasa. Izin etik diperoleh dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (No. 43/KEPK/RSI-U/VII/2025). Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan Laboratorium Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang, selama bulan November 2025 hingga Februari 2026.

Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 32 ekor ikan zebra betina (*Danio rerio*) berusia 5 bulan dengan ukuran 3–5 cm dan berat 0,3–0,5 gram. Sampel diperoleh dari Laboratorium Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, dan telah dideterminasi oleh Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga (No. sertifikat: 003/UP-FISH/UA.FPK/07/2025). Jumlah sampel dihitung menggunakan rumus Federer (1991) untuk empat kelompok perlakuan, menghasilkan minimal enam ekor per kelompok, ditambah 20% cadangan, kemudian dibagi merata ke dalam empat kelompok ($n=8$). Ikan diaklimatisasi selama satu minggu dengan siklus cahaya 14 jam terang dan 10 jam gelap, suhu air 25°C, dan pergantian air setiap dua hari (13).

Prosedur Diet Perlakuan

Setelah aklimatisasi, berat badan setiap ikan diukur sebagai dasar menentukan takaran diet. Seluruh kelompok diberi diet masing-masing tiga kali sehari selama 28 hari. Kelompok P1 menerima pelet standar komersial sebanyak 3,5% dari berat badan (BB) per ekor per pemberian. Kelompok P2 menerima campuran kuning telur ayam dan pelet (rasio 5:1) sebesar 5% BB per ekor. Proses pembuatannya melalui perebusan, penghalusan, dan pengeringan kuning telur dengan oven 40°C selama 24 jam, lalu dicampur pelet dan ditambahkan binder Na-CMC 1%, dikeringkan kembali, kemudian dibentuk menjadi granul menggunakan mesh 50 mikrometer (10). Kelompok P3 menerima Artemia salina instan Polar Red sebanyak 20 mg per ekor atau 5% BB per ekor (10). Kelompok P4 menerima campuran pelet dan kolesterol murni 4% dengan dosis penyajian sebesar 5% BB per ekor. Proses pembuatan dilakukan dengan melarutkan kolesterol murni 4% dalam etanol 96% lalu dicampurkan ke pelet menggunakan rotavapor 40°C hingga etanol menguap sepenuhnya, setelah itu dikeringkan dengan oven 40°C selama 24 jam, kemudian dibentuk menjadi granul menggunakan mesh berukuran 50 mikrometer (12). Satu jam setelah pemberian diet perlakuan, air akuarium dikuras untuk menghilangkan sisa pakan dan kotoran. Untuk menjaga kebersihan akuarium, air diganti setiap dua hari sekali. Selain itu, kadar oksigen terlarut dipantau menggunakan oksimeter setiap satu minggu sekali (10).

Pembuatan Preparat Histologi

Setelah 28 hari perlakuan, insang ikan diambil dan difiksasi dalam larutan formalin buffer fosfat

10% selama 24 jam. Jaringan kemudian melalui tahapan dehidrasi dengan seri alkohol bertingkat (70%, 80%, 96%), penjernihan dengan xylol, perendaman dalam parafin cair 56°C, dan pemblokiran. Pemotongan jaringan dilakukan dengan mikrotom setebal 4–5 µm. Pewarnaan dilakukan dengan Hematoksin-Eosin (HE) menggunakan protokol standar histologi (14). Preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX23 dengan perbesaran 400×.

Pengamatan dan Penilaian Hiperplasia dan Fusi Lamela Sekunder

Penilaian derajat hiperplasia dan fusi lamela sekunder dilakukan pada lima lapang pandang acak per preparat oleh tiga pengamat independen menggunakan sistem semi-kuantitatif. Persentase hiperplasia dan fusi dihitung sebagai rasio lamela yang mengalami perubahan terhadap total lamela dalam satu lapang pandang, dikalikan 100% (15).

$$(\%) \text{Hiperplasia} = \frac{\text{Jumlah hiperplasia lamela sekunder}}{\text{Jumlah total lamela sekunder insang}} \times 100\%$$

$$(\%) \text{Fusi} = \frac{\text{Jumlah fusi lamela sekunder insang}}{\text{Jumlah total lamela sekunder insang}} \times 100\%$$

Table 1. Skoring Hiperplasia dan Fusi Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra (*Danio rerio*)

No.	Skor	Kriteria Hiperplasia	Kriteria Fusi
1.	0 (Normal)	Tidak terdapat hiperplasia	Tidak terdapat fusi
2.	1 (Ringan)	Terdapat hiperplasia berupa fokal atau menyebar sebesar <10% area jaringan	Terdapat fusi fokal atau menyebar sebesar <10% area jaringan
3.	2 (Sedang)	Terdapat hiperplasia berupa multifokal atau menyebar sebesar 10–50% area jaringan	Terdapat fusi multifokal atau menyebar sebesar 10–50% area jaringan
4.	3 (Berat)	Terdapat hiperplasia luas (difus) sebesar >50% area jaringan	Terdapat fusi luas (difus) sebesar >50% area jaringan dan hilangnya struktur normal lamela sekunder

Keterangan: Sistem skoring semi-kuantitatif untuk menentukan derajat kerusakan insang *Danio rerio*.

Nilai akhir tiap sampel diperoleh dari rata-rata nilai persentase lima lapang pandang. Selanjutnya, nilai akhir tersebut dimasukkan ke dalam sistem skoring sesuai Tabel 1(15). Secara histologi, Hiperplasia lamela sekunder dicirikan sebagai penebalan epitel akibat jumlah sel yang bertambah, menyebabkan penyempitan ruang interlamela (16), sedangkan lesi fusi dicirikan dengan hilangnya batas antar lamela, hilangnya ruang interlamela, serta pada lamela yang berdekatan terbentuk penghubung berupa jembatan epitel yang mengakibatkan perubahan bentuk insang (16).

Analisis Data

Data hiperplasia dan fusi lamela sekunder insang ikan zebra betina (*Danio rerio*) dianalisis menggunakan One Way ANOVA untuk menguji hipotesis kemudian guna mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan, uji dilanjutkan dengan *post hoc test* Tukey HSD. Nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik.

HASIL DAN ANALISIS DATA

Karakteristik Sampel

Karakteristik sampel penelitian meliputi jenis induksi, kandungan lemak, dosis diet, jenis kelamin,

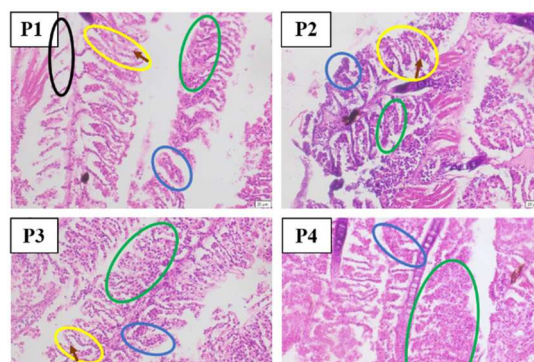
usia, BMI awal dan akhir, kadar glukosa darah, pH air, jumlah sampel, dan durasi induksi disajikan pada Tabel 2.

Table 2. Karakteristik Sampel Penelitian

Keterangan	P1	P2	P3	P4
Jenis Induksi	Pelet	Kuning Telur + Pelet	Artemia	Kolesterol + Pelet
Kandungan Lemak Kasar	2–3%	50–60%	4–5%	6–8%
Dosis Diet	3,5% BB ikan	5% BB ikan	20 mg/ekor (5% BB ikan)	5% BB ikan
Sampel Populasi	Ikan zebra betina 3-5 bulan	Ikan zebra betina 3-5 bulan	Ikan zebra betina 3-5 bulan	Ikan zebra betina 3-5 bulan
Jumlah	8 Ekor	8 Ekor	8 Ekor	8 Ekor
Durasi Induksi	28 Hari	28 Hari	28 Hari	28 Hari
BMI Awal (g/cm ²). Mean ± SD	0,044 ± 0,006	0,044 ± 0,006	0,045 ± 0,002	0,046 ± 0,003
BMI Akhir (g/cm ²). Mean ± SD	0,076 ± 0,006	0,070 ± 0,008	0,067 ± 0,008	0,069 ± 0,004
Glukosa Darah (mg/dL). Mean ± SD	150,67±59,25	189,00±82,27	215,00±105,53	153,67±23,03
pH Air	8,4	8,3	8,4	8,3

Keterangan: Karakteristik pada sampel yang digunakan dalam penelitian ini.

Hasil Pengamatan Histopatologi Insang



Gambar 1. Lesi Histopatologi Insang Ikan Zebra Betina (*Danio rerio*)

Keterangan: (P1) Kelompok diet Pelet, (P2) Kelompok perlakuan diet campuran Kuning Telur+Pelet, (P3) Kelompok perlakuan diet Artemia, (P4) Kelompok perlakuan diet campuran Kolesterol murni 4%+Pelet. Lesi histopatologi yang ditunjukkan pada gambar ini ialah Hiperplasia lamela sekunder (Lingkaran biru) yang terlihat sebagai penebalan epitel lamela sekunder akibat penambahan jumlah sel. Selanjutnya, Fusi lamela sekunder (Lingkaran hijau) berupa penempelan beberapa lamela sekunder yang saling berdekatan akibat sel epitel yang memenuhi ruang interlamelar. Selain itu, terdapat Edema (Lingkaran kuning) dengan ciri khas epithelial lifting (Panah coklat) akibat akumulasi cairan di bawah lapisan epitel. Sedangkan lamela sekunder normal berada dalam lingkaran warna hitam. Pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) dan diamati pada perbesaran 400x.

Gambaran mikroskopis insang ikan zebra betina (*Danio rerio*) dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil Pengamatan histopatologi menunjukkan bahwa perubahan struktur histopatologi lamela sekunder insang berupa hiperplasia dan fusi telah terjadi pada semua kelompok perlakuan. Meskipun demikian, kelompok P1 menunjukkan hiperplasia epitel lamela sekunder yang bersifat lebih fokal dengan sebagian lamela masih memperlihatkan celah interlamelar yang jelas, sedangkan fusi hanya ditemukan pada sebagian kecil lamela. Kelompok P2, P3, dan P4

menunjukkan hiperplasia epitel yang lebih difus disertai penebalan epitel interlamelar yang meluas serta fusi antar-lamela yang melibatkan lebih banyak lamela sekunder dibandingkan kelompok P1.

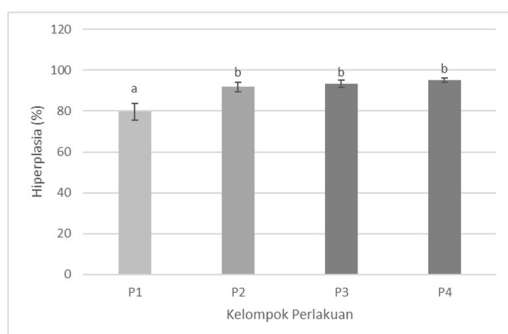
Hasil skoring keempat kelompok berdasarkan sistem skoring semi-kuantitatif (15) disajikan pada Tabel 3, menunjukkan bahwa keempat kelompok perlakuan tersebut termasuk dalam katagori derajat hiperplasia dan fusi berat dengan skor 3 karena terdapat lesi luas (difus) sebesar >50% area jaringan.

Hasil analisis persentase hiperplasia dan fusi lamela sekunder insang

Berdasarkan hasil analisis menggunakan uji One-Way ANOVA yang dilanjutkan dengan *post hoc test* Tukey HSD sebagaimana disajikan pada Tabel 3, kelompok P1 memiliki rerata persentase hiperplasia lamela sekunder yang secara signifikan lebih rendah dibandingkan kelompok P2, P3, dan P4.

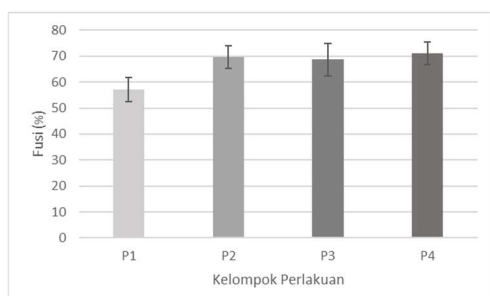
Table 3 Hasil Analisis Persentase Hiperplasia dan Fusi Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra Betina (*Danio rerio*)

Kelompok Perlakuan	n	Mean $\pm$ SE (%)		Kriteria Skor
		Hiperplasia	Fusi	
Pelet (P1)	8	79,71 $\pm$ 4,02 ^a	57,13 $\pm$ 4,66	3 (Berat)
Kuning telur+Pelet (P2)	8	91,78 $\pm$ 2,28 ^b	69,55 $\pm$ 4,34	3 (Berat)
Artemia (P3)	8	93,23 $\pm$ 1,78 ^b	68,69 $\pm$ 6,22	3 (Berat)
Kolesterol+Pelet (P4)	8	95,30 $\pm$ 1,09 ^b	71,12 $\pm$ 4,28	3 (Berat)



Gambar 2. Rerata Histogram Hiperplasia Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra Betina (*Danio rerio*)

Keterangan: Rerata hiperplasia lamela sekunder insang *Danio rerio*, dipresentasikan dalam rata rata $\pm$ SE. Data telah dianalisis menggunakan uji One-Way ANOVA dengan signifikansi ($p < 0,05$). Notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$).



Gambar 3. Rerata Histogram Fusi Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra Betina (*Danio rerio*)

Keterangan: Rerata fusi lamela sekunder insang *Danio rerio*, dipresentasikan dalam rata rata $\pm$ SE. Data telah dianalisis menggunakan uji One-Way ANOVA dengan signifikansi

($p < 0,05$). Tidak ditemukan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p > 0,05$).

Namun, kelompok P2, P3, dan P4 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara satu sama lain. Sedangkan, pada parameter fusi lamela sekunder, hasil uji One-Way ANOVA tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan di antara keempat kelompok perlakuan.

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menilai perubahan histopatologis insang ikan zebra betina (*Danio rerio*) yaitu hiperplasia dan fusi lamela sekunder setelah pemberian variasi diet lemak berupa pelet standar, diet campuran kuning telur dan pelet, *Artemia salina* Polar Red, dan diet campuran kolesterol murni 4% dan pelet selama 28 hari. Pemilihan ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada kemiripan jalur metabolisme lipid yang mirip dengan vertebrata tingkat tinggi dan kemudahan induksi yang menyebabkan terjadinya gangguan metabolik melalui modifikasi pakan tanpa manipulasi genetik. Selain itu, ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan hewan model yang mudah dipelihara, memiliki siklus reproduksi cepat, dan ketersediaannya relatif mudah (17).

Penelitian ini hanya menggunakan ikan zebra betina (*Danio rerio*) karena metabolisme lipid pada ikan zebra dipengaruhi secara signifikan oleh jenis kelamin. Ikan zebra betina (*Danio rerio*) memiliki sistem regulasi metabolisme lipid yang dikendalikan secara aktif oleh estrogen, khususnya 17 β -estradiol (E2), sehingga menghasilkan respons yang lebih konsisten dan terukur terhadap paparan diet tinggi lemak. E2 dapat mengaktifkan AMP-activated protein kinase (AMPK) yang menghambat sintesis asam lemak sekaligus menekan jalur *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) yang mendorong lipogenesis sehingga ikan zebra betina secara alami menunjukkan aktivitas lipogenesis dan kapasitas akumulasi lipid yang lebih tinggi dibandingkan jantan melalui jalur estrogen-AMPK/mTOR ini (18). Selain itu, gen reseptor estrogen (ER α) di hati meregulasi ekspresi enzim kunci sintesis kolesterol (hmgcr), protein transpor lipoprotein, dan reseptor pengambilan kolesterol, yang terbukti dimodulasi oleh suplementasi E2 secara *sex-specific* pada ikan zebra dewasa (18). Kapasitas lipogenik yang lebih tinggi ini merupakan adaptasi fisiologis betina untuk mendukung vitelogenesis dan perkembangan oosit, yang sekaligus menjadikan ikan zebra betina lebih sensitif terhadap perubahan asupan lipid diet dan memberikan respons metabolik yang lebih konsisten terhadap intervensi diet tinggi lemak dibandingkan jantan (19).

Usia ikan zebra (*Danio rerio*) yang masuk kriteria inklusi penelitian ini yaitu usia 3—5 bulan karena ikan zebra dalam rentang usia tersebut sudah mencapai tahap dewasa. Dibandingkan fase larva

atau juvenil yang masih mengalami perubahan morfologis pesat, ikan zebra dewasa lebih konsisten memberikan respon metabolik dan histopatologi terhadap diet tinggi lemak (11,19).

BMI awal keempat kelompok homogen yaitu berkisar antara 0,044–0,046 g/cm². Setelah 28 hari, seluruh kelompok mengalami peningkatan BMI yang dapat diindikasikan sebagai kondisi obesitas dan menggambarkan (20). Selain itu, ikan zebra betina (*Danio rerio*) pada penelitian ini juga telah mengalami kondisi hiperglikemia yang ditandai oleh kadar glukosa darah puasa dari hasil penelitian bersama telah berada diatas ambang normal sekitar 70-90 mg/dL (21). Hiperglikemia ini dapat mendorong kerusakan insang melalui aktivasi jalur poliol, pembentukan *advanced glycation end products* (AGEs), aktivasi protein kinase C, dan jalur heksosamin secara simultan, dengan efek akhir berupa kerusakan protein struktural dan membran sel (22).

Kadar pH air akuarium seluruh kelompok perlakuan berada pada tingkatan yang sama yaitu 8,3—8,4 yang mengindikasikan kondisi basa. Kondisi ini dapat berpengaruh pada perubahan struktur insang karena insang ikan air tawar, termasuk ikan zebra, berperan sebagai organ esensial dalam regulasi ion dan asam-basa tubuh melalui sel-sel khusus yang disebut ionosit. Untuk mempertahankan homeostasis, terjadi mekanisme pertukaran ion-ion seperti Na⁺, H⁺, Cl⁻, HCO₃⁻. Pada kondisi lingkungan yang bersifat basa, gradien pertukaran Na⁺/H⁺ menjadi kurang menguntungkan bagi ikan untuk mengekskresikan H⁺ ke lingkungan, sehingga meningkatkan beban kerja sel ionosit. Apabila kondisi basa ini berlangsung lama, hal tersebut dapat menjadi stresor yang meningkatkan kerentanan jaringan insang terhadap perubahan struktural, termasuk hiperplasia epitel dan fusi lamela sekunder (23).

Dengan demikian, kondisi BMI, kadar glukosa darah, dan pH air berpotensi menjadi stresor yang dapat memicu kerusakan epitel insang pada seluruh kelompok perlakuan akibat induksi variasi diet lemak, tetapi tidak dapat menjelaskan perbedaan derajat hiperplasia antarkelompok dalam penelitian ini.

Pengaruh Variasi Diet Lemak terhadap Hiperplasia Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra Betina (*Danio rerio*)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh kelompok perlakuan, termasuk kelompok kontrol P1 (Pelet) dengan rerata 79,71 ± 4,02%, mengalami perubahan histopatologi insang berupa hiperplasia lamela sekunder yang termasuk dalam kategori skor 3 yaitu derajat hiperplasia berat dengan kriteria hiperplasia luas (difus) yang melibatkan lebih dari 50% area jaringan (15). Rerata persentase hiperplasia meningkat secara bertahap pada kelompok P2 (91,78 ± 2,28%), P3 (93,23 ± 1,78%), dan P4 (95,30 ± 1,09%). Hiperplasia merupakan peningkatan jumlah sel dalam suatu jaringan atau organ akibat percepatan laju proliferasi sel, yang terjadi melalui dua mekanisme utama, yaitu proliferasi sel matur yang dipicu oleh faktor pertumbuhan (*growth factor-driven proliferation*) dan/atau peningkatan

produksi sel baru dari sel punca jaringan (*tissue stem cells*) (24). Secara molekuler, pengikatan faktor pertumbuhan pada reseptor permukaan sel mengaktifkan jalur transduksi sinyal intraseluler yang mendorong sel keluar dari fase dorman (G0) dan masuk kembali ke siklus sel, sehingga terjadi peningkatan sintesis cyclin dan aktivasi *cyclin-dependent kinase* (CDK) yang mempercepat proses mitosis (24).

Berdasarkan pemicunya, hiperplasia dapat diklasifikasikan menjadi hiperplasia fisiologis, yang terjadi sebagai respons terhadap stimulus normal, dan hiperplasia patologis, yang timbul akibat stimulus abnormal seperti cedera kronis, inflamasi persisten, atau iritasi berkepanjangan (24). Pada insang ikan, hiperplasia fisiologis dapat dipicu oleh dua kondisi utama. Pertama, selama fase pertumbuhan (juvenil), proliferasi epitel insang terjadi seiring peningkatan kebutuhan luas permukaan respirasi untuk mengimbangi pertumbuhan ukuran dan laju metabolisme tubuh yang berkembang pesat, suatu proses yang diatur oleh sumbu hormon pertumbuhan *insulin-like growth factor* (GH-IGF1) (24). Kedua, hiperplasia fisiologis juga dapat terjadi dalam bentuk gill remodeling, yaitu pembentukan reversibel *interlamellar cell mass* (ILCM) sebagai respons adaptif terhadap perubahan kebutuhan oksigen, suhu lingkungan, atau kebutuhan osmoregulasi, yang akan kembali seperti bentuk semula begitu kondisi lingkungan kembali normal (6). Pada penelitian ini, ikan zebra (*Danio rerio*) yang digunakan merupakan individu dewasa yang telah melewati fase pertumbuhan aktif (juvenil), sehingga hiperplasia yang teramati tidak dapat dikategorikan sebagai hiperplasia fisiologis yang berkaitan dengan pertumbuhan, dan juga tidak didasari oleh kondisi lingkungan pemicu gill remodeling seperti hipoksia atau perubahan suhu ekstrem, karena kondisi lingkungan pemeliharaan pada penelitian ini relatif terkontrol dan stabil. Dengan demikian, hiperplasia lamela sekunder yang ditemukan pada seluruh kelompok perlakuan lebih tepat dikategorikan sebagai hiperplasia patologis (3).

Hiperplasia patologis lamela sekunder insang merupakan respons proliferasi defensif epitel terhadap paparan kronis iritan. Kerusakan berulang atau tekanan berkelanjutan pada sel epitel dapat mengaktifkan jalur perbaikan jaringan yang berujung pada peningkatan jumlah sel secara permanen (25). Hiperplasia patologis umumnya berlanjut selama stimulus iritan masih ada dan tidak dapat pulih seutuhnya meskipun stimulus dihilangkan, karena merupakan akumulasi dari proses perbaikan jaringan yang berulang (*misrepair*) (25). Insang merupakan organ yang paling rentan mengalami hiperplasia patologis karena posisi anatomisnya sebagai organ pertama yang menerima seluruh darah dari jantung (sirkulasi tunggal ikan) sekaligus berkontak langsung dengan medium air melalui mekanisme buccal-opercular pumping, sehingga memungkinkan epitel lamela sekunder terpapar iritan secara simultan dari dua jalur (26,27). Iritasi kronis yang berlangsung selama 28 hari pada seluruh

kelompok perlakuan dalam penelitian ini diduga telah menginduksi aktivasi terus-menerus jalur proliferasi sel epitel lamela, yang akhirnya bermanifestasi sebagai hiperplasia berat (skor 3) pada seluruh kelompok termasuk kelompok kontrol.

Jalur patofisiologis yang mendasari terjadinya hiperplasia patologis lamela sekunder insang pada penelitian ini diduga dipengaruhi oleh tiga jenis nutrien utama yang berbeda antar-kelompok perlakuan, yaitu karbohidrat/glukosa, lipid, dan protein, yang masing-masing mengaktifkan jalur stres oksidatif dan inflamasi melalui mekanisme yang berbeda namun bermuara pada satu respons akhir yang sama. Pertama, hiperglikemia yang dialami seluruh kelompok mendorong pembentukan *advanced glycation end products* (AGEs). Selanjutnya, AGEs berikatan dengan reseptornya (RAGE) pada permukaan sel endotel kapiler lamela (sel pilar) dan sel epitel insang. Kondisi ini akan mendorong produksi *reactive oxygen species* (ROS) berlebih, melalui aktivasi NADPH oxidase, sehingga memicu peroksidasi lipid membran dan mengaktifkan jalur inflamasi NF- κ B yang pada akhirnya meningkatkan sekresi sitokin proinflamasi (28). Kedua, kelebihan lipid baik dalam bentuk trigliserida (P2) maupun kolesterol murni (P4) dapat memicu akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) melalui peroksidasi lipid dan disfungsi mitokondria, serta pembentukan *oxidized LDL* (oxLDL) yang secara langsung mengaktifkan jalur inflamasi NF- κ B pada epitel lamela (8). Ketiga, kandungan protein tinggi pada *Artemia* (P3) menghasilkan kelebihan nitrogen yang diekskresi melalui insang dalam bentuk amonia. Paparan amonia yang meningkat menginduksi stres oksidatif melalui peningkatan ROS di jaringan insang dan mengaktifkan jalur pensinyalan IL-17 yang memediasi inflamasi dan hiperplasia epitel (29). Seluruh jalur tersebut akhirnya mengaktifkan sinyal proliferasi melalui MAPK dan PI3K-Akt yang mendorong sel epitel basal memasuki siklus sel dan berproliferasi, bermanifestasi sebagai hiperplasia lamela sekunder (22).

Perlu diperhatikan bahwa penelitian ini tidak mengukur kadar ROS, malondialdehid (MDA), maupun marker stres oksidatif lainnya secara langsung, sehingga keterlibatan jalur-jalur tersebut dilandaskan pada referensi literatur yang relevan dan belum terkonfirmasi secara eksperimental dalam konteks penelitian ini. Selain itu, metode analisis nutrisi pakan yang digunakan hanya mencakup uji lemak kasar (*proximate fat analysis*), yang mengukur seluruh fraksi lipid secara agregat tanpa dapat membedakan kandungan kolesterol murni, trigliserida, fosfolipid, protein, maupun karbohidrat secara spesifik. Keterbatasan ini menyebabkan karakterisasi mekanistik berdasarkan komposisi nutrisi aktual masing-masing pakan tidak dapat dilakukan secara presisi dan perlu dikonfirmasi pada penelitian selanjutnya dengan analisis nutrisi yang lebih komprehensif.

Tidak ditemukannya perbedaan yang signifikan di antara kelompok P2, P3, dan P4 diduga berkaitan dengan fenomena *ceiling effect*, yaitu kondisi ketika

suatu variabel telah mendekati nilai maksimum yang dapat terukur sehingga perbedaan pada variabel independen tidak lagi tercermin sebagai perbedaan yang terdeteksi secara statistik (30). Pada konteks penelitian ini, rerata persentase hiperplasia lamela sekunder pada kelompok P2, P3, dan P4, secara berturut-turut 91,78%, 93,23%, dan 95,30%, diduga telah mendekati batas kerusakan histopatologi maksimal yang dapat dicapai dalam durasi induksi 28 hari, sehingga perbedaan komposisi lipid ketiga diet tidak lagi menghasilkan perbedaan derajat hiperplasia yang terdeteksi bermakna. Hal ini sejalan dengan temuan Meguro et al. (2015), yang melaporkan bahwa dua jenis diet tinggi lemak dengan sumber lemak berbeda pada *Danio rerio* menghasilkan akumulasi lemak tubuh yang sama besar dan tidak berbeda signifikan satu sama lain, meskipun keduanya berbeda signifikan dibandingkan kelompok diet rendah lemak (31). Pola serupa juga ditemukan pada studi Smolińska et al. (2024), yang melaporkan bahwa pemberian diet tinggi lemak dengan konsentrasi berbeda pada kelompok-kelompok *Danio rerio* dewasa tidak menghasilkan perbedaan bermakna dalam derajat perubahan histopatologi hati dibandingkan satu sama lain (11).

Pengaruh Variasi Diet Lemak terhadap Fusi Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra Betina (*Danio rerio*)

Fusi lamela sekunder telah terjadi pada seluruh kelompok perlakuan, dengan rerata persentase fusi sebesar 57,13% (P1), 69,55% (P2), 68,69% (P3), dan 71,12% (P4), yang seluruhnya termasuk dalam kategori skor 3 atau derajat fusi berat (15). Hasil analisis statistik tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada fusi lamela sekunder di antara keempat kelompok perlakuan.

Secara histopatologi, fusi lamela merupakan perubahan regresif yang umumnya diidentifikasi dengan adanya kontak antar lamela sekunder yang berdekatan hingga hilangnya ruang interlamelar dan struktur lamela yang sulit dibedakan secara individual (6). Mekanisme utama yang mendorong terjadinya fusi lamela sekunder ialah hiperplasia epitel. Respons kompensatorik sel epitel berupa hiperplasia, apabila dipertahankan secara persisten dalam jangka panjang, akan menyebabkan penambahan jumlah sel epitel secara terus-menerus sehingga lapisan epitel menjadi semakin tebal. Penebalan ini mengisi ruang interlamelar dengan massa epitel yang terus berproliferasi, hingga akhirnya lamela-lamela yang berdekatan saling berkontak langsung dan membentuk struktur gabungan yang batasnya sulit dibedakan. Oleh karena itu, fusi lamela sekunder kerap dipandang sebagai kelanjutan fase lanjut dari hiperplasia yang berlangsung secara persisten (5).

Selain hiperplasia epitel, terdapat mekanisme lain yang dapat berkontribusi terhadap fusi lamela sekunder secara independen. Edema dengan ciri *epithelial lifting* yang juga teramati pada seluruh kelompok penelitian ini (**Gambar 1**) dapat menyebabkan pembengkakan lamela akibat akumulasi cairan

di bawah epitel, mendorong lamela-lamela berdekatan saling menekan dan menyatu tanpa memerlukan proliferasi sel yang signifikan. Peningkatan aktivitas dan hipertrofi sel mukus (sel goblet) turut dilaporkan berkontribusi terhadap fusi, di mana perubahan konsistensi mukus yang lebih kental berfungsi sebagai perekat yang menyatukan permukaan lamela berdekatan, bahkan pada kondisi di mana derajat proliferasi epitel murninya relatif rendah (32). Selain itu, infiltrasi sel inflamasi seperti leukosit dan neutrofil yang mengisi ruang interlamelar, disertai pembentukan kontak abnormal antarepitel lamela yang berdekatan, turut dilaporkan sebagai mekanisme independen penyebab fusi pada paparan iritan kronis (6). Namun penelitian ini memiliki keterbatasan berupa tidak melakukan penilaian histopatologi secara sistematis terhadap parameter lain seperti derajat edema, aneurisma, vakuolisasi, dan infiltrasi sel radang, sehingga keterlibatan mekanisme-mekanisme tersebut dalam berkontribusi terhadap fusi lamela pada penelitian ini dilandasi pada referensi literatur yang relevan dan belum dapat dikonfirmasi secara eksperimental.

Dalam konteks penelitian ini, tidak ditemukannya perbedaan yang bermakna pada fusi lamela sekunder di antara seluruh kelompok perlakuan dapat dijelaskan melalui data hiperplasia. Meskipun terdapat gradasi persentase hiperplasia yang bermakna secara statistik di antara kelompok perlakuan, namun seluruh kelompok telah berada dalam kategori skor 3 atau derajat hiperplasia berat dengan kriteria hiperplasia luas (difus) yang melibatkan lebih dari 50% area jaringan. Kondisi ini konsisten dengan pemahaman bahwa fusi merupakan perkembangan lanjutan yang muncul setelah proliferasi epitel lamela sekunder mencapai derajat yang cukup luas untuk membentuk kontak antarlamela yang berdekatan dan menghilangkan ruang interlamelar (33). Selain itu, keterbatasan ukuran sampel ($n=8$ per kelompok) diduga turut berkontribusi terhadap hasil ini. Ukuran sampel yang relatif kecil menurunkan kekuatan statistik uji, sehingga perbedaan yang secara biologis mungkin bermakna berpotensi tidak terdeteksi sebagai signifikan secara statistik.

Implikasi temuan penelitian ini terhadap manusia perlu dijelaskan secara hati-hati dengan mempertimbangkan adanya perbedaan mendasar antara insang ikan dan organ pada mamalia. Insang ikan zebra menjalankan fungsi pengaturan keseimbangan ion dan cairan tubuh (osmoregulasi) melalui sel ionosit yang mengatur transpor Na^+ , Cl^- , dan Ca^{2+} , yang pada manusia fungsi tersebut dilakukan oleh organ-organ seperti ginjal, paru-paru, dan epitel saluran reproduksi (34). Meskipun fungsinya serupa, insang dan organ-organ tersebut memiliki struktur dan asal pembentukan yang berbeda, sehingga perbandingan di antara keduanya hanya dapat dilakukan pada tingkat fungsi dan mekanisme molekuler, bukan pada tingkat morfologi atau struktur organ. Berdasarkan kesamaan fungsi inilah, perubahan histopatologi insang berupa hiperplasia dan fusi lamela sekunder yang ditemukan pada penelitian ini dapat diartikan

sebagai gambaran kerusakan epitel akibat beban metabolik dari diet tinggi lemak, yang secara konsep sejalan dengan kerusakan epitel yang terjadi pada organ metabolik manusia akibat kondisi serupa, sebagaimana ditunjukkan pada model ikan zebra untuk perlemakan hati yang jalur metabolisme lipidnya terbukti menyerupai jalur pada manusia (35).

Namun demikian, hasil penelitian ini tidak dapat langsung digeneralisasikan ke manusia, mengingat hanya sekitar 70% gen ikan zebra yang memiliki pasangan gen pada manusia, dan angka tersebut tidak menunjukkan bahwa fungsi, cara ekspresi, maupun struktur organnya sama (36). Oleh karena itu, temuan penelitian ini lebih tepat dipahami sebagai langkah awal yang memberikan penjelasan bahwa diet tinggi lemak dapat mengganggu organ yang berperan dalam osmoregulasi, termasuk kemungkinannya pada ginjal manusia, melalui jalur stres oksidatif dan inflamasi, namun tetap memerlukan penelitian lanjutan pada hewan yang lebih dekat kekerabatannya dengan manusia untuk dapat diterapkan secara klinis.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, pemberian diet campuran kuning telur dan pelet, diet *Artemia* salina, dan diet campuran kolesterol murni 4% dan pelet selama 28 hari terbukti meningkatkan derajat hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra betina (*Danio rerio*) secara signifikan dibandingkan diet pelet standar. Sementara itu, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan pada derajat fusi lamela sekunder insang antar seluruh kelompok perlakuan.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan ini, berikut beberapa saran yang dapat dilakukan untuk penelitian selanjutnya:

1. Menambah jumlah sampel jika dilakukan penelitian serupa, agar meningkatkan kekuatan statistik.
2. Mengukur kadar *oxysterol*, penanda stres oksidatif (MDA/ROS), maupun ekspresi jalur inflamasi NF- κ B, untuk memperkuat pembuktian mekanisme molekuler yang mendasari hiperplasia dan fusi lamela sekunder secara langsung.
3. Melakukan analisis kandungan keseluruhan nutrisi pakan perlakuan yang digunakan dalam penelitian, untuk memastikan akurasi kandungan nutrisi aktual yang dikonsumsi oleh ikan uji.
4. melakukan penilaian histopatologi yang lebih komprehensif dengan memasukkan parameter kerusakan insang tambahan seperti derajat edema (*epithelial lifting*), aneurisma, vakuolisasi, dan infiltrasi sel radang, sehingga kontribusi relatif masing-masing mekanisme terhadap terjadinya fusi lamela sekunder dapat dikonfirmasi secara eksperimental, bukan hanya didasarkan pada referensi literatur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diucapkan kepada kepada Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA) dan Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang telah mendanai penelitian dan kepada dosen pembimbing, staf laboratorium, dan tim penelitian ikan zebra betina yang telah membantu selama proses penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Safitri NH, Sabilu Y, Lestari H. ANALISIS FAKTOR PERILAKU SEDENTARI, PEMESANAN MAKANAN ONLINE DAN FAKTOR GENETIK TERHADAP KEJADIAN OBESITAS DI WILAYAH KERJA BLUD UPTD PUSKESMAS BENUA-BENUA KECAMATAN KENDARI BARAT. *Indonesian Journal of Health Science*. 2025 Apr 25;5(3):441–54. doi:<https://doi.org/10.54957/ijhs.v5i3.1502>
2. Zang L, Maddison LA, Chen W. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Aug 20;6(91). doi:10.3389/fcell.2018.00091
3. Chen X, Liu S, Ding Q, Teame T, Yang Y, Ran C, et al. Research advances in the structure, function, and regulation of the gill barrier in teleost fish. *Water Biology and Security*. 2023 Apr 1;2(2):100139. doi:10.1016/J.WATBS.2023.100139
4. Chowdhury S, Saikia SK. Oxidative Stress in Fish: A Review. *Journal of Scientific Research*. 2020 Jan 1;12(1):145–60. doi:10.3329/JSR.V12I1.41716
5. Rohani MF. Pesticides toxicity in fish: Histopathological and hemato-biochemical aspects – A review. *Emerg Contam*. 2023 Sep 1;9(3):100234. doi:10.1016/J.EMCON.2023.100234
6. Gilmour KM, Turko AJ. Effects of structural remodelling on gill physiology. *J Comp Physiol B*. 2024 Oct 1;194(5):595–609. doi:10.1007/S00360-024-01558-0 PubMed PMID: 38758304.
7. Marinović Z, Miljanović B, Urbányi B, Lujčić J. Gill Histopathology as a Biomarker for Discriminating Seasonal Variations in Water Quality. *Applied Sciences* 2021, Vol 11, Page 9504. 2021 Oct 13;11(20):9504. doi:10.3390/AP11209504
8. Liu Z, Xiao Y, Xie J, Zhang H, Huang Q, Monroig Ó, et al. Cholesterol Accumulation Caused Oxidative Stress Associated With Impaired Antioxidant Capability and Mitochondrial Function in the Liver of Nile Tilapia. *Aquac Nutr*. 2025 Jan 1;2025(1):7643962. doi:10.1155/ANU/7643962
9. Ramena Y, Kurapati RB, Bosteels T, Ramena G. Artemia Enrichment Strategies: A Comprehensive Review of Nutritional Enhancements With Emphasis on Fatty Acid Profiles in Aquatic Species. *Rev Aquac*. 2025 Sep 1;17(4):e70080. doi:10.1111/RAQ.70080;WEBSITE:WEBSITE:PERICLES;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:17535131;WGROUPE:STRING:PUBLICATION
10. Silva MGFR, Luchiari AC, Medeiros I, de Souza AM, Serquiz AC, Martins FF, et al. Evaluation of the Effects of Diet-Induced Obesity in Zebrafish (*Danio rerio*): A Comparative Study. *Nutrients*. 2024 Oct 7;16(19). doi:10.3390/nu16193398 PubMed PMID: 39408365.
11. Smolińska K, Sobczyński J, Szopa A, Wnorowski A, Tomaszewska E, Muszyński S, et al. Innovative high fat diet establishes a novel zebrafish model for the study of visceral obesity. *Sci Rep*. 2024 Dec 1;14(1). doi:10.1038/s41598-024-53695-9 PubMed PMID: 38321127.
12. Jin Y, Kozan D, Young ED, Hensley MR, Shen MC, Wen J, et al. A high-cholesterol zebrafish diet promotes hypercholesterolemia and fasting-associated liver steatosis. *J Lipid Res*. 2024 Oct 1;65(10). doi:10.1016/j.jlr.2024.100637 PubMed PMID: 39218217.
13. Karimah U. Pengadaan Awal Fasilitas Pemeliharaan dan Upaya Perolehan Filial 1 (F1) Ikan Zebra (*Danio rerio*) sebagai Hewan Laboratorium. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*. 2021 Jun 30;9(1):142. doi:10.33394/bjib.v9i1.3750
14. Copper JE, Budgeon LR, Foutz CA, van Rossum DB, Vanselow DJ, Hubley MJ, et al. Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. 2018 Jun 1;208:38–46. doi:10.1016/j.cbpc.2017.11.003 PubMed PMID: 29157956.
15. Mitchell SO, Baxter EJ, Holland C, Rodger HD. Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International*. 2012 Sep;20(5):813–25. doi:10.1007/s10499-012-9504-x

16. Loganathan K, Tennyson S, Arivoli S. Triazophos toxicity induced histological abnormalities in *Heteropneustes fossilis* Bloch 1794 (Siluriformes: Heteropneustidae) organs and assessment of recovery response. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 2024 Jun 28;85(1). doi:10.1186/s41936-024-00373-x
17. Teame T, Zhang Z, Ran C, Zhang H, Yang Y, Ding Q, et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*. 2019 Jun 25;9(3):68–77. doi:10.1093/AF/VFZ020 PubMed PMID: 32002264.
18. Sun SX, Wu JL, Lv HB, Zhang HY, Zhang J, Limbu SM, et al. Environmental estrogen exposure converts lipid metabolism in male fish to a female pattern mediated by AMPK and mTOR signaling pathways. *J Hazard Mater*. 2020 Jul 15;394:122537. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2020.122537 PubMed PMID: 32203715.
19. Fowler LA, Powers AD, Williams MB, Davis JL, Barry RJ, D'Abramo LR, et al. The effects of dietary saturated fat source on weight gain and adiposity are influenced by both sex and total dietary lipid intake in zebrafish. *PLoS One*. 2021 Oct 1;16(10):e0257914. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0257914 PubMed PMID: 34679092.
20. Li X, Ge G, Song G, Li Q, Cui Z. Effects of Nutritionally Induced Obesity on Metabolic Pathways of Zebrafish. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 1;24(3). doi:10.3390/ijms24031850 PubMed PMID: 36768175.
21. Salehpour A, Rezaei M, Khoradmehr A, Tahamtani Y, Tamadon A. Which Hyperglycemic Model of Zebrafish (*Danio rerio*) Suits My Type 2 Diabetes Mellitus Research? A Scoring System for Available Methods. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Mar 15;9:652061. doi:10.3389/FCELL.2021.652061 PubMed PMID: 33791308.
22. Ma W, Zeng W, Zhang D, Zhou Y, Huang Y, Hong Y. Oxidative Stress in Aquaculture: Pathogenic Mechanisms and Preventive Strategies in Farmed Aquatic Animals. *Current Issues in Molecular Biology*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025. doi:10.3390/cimb47110873
23. Chen G, Liu Y, Li X, Gao P, Hu J, Sun P, et al. Transcriptomic and Physiological Responses Reveal a Time-Associated Multi-Organ Injury Pattern in European Perch (*Perca fluviatilis*) Under Acute Alkaline Stress. *Animals*. 2025 Dec 1;15(24):3621. doi:10.3390/ANI15243621/S1
24. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Pathologic Basis of Disease* [Internet]. 2020 [cited 2026 Jul 28];1205. Available from: https://books.google.com/books/about/Robbins_Cotran_Pathologic_Basis_of_Disea.html?id=7WnnDwAAQBAJ
25. Smok C, Rojas M, Aguila MB, del Sol M. Regenerative responses and structural plasticity of gills in Atlantic salmon. *Front Mar Sci*. 2025 Nov 3;12:1682427. doi:10.3389/FMARS.2025.1682427/TEXT
26. Pan W, Godoy RS, Cook DP, Scott AL, Nurse CA, Jonz MG. Single-cell transcriptomic analysis of neuroepithelial cells and other cell types of the gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to hypoxia. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1). doi:10.1038/s41598-022-13693-1 PubMed PMID: 35710785.
27. Park JS, Gutkowski J, Castranova D, Kenton M, Sur A, Martinez-Aceves C, et al. Specialized gas-exchange endothelium of the zebrafish gill [Internet]. 2025. Available from: <http://bio-rxiv.org/lookup/doi/10.64898/2025.11.30.690480> doi:10.64898/2025.11.30.690480
28. Lee J, Yun JS, Ko SH. Advanced Glycation End Products and Their Effect on Vascular Complications in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 2022 Aug 1;14(15):3086. doi:10.3390/NU14153086/S1 PubMed PMID: 35956261.
29. Zhong L, Liu S, Zuo FY, Geng Y, Ouyang P, Chen D, et al. The IL17 signaling pathway: A potential signaling pathway mediating gill hyperplasia and inflammation under ammonia nitrogen stress was identified by multi-omics analysis. *Science of the Total Environment*. 2023 Apr 1;867. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.161581 PubMed PMID: 36638999.
30. Šimkovic M, Träuble B. Robustness of statistical methods when measure is affected by ceiling and/or floor effect. *PLoS One*. 2019 Aug 1;14(8):e0220889. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0220889 PubMed PMID: 31425561.
31. Meguro S, Hasumura T, Hase T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. *PLoS One*. 2015 Mar 18;10(3). doi:10.1371/journal.pone.0120142 PubMed PMID: 25785691.
32. Pathinathan P. Gill Histopathology: Insights into Structural Alterations and Environmental

- Impacts [Internet]. 2025 Mar;(3):367–9. Available from: www.vigyanvarta.com
33. Chang YT, Yang JL, Chang JS, Yang YW. Physiological status and functional anatomy of zebra fish (*Danio rerio*) exposed to various levels of Ga^{3+} . *Toxicol Ind Health*. 2020 Mar 1;36(3):153–60.
doi:10.1177/0748233720915109;WEB-SITE:WEBSITE:SAGE;JOURNAL:JOURNAL:TIHA;WGROU:STRING:PUBLICATION PubMed PMID: 32255739.
 34. Peloggia J, Lush ME, Tsai YY, Wood C, Piotrowski T. Environmental and molecular control of tissue-specific ionocyte differentiation in zebrafish. *Development (Cambridge)*. 2024 Oct 1;151(20).
doi:10.1242/DEV.202809/362451 PubMed PMID: 39324331.
 35. Li X, Zhou L, Zheng Y, He T, Guo H, Li J, et al. Establishment of a non-alcoholic fatty liver disease model by high fat diet in adult zebrafish. *Animal Model Exp Med*. 2024 Dec 1;7(6):904–13.
doi:10.1002/AME2.12309;CTYPE:STRING:JOURNAL PubMed PMID: 36942644.
 36. Shehwana H, Konu O. Comparative Transcriptomics Between Zebrafish and Mammals: A Roadmap for Discovery of Conserved and Unique Signaling Pathways in Physiology and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Feb 1;7(5).
doi:10.3389/fcell.2019.00005