

Ekspresi gen aromatase pada pengarahannya diferensiasi kelamin ikan nila (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758) menggunakan madu

[Aromatase gene expression of sex reversal Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758) using honey]

Eny Heriyati¹, Alimuddin², Harton Arfah², Agus Oman Sudrajat²

¹ Sekolah Tinggi Pertanian Kutai Timur.
Jl. Soekarno Hatta No.2. Kalimantan Timur 57611.

Surel: eny_heriyati@yahoo.com

² Departemen Budi daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB Bogor 16680.

Surel: alimuddin_alsani@yahoo.com

Diterima: 23 Maret 2014; Disetujui: 20 Januari 2015

Abstrak

Budi daya ikan nila dengan populasi jantan semua (monoseks) lebih memberikan keuntungan karena laju pertumbuhannya lebih cepat dan dapat mencegah pemijahan liar. Teknik pengarahannya diferensiasi kelamin (*sex reversal*) digunakan untuk mengarahkan pembentukan jenis kelamin pada budi daya ikan. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh perendaman larva ikan nila menggunakan tiga sumber madu berbeda terhadap persentase ikan jantan dan ekspresi gen aromatase. Pada percobaan satu, 30 larva ikan nila berumur 12 hari setelah menetas direndam menggunakan madu hutan, madu ternak dan madu bakau, dengan dosis 10 ml L⁻¹ air selama 10 jam. Ikan dipelihara dalam kondisi yang sama selama dua bulan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase ikan jantan tidak berbeda nyata antar perlakuan madu ($p > 0,05$), tetapi semuanya berbeda nyata dengan kontrol ($p < 0,05$). Pada percobaan kedua, larva ikan nila direndam dalam air mengandung dua bahan bioaktif madu, yakni *chrysin* dan kalium dengan dosis masing-masing 20 mg L⁻¹ dan 0,026 g L⁻¹. Ekspresi gen aromatase tipe gonad (aroma-g) dan tipe otak (aroma-o) dianalisis menggunakan metode RT-PCR. Sampel jaringan diambil pada waktu 1, 6, 12, 24, dan 48 jam pascaperlakuan madu, *chrysin*, dan kalium, serta setelah ikan berumur dua bulan. Ukuran fragmen DNA aromatase pada gonad betina sekitar 200 bp. Perendaman *chrysin* dan kalium meningkatkan persentase ikan jantan ($p < 0,1$). Analisis RT-PCR menunjukkan bahwa madu, *chrysin*, dan kalium dapat menekan ekspresi gen aroma-g pada jam ke-12 pascaperlakuan. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa madu, *chrysin* dan kalium dapat digunakan untuk pengarahannya diferensiasi ikan nila, dan mekanismenya seperti penghambat aromatase.

Kata kunci: diferensiasi kelamin, gen aromatase, ikan nila, madu

Abstract

In tilapia aquaculture, all male populations are preferred because they achieve higher growth rates and prevent uncontrolled reproduction. Sex reversal techniques are largely used for the control of sex in fish farming and in fundamental studies on sex determinism mechanisms. The study was conducted to determine the effect of immersion Nile tilapia larvae in water containing different honey source on male percentage and aromatase gene expression. In experiment I, a total of 30 tilapia larvae at 12 days post hatch were immersed in water containing honey derived from the forest, cultured and mangrove bees, at a dose of 10 ml L⁻¹ for 10 hours. Fish were maintained in the same condition for two months. The results showed that percentage of male fish was similar among honey treatments ($p > 0.05$), and they were significantly different with the control ($p < 0.05$). In experiment II, fish were immersed in two bioactive compounds of honey, namely *chrysin* and potassium solution in a dose of 20 mg L⁻¹ and 0.026 g L⁻¹, respectively, to verify the bioactive affects sex differentiation. Aroma-g expression was analyzed by RT-PCR method. Tissue was collected at 1, 6, 12, 24 and 48 hours after immersion, and 2-month-old fish. Size fragment DNA aroma-g of female 200 bp. *Chrysin* and potassium immersion increased male percentage ($p < 0.1$), this indicated that both materials were involved in Nile tilapia sex differentiation. RT-PCR analysis showed that honey, *chrysin* and potassium down-regulated aroma-g expression at 12 hours post immersion. Thus, honey can be used for sex reverse of Nile tilapia, and the mechanism is most likely as aromatase inhibitors.

Keywords: aromatase, honey, Nile tilapia, sex reversal

Pendahuluan

Ikan nila jantan memiliki laju pertumbuhan sekitar dua kali lebih cepat dibandingkan de-

ngan ikan betina, sehingga tingkat produksi, dan potensi keuntungan budi daya ikan nila jantan semua (monoseks) adalah lebih tinggi. Salah satu cara untuk memproduksi populasi monoseks jan-

✉ Penulis korespondensi

Alamat surel: alimuddin_alsani@yahoo.com

tan adalah dengan teknologi pengarah diferensiasi kelamin (*sex reversal*), yakni suatu teknologi yang mengarahkan diferensiasi kelamin menjadi jantan, dan dilakukan pada saat gonad ikan belum terdiferensiasi. Cara yang umum dilakukan untuk memperoleh ikan monoseks adalah menggunakan hormon steroid 17 α -metiltestosteron (MT) dan penghambat aromatase (*aromatase inhibitor*, AI) seperti fadrozole. Akan tetapi penggunaan hormon MT diduga dapat bersifat karsinogenik pada manusia dan AI tidak dijual bebas di pasaran, sehingga untuk mengatasinya diperlukan bahan alternatif lain yang aman dan mudah diperoleh. Madu merupakan bahan alami mengandung flavonoid *chrysin* yang diduga dapat berfungsi sebagai penghambat kerja enzim aromatase. Madu bersifat ramah lingkungan dan kandungan mineralnya tinggi, terutama kalium. Kalium dalam madu diduga berfungsi sebagai pengarah diferensiasi kelamin ikan melalui modulasi peredaran testosteron, dan pengendalian tindakan androgen.

Penggunaan madu untuk mengarahkan diferensiasi kelamin telah dilakukan, baik melalui pakan maupun perendaman. Syaifuddin (2004) telah melakukannya melalui pakan buatan untuk larva ikan nila GIFT dengan dosis 200 mL kg⁻¹ pakan, dan menghasilkan ikan jantan sebanyak 93,33%, sementara pada kontrol 57,78%. Soelityowati *et al.* (2007) melakukan perendaman menggunakan madu, terhadap induk ikan gapi (*Poecillia reticulata*) dan menghasilkan jantan sebesar 59,5%, sedangkan pada kontrol 24,3%. Utomo (2008) melakukan perendaman menggunakan larutan madu terhadap larva ikan gapi menghasilkan jantan 56,68%, sedangkan pada kontrol 47,16%. Mukti *et al.* (2008) memberikan madu melalui pakan pada induk lobster air tawar *red claw* (*Cherax quadricarinatus*) menghasilkan jantan sebesar 60,35%, sedangkan pada kontrol

50,56%. Penggunaan madu melalui pakan terhadap ikan nila dapat menghasilkan nila jantan yang cukup signifikan (Syaifuddin 2004). Namun demikian, hal ini kurang ekonomis karena dosis madu yang digunakan relatif tinggi (200 mL kg⁻¹ pakan), sehingga perlu dilakukan uji penggunaan madu melalui metode massal lainnya, yakni perendaman.

Sebagian besar gen pembentuk jenis kelamin pada ikan hampir sama dengan gen *Sry* pada mamalia dan sudah diidentifikasi pada sebagian ikan, tetapi tidak demikian pada ikan nila (Kikuchi & Hamaguchi 2013). Pada spesies ini ekspresi gen spesifik jenis kelamin yang sangat potensial dalam pengarah jenis kelamin terdapat di gonad (Ijiri *et al.* 2008) dan di otak (Poonlaphdech *et al.* 2011). Regulasi diferensiasi kelamin di dalam tubuh ikan dapat dilihat dari level aromatase. Terdapat dua jenis aromatase, yaitu aromatase tipe satu (atau disebut tipe gonad) dan tipe dua (tipe otak). Aktivitas enzim aromatase berkorelasi dengan struktur gonad, yaitu larva dengan aktivitas aromatase rendah akan mengarah pada terbentuknya testis, sedangkan aktivitas aromatase yang tinggi akan mengarahkan terbentuknya ovari (Sever *et al.* 1999).

Dalam penelitian ini digunakan tiga jenis madu, yaitu madu hutan (madu yang diperoleh dari beberapa macam nektar bunga dari lebah liar di hutan), madu ternak (madu yang diperoleh dari nektar tanaman tertentu oleh lebah yang dibudidayakan), dan madu bakau (madu dari nektar tanaman bakau oleh lebah di daerah hutan bakau). Pemilihan tiga jenis madu ini berdasarkan cara madu yang diperoleh dari perbedaan nektar bunga. Analisis kandungan madu, dan pemberian *chrysin* dan kalium juga berpotensi besar dapat menjelaskan perbedaan aktivitas madu uji, dan bahan yang berperan dalam pengarah diferensiasi kelamin ikan nila. Penelitian ini bertujuan

untuk mengevaluasi pengaruh perendaman larva ikan nila menggunakan tiga sumber madu berbeda terhadap pengaruh diferensiasi kelamin ikan nila, dan menguji bahan aktif dalam madu yaitu *chrysin* dan kalium yang diduga berperan penting dalam mengarahkan diferensiasi kelamin menjadi jantan, serta untuk melihat perlakuan perendaman madu, *chrysin* dan kalium terhadap penekanan ekspresi gen aromatase.

Bahan dan metode

Penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga Juni 2012. Metode yang digunakan adalah eksperimen yang terdiri atas dua percobaan. Percobaan pertama untuk mengevaluasi respon perlakuan perendaman larva ikan nila menggunakan madu. Percobaan ke dua perendaman larva menggunakan air mengandung dua bahan bioaktif madu, yaitu *chrysin* dan kalium. Selanjutnya menganalisis ekspresi gen aromatase yang terdapat pada otak dan gonad ikan pascaperendaman, serta mengidentifikasi jenis kelamin ikan.

Madu yang digunakan terlebih dahulu dianalisis kandungannya, yaitu analisis proksimat dilakukan di Laboratorium Nutrisi Ikan, Departemen Budi daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor (IPB). Pengukuran kadar kalium menggunakan alat *atomic absorption spectrophotometer* dilakukan di Laboratorium Jasa Analisis Fakultas Teknologi Pertanian (Fateta) IPB, pH madu diukur di Laboratorium Instrumen Departement Teknologi Industri Pertanian-Fateta IPB, dan kadar total flavonoid di Laboratorium Biofarmaka Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat IPB.

Percobaan I

Penelitian satu dilakukan untuk mengevaluasi respons ikan nila terhadap perendaman dalam madu dengan sumber berbeda. Penelitian ini dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap

(RAL) dengan empat perlakuan, dan masing-masing dengan tiga ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah perbedaan sumber madu, yaitu madu hutan, madu ternak, madu bakau, dan kontrol (perlakuan tanpa pemberian madu). Madu hutan diperoleh dari hutan Sono di Gunung Kidul, madu ternak diperoleh dari peternakan lebah di Gunung Kidul, dan madu bakau dari hutan bakau Tanjung Jabung, Jambi.

Dosis madu yang digunakan (10 mL L^{-1} air) dan lama perendaman (10 jam) berdasarkan penelitian pendahuluan. Larutan madu dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 10 mL madu dengan 1 liter air, kemudian dihomogenkan dengan cara pengadukan dan diaerasi. Larva ikan nila yang digunakan adalah varietas nirwana diperoleh dari Balai Benih Perikanan Budidaya Air Tawar Sukabumi. Larva ikan yang telah diberi perendaman, dipelihara dalam akuarium dengan volume air 30 L dan kepadatan 1 ekor L^{-1} sampai ikan berumur satu bulan, dan diberi pakan berupa cacing sutera (*Tubifex* sp.) secara *ad libitum*. Pemeliharaan ikan dilanjutkan di dalam hapa $1 \times 1 \times 1 \text{ m}^3$ yang dipasang di kolam beton berukuran $20 \times 10 \times 1,5 \text{ m}^3$ sampai ikan berumur dua bulan. Ikan diberi pakan komersial (kadar protein 38%) secara *at satiation* dengan frekuensi tiga kali sehari.

Percobaan II

Percobaan dua dilakukan untuk mengevaluasi respons ikan nila terhadap *chrysin* dan kalium. Percobaan dua juga menggunakan RAL dengan tiga perlakuan, dan tiga ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah perendaman dengan *chrysin* (*Phytolacca*, USA), kalium (K_2HPO_4), dan kontrol. Perendaman menggunakan kalium dilakukan sesuai dengan dosis hasil analisis kandungan kalium dalam madu yang digunakan dalam percobaan I, yaitu $0,026 \text{ g L}^{-1}$ dengan lama perendaman 10 jam. Pada perendaman menggu-

nakan *chrysin*, dosis yang digunakan adalah 20 mg L⁻¹ berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Dabrowski *et al.* (2005) selama 10 jam. Sebelum dilakukan perendaman menggunakan dosis dan lama waktu tersebut, dilakukan uji pendahuluan untuk lama waktu perendaman 10 jam. *Chrysin* dilarutkan dalam dimetil sulfoksida 1%. Metode pemeliharaan ikan pasca-perendaman sama dengan yang dilakukan pada percobaan I.

Analisis ekspresi gen aromatase dan identifikasi jenis kelamin

Identifikasi jenis kelamin dilakukan dengan menganalisis gonad ikan nila setelah berumur dua bulan menggunakan metode asetokarmin (Guerrero & Shelton 1974). Ekspresi gen aromatase dianalisis menggunakan metode *Reverse Transcriptase (RT)- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Sampel jaringan diambil pada waktu 1, 6, 12, 24, dan 48 jam pascaperlakuan madu, *chrysin*, dan kalium, serta setelah ikan berumur dua bulan. Pada fase larva, ribonukleat acid (RNA) total diekstraksi dari setengah bagian depan badan 6 ekor larva, sedangkan pada ikan berumur dua bulan adalah otak dan gonad. RNA total diekstraksi menggunakan Isogen (Nippon Gen, Japan) sesuai dengan prosedur dalam manual. Pelet RNA dilarutkan dengan 30 µL diethylpyrocarbonate (DEPC) 0,1%. Konsentrasi RNA total hasil ekstraksi diukur menggunakan RNA/DNA calculator (GeneQuant) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

Sintesis cDNA dari RNA total dilakukan menggunakan kit *ready-to-go you-prime first strand beads*, FSRMB (GE Healthcare) dengan prosedur sesuai dengan manual. Sebanyak 3 µg RNA total dilarutkan dalam 30 µL DEPC, diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit, dan kemudian disimpan di atas es (*on ice*). Sampel RNA dipindahkan ke dalam tabung berisi kit

FSRMB, dan ditambahkan 3 µL primer 'dT3'RA CE-VECT' (5'GTAATACGACTCACTATAGG GCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') dengan konsentrasi 1 µg 3 µL⁻¹. Larutan dihomogenkan, dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. cDNA yang terbentuk ditambahkan 50 µL *steril distillation water*, dan disimpan dalam *freezer* -20°C hingga akan digunakan.

Primer didesain berdasarkan sekuen gen aromatase tipe gonad (aroma-g) dan otak (aroma-o) ikan mujair (no akses: AF135850 dan AF135851). Primer tersebut adalah tiArm1-F: 5'-ATG GATCTGATCTCTGCTTGT-3' dan tiArm1-R: 5'-CAAACCAAACAGAAAGAAGG-3' untuk aromatase tipe gonad, dan tiArm2-F: 5'-ATG CTCCGGTAGAGGAGCTC-3' dan tiArm2-R: 5'-CTCTCCGTTTATCCA-CCG-3' untuk tipe otak. Kondisi PCR yang digunakan untuk amplifikasi aroma-g adalah pre-denaturasi 94°C selama 3 menit, 35 siklus pada denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 54°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 30 detik, serta ekstensi akhir 72°C selama 3 menit. Kondisi PCR yang digunakan untuk amplifikasi aroma-o adalah pre-denaturasi 94°C selama 3 menit, 35 siklus pada denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 59°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 30 detik, serta ekstensi akhir 72°C selama 3 menit. Hasil PCR diseparasi menggunakan elektroforesis dengan gel agarosa 1%. DNA divisualisasi dengan pewarna etidium bromida menggunakan cahaya ultraviolet.

Parameter uji dan analisis statistik

Parameter yang diamati sebagai berikut :

a. Nisbah ikan jantan

$$= \frac{\text{Jumlah ikan berkelamin jantan}}{\text{Jumlah ikan yang diamati}} \times 100\%$$

b. Laju pertumbuhan bobot spesifik (LPS)

$$LPS(\%) = \left[\sqrt{\frac{W_t}{W_o}} - 1 \right] \times 100\%$$

W_t= bobot rata-rata pada saat t (g), W_o= bobot rata-rata pada saat tebar awal (g), t= lama waktu pemeliharaan.

c. Kelangsungan Hidup (KH)

$$= \frac{\text{Ikan yang hidup di akhir penelitian}}{\text{Ikan awal perlakuan}} \times 100\%$$

d. Biomassa ikan

= bobot semua ikan yang hidup di akhir penelitian pada setiap perlakuan

Data persentase kelamin ikan jantan, laju pertumbuhan bobot spesifik, tingkat kelangsungan hidup dan biomassa ikan dianalisis menggunakan metode sidik ragam dengan bantuan program SPSS versi 16, dengan diuji lanjut Duncan. Kadar kandungan madu, dan tingkat ekspresi gen aromatisasi dianalisis secara deskriptif.

Parameter kualitas air yang diukur adalah pH menggunakan pH meter, dan suhu menggunakan termometer. Pengukuran kualitas air dilakukan pada awal perlakuan, saat pemeliharaan ikan di akuarium, serta pada saat pemeliharaan ikan di hapa.

Hasil

Kandungan biokimiawi madu dan respons ikan nila

Hasil analisis kandungan madu menunjukkan bahwa kadar flavonoid dan kalium tertinggi terdapat pada madu bakau, kemudian diikuti oleh madu hutan, dan madu ternak (Tabel 1). Madu bakau juga mempunyai kandungan mineral dan protein yang relatif tinggi dibandingkan madu hutan, dan madu ternak.

Perendaman larva ikan nila menggunakan madu bakau menghasilkan jumlah jantan 100%, madu hutan 98,77%, dan madu ternak 97,70% (Tabel 2, $p>0,05$), serta hasil tersebut lebih tinggi daripada kontrol ($p<0,05$). Perlakuan perendaman madu meningkatkan nisbah kelamin jantan sebesar 17-19% (rata-rata 18%) dibandingkan dengan kontrol.

Seperti ditunjukkan pada Tabel 3, persentase ikan nila jantan pada perlakuan perendaman *chrysin* (81,16%) adalah sama ($p>0,1$) dengan perendaman kalium (80,64%). Hasil tersebut sekitar 17% lebih tinggi daripada kontrol ($p<0,1$).

Tabel 1. Kandungan proksimat (bobot kering), mineral, total flavonoid, kalium dan pH madu hutan, madu ternak dan madu bakau

Kandungan bahan	Madu hutan	Madu ternak	Madu bakau
Karbohidrat (%)	98,39	97,94	96,04
Lemak (%)	0,22	0,23	0,47
Protein (%)	1,00	0,86	2,40
Mineral (%)	0,39	0,97	1,16
Total flavonoid (%)	0,99	0,79	1,52
Kalium (%)	0,33	0,12	0,35
pH	3,40	3,48	3,71

Tabel 2. Nisbah ikan jantan, laju pertumbuhan bobot spesifik (LPS), kelangsungan hidup (KH), dan biomassa ikan hasil perlakuan madu dengan sumber berbeda

Perlakuan	Nisbah ikan jantan	LPS	KH	Biomassa
Kontrol	80,86 ^a ±1,62	10,47 ^a ±0,7	86,67 ^a ±3,33	390,56 ^a ±30,84
Madu ternak	97,70 ^b ±1,15	10,41 ^a ±0,7	93,33 ^a ±3,85	405,50 ^a ±18,01
Madu Hutan	98,76 ^b ±1,23	10,44 ^a ±0,9	90,00 ^a ±1,92	400,57 ^a ±25,47
Madu Bakau	100,00 ^b ±0,00	10,49 ^a ±0,1	87,78 ^a ±4,00	400,57 ^a ±25,47

Keterangan: Huruf tika atas berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p<0,05$). Nilai ditampilkan dalam bentuk rerata ± simpangan baku. Ikan dipelihara sampai berumur 2 bulan.

Tabel 3. Nisbah ikan nila jantan, laju pertumbuhan spesifik (LPS), kelangsungan hidup (KH) dan biomassa ikan yang telah diberi perendaman *chrysin* dan kalium

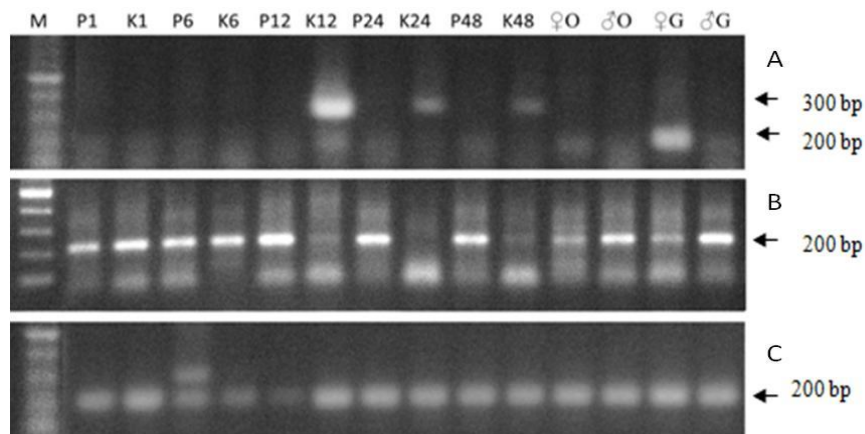
Perlakuan	Nisbah ikan jantan	LPS	KH	Biomassa
Kontrol	66,84 ^a ±3,90	11,03 ^a ±0,08	70,00 ^a ±1,92	235,99 ^a ±10,81
<i>Chrysin</i>	81,16 ^b ±3,38	11,70 ^b ±0,05	42,22 ^b ±4,01	213,66 ^a ±25,90
Kalium	80,64 ^b ±5,61	11,42 ^c ±0,03	44,44 ^b ±5,09	189,12 ^a ±14,90

Keterangan: Huruf tika atas berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,1$). Nilai ditampilkan dalam bentuk rerata $\pm$ simpangan baku. Ikan dipelihara sampai berumur 2 bulan.

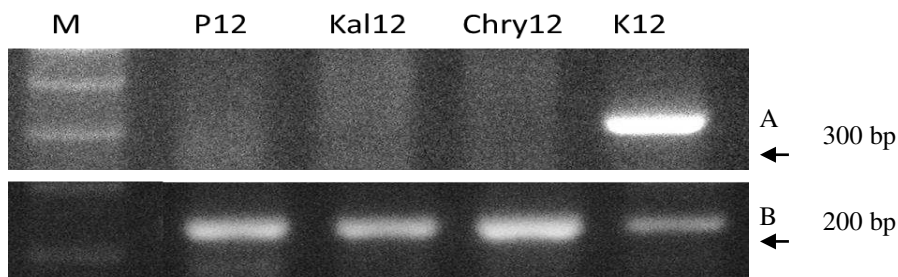
Ekspresi gen aromatase

Ekspresi gen aroma-g dan aroma-otak berbeda (Gambar 1). Ekspresi gen aroma-g terdeteksi pada jam ke-12, 24, dan 48 pada ikan kontrol, sedangkan pada ikan perlakuan tidak terdeteksi. Hal ini menunjukkan bahwa pada jam ke-12 pascaperendaman, madu berhasil menekan ekspresi aroma-g. Sementara itu, ekspresi gen aroma-o terlihat pada semua titik pada perlakuan, sedangkan pada kontrol ekspresi gen tidak terdeteksi pa-

da jam ke-12, 24, dan 48 (Gambar 1). Pada perlakuan *chrysin* dan kalium juga terlihat penurunan ekspresi aroma-g pada jam ke-12 (Gambar 2) sama halnya dengan pascaperendaman menggunakan madu. Selanjutnya, tingkat ekspresi aroma-g pada K12, K24 dan K48 terlihat berbeda, yaitu level ekspresi gen menurun dari K12 hingga K48, sedangkan level ekspresi gen β -aktin relatif sama (Gambar 1).



Gambar 1. Ekspresi gen aromatase tipe gonad (A), tipe otak (B), dan β -aktin (C). M= marka DNA; P1-P48: Perlakuan madu pada jam ke-1 sampai 48 pascaperendaman; K1-K48: Kontrol; ♂O, ♀O = sampel otak jantan dan betina; ♂G, ♀G = sampel gonad jantan dan betina; tanda panah menunjukkan target amplifikasi.



Gambar 2. Ekspresi gen aromatase tipe gonad (A) pada perlakuan madu (P12), kalium (Kal12), *chrysin* (Chry12), dan kontrol pada jam ke-12 (K12) setelah perendaman. β -aktin (B). M= marka DNA. Tanda panah menunjukkan target amplifikasi.

Tabel 4. Kualitas air pada perlakuan menggunakan madu

Pemeliharaan ikan	Perlakuan	pH	Suhu (°C)
Saat perendaman	Kontrol	7,8	28
	Madu ternak	7,0	28
	Madu hutan	6,9	28
	Madu bakau	6,0	28
Saat di akuarium	Kontrol	7,2	28
	Madu ternak	6,8	28
	Madu hutan	7,3	28
	Madu bakau	6,9	28
Saat di hapa	Kontrol	6,0	27
	Madu ternak	6,0	27
	Madu hutan	6,0	27
	Madu bakau	6,0	27

Tabel 5. Nilai pH dan suhu air pada perlakuan *chrysin* dan kalium

Pemeliharaan ikan	Perlakuan	pH	Suhu °C
Saat perendaman	Kontrol	7,8	28
	<i>Chrysin</i>	7,7	28
	Kalium	6,9	28
Saat di akuarium	Kontrol	5,9	28
	<i>Chrysin</i>	5,9	28
	Kalium	5,9	28
Saat di hapa	Kontrol	6,5	28
	<i>Chrysin</i>	6,5	28
	Kalium	6,5	28

Kualitas air

Nilai pH dan suhu air selama perlakuan dan pemeliharaan semua ikan perlakuan dan kontrol berada pada kisaran 27-28°C dan pH 5,9-7,8 (Tabel 4 dan 5).

Pembahasan

Madu merupakan salah satu bahan alternatif untuk percobaan pengarahkan kelamin yang mengandung beberapa macam mineral, diantaranya kalium dan juga mengandung beberapa jenis flavonoid seperti *chrysin*. Hasil analisis kandungan madu menunjukkan bahwa kadar total flavonoid dan kalium tertinggi terdapat pada madu bakau, diikuti berturut-turut madu hutan dan madu ternak.

Ferreres *et al.* (1991) mengatakan bahwa madu mengandung 16 flavonoid, diantaranya adalah *chrysin* yang besarnya 13% dari total flavonoid. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan *chrysin* dalam madu bakau juga relatif paling tinggi dibanding dua madu lainnya dan berdampak terhadap hasil persentase jantan (100%). Namun demikian secara statistik perlakuan ketiga sumber madu menunjukkan pengaruh yang sama terhadap nisbah jenis kelamin jantan. Hal ini mengindikasikan bahwa kadar kalium dan total flavonoid minimal seperti pada madu ternak dapat mengarahkan diferensiasi kelamin ikan nila, dengan peningkatan nisbah kelamin jantan sebesar 17-19% (rata-rata 18%) dibandingkan dengan kontrol.

Pengaruh perendaman madu terhadap peningkatan jenis kelamin jantan, diduga pada saat perendaman larva, madu masuk ke dalam tubuh, kemudian masuk ke peredaran darah dan mencapai organ target, dikarenakan larva masih bersifat semipermeabel sehingga air mengandung madu secara difusi masuk ke dalam tubuh larva. Kandungan kalium dalam madu yang masuk ke dalam larva dapat mengubah lemak menjadi pregnenolon, yang kemudian akan mengubah estrogen menjadi progesteron. Dengan berubahnya estrogen menjadi progesteron, maka ikan yang awalnya akan menjadi betina kemudian diarahkan menjadi ikan jantan (Syaifuddin 2004). Madu juga mengandung *chrysin* yang merupakan salah satu jenis flavonoid yang diakui sebagai salah satu penghambat enzim aromatase yang berperan dalam memengaruhi regulasi pengarah jenis kelamin (Dean 2004), sehingga akan mengarah pada terbentuknya ikan berkelamin jantan pada saat larva.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa madu cukup efektif untuk mengarahkan diferensiasi kelamin ikan nila pada periode labil dan berpotensi tinggi untuk menggantikan hormon sintetis MT yang selama ini biasa digunakan. Menurut Matty (1985), diferensiasi kelamin pada ikan merupakan proses yang relatif labil dibandingkan vertebrata yang lebih tinggi, dan kondisi ini memungkinkan untuk dilakukan rekayasa kelamin.

Peningkatan persentase ikan nila kelamin jantan hasil perendaman dengan *chrysin* dan kalium menunjukkan bahwa kedua bahan tersebut berperan penting dalam perubahan arah diferensiasi kelamin ikan nila. Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Howell *et al.* (1994) bahwa bahan fitokimiawi seperti *chrysin*, *daidzein*, dan asam caffeic dapat mendorong ketidakseimbangan hormon yang diperlukan dalam diferensiasi

kelamin ikan, dan secara *in vitro* telah dibuktikan bahwa beberapa bahan fitokimiawi mampu memblokir biosintesis estrogen (Le Bail *et al.* 1998). Mekanisme tersebut diduga juga terjadi pada penelitian ini.

Berdasarkan kandungan kalium dalam madu (Tabel 1), kalium berpotensi dalam mengarahkan jenis kelamin jantan pada ikan nila. Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Capelo *et al.* (1993) bahwa kalium berfungsi sebagai pengarah diferensiasi kelamin melalui modulasi peredaran testosteron, dan pengendalian tindakan androgen. Selanjutnya, analisis RT-PCR menunjukkan bahwa tingkat ekspresi gen *aroma-g* pada ikan yang direndam madu menurun pada jam ke-12 (Gambar 1), sama halnya dengan pascaperendaman menggunakan *chrysin*, dan kalium (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan madu menurunkan ekspresi aromatase tipe gonad dan mengakibatkan pengarah diferensiasi kelamin ikan nila menjadi jantan. Selanjutnya, perlakuan *chrysin* dan kalium menunjukkan bahwa bahan bioaktif madu yang berperan dalam mengarahkan diferensiasi kelamin adalah *chrysin* dan kalium.

Persentase ikan nila jantan pada perlakuan perendaman *chrysin* (81,16%) dan kalium (80,64%) adalah sekitar 17% lebih tinggi daripada kontrol ($p < 0,1$). Nilai tersebut relatif sama dengan hasil perlakuan perendaman dengan madu pada percobaan satu (rata-rata 18%). Namun demikian, pada perendaman madu, persentase ikan jantan pada kontrol relatif tinggi (80,86%). Sumber larva ikan nila pada kedua percobaan tersebut adalah berbeda, dan hal ini diduga menjadi penyebab perbedaan persentase ikan kelamin jantan pada kontrol.

Teknik pengarah diferensiasi kelamin juga digunakan untuk melihat peranan faktor genetik dan endokrin dalam mekanisme pengarah-

an dan pembentukan jenis kelamin (Gennotte *et al.* 2014). Ekspresi aroma-g pada K12, K24, dan K48 terlihat berbeda, yaitu level ekspresi gen menurun dari K12 hingga K48, sedangkan level ekspresi gen β -aktin relatif sama (Gambar 1). Hasil ini berbeda dengan pernyataan Ijiri *et al.* (2008) bahwa ekspresi gen aromatase akan meningkat pada saat diferensiasi kelamin di gonad XX mulai dari hari ke-5 sampai 15 setelah menetas dan tetap tinggi setelah itu. Hal ini diduga karena RNA berasal dari kumpulan enam larva dan dijadikan satu sampel. Dari enam larva tersebut tidak diketahui mana yang berdiferensiasi menjadi jantan dan betina, sehingga tingkat ekspresi gen aromatase pada K12, K24, dan K48 tidak bisa menunjukkan peningkatan.

Ekspresi gen aroma-o terlihat pada semua titik pada perlakuan, sedangkan pada kontrol ekspresi gen tidak terdeteksi pada jam ke-12, 24, dan 48 (Gambar 1). Hal ini menunjukkan ekspresi gen aroma-o terdeteksi sebelum diferensiasi kelamin terjadi. Akan tetapi, saat diferensiasi ovarium terjadi, otak tidak mengekspresikan gen aromatase lagi. Hal ini sejalan dengan pernyataan Diotel *et al.* (2010) bahwa estrogen yang diproduksi di otak mengarahkan beberapa tindakan pada satu set fungsi besar, tetapi belum tentu terkait dengan reproduksi. Banyak penelitian telah dilakukan mengenai ekspresi gen aromatase pada pengarahannya kelamin ikan nila, tetapi masih sedikit kontribusi pengetahuan aromatase yang berhubungan dengan variasi individu dalam perilaku pembentukan kelamin (Diotel *et al.* 2010)

Ekspresi gen aroma-g hanya terlihat pada gonad betina, sedangkan ekspresi gen aroma-o terlihat pada otak, dan gonad jantan dan betina. Namun demikian, ada perbedaan ukuran fragmen DNA antara aromatase pada kontrol, yaitu sekitar 300 bp, dan pada gonad betina sekitar 200 bp untuk aroma-g. Perbedaan ukuran fragmen DNA

tersebut diduga karena adanya *alternative splicing* (Brett *et al.* 2001), yaitu pada saat proses transkripsi, terjadi loncatan intron sehingga mRNA hanya terdiri atas ekson. *Alternative splicing* intron ini juga bisa menyebabkan perbedaan protein yang terbentuk (Brett *et al.* 2001).

Pertumbuhan bobot spesifik, kelangsungan hidup, dan biomassa ikan antar perlakuan madu dengan kontrol adalah tidak berbeda nyata ($p > 0,05$; Tabel 2). Tidak adanya perbedaan nilai pertumbuhan dan biomassa antara perlakuan dan kontrol dapat dikatakan bahwa madu tidak memberikan efek yang berbeda terhadap pertumbuhan sampai pada akhir penelitian. Peranan madu dalam penelitian ini lebih berdampak terhadap pengarahannya kelamin, dan tidak terhadap pertumbuhan. Bwanika *et al.* (2007) menyatakan bahwa ikan nila mempunyai perbedaan dalam pertumbuhan yang cukup signifikan antara jantan dengan betina. Ikan nila jantan tumbuh lebih cepat, lebih besar, dan lebih seragam dibandingkan ikan nila betina. Menurut Popma & Masser (1999), dalam kondisi optimum, ikan nila akan mencapai matang gonad di kolam budi daya pada usia 5-6 bulan (150-200 g). Perbedaan pertumbuhan ikan nila mulai tampak ketika ikan mulai matang gonad, sementara lama waktu pemeliharaan ikan pada penelitian adalah dua bulan. Oleh karena itu penelitian ini belum bisa menggambarkan perbedaan pertumbuhan. Hal ini menunjukkan adanya peluang pertumbuhan yang lebih tinggi pada ikan hasil perlakuan dibanding ikan kontrol, jika ikan dipelihara lebih lanjut sampai mencapai matang gonad.

Peningkatan pertumbuhan pada ikan perlakuan *chrysin* dan kalium diduga disebabkan oleh kepadatan ikan lebih rendah akibat dari kelangsungan hidup yang lebih rendah ($p < 0,1$) dibandingkan dengan kontrol (Tabel 3). Selanjutnya, kelangsungan hidup yang lebih rendah pada

perlakuan *chrysin* dan kalium diduga karena kedua bahan kimiawi tersebut pada kadar yang diuji, tidak bisa ditoleransi oleh larva. Hal ini juga terjadi pada penelitian perendaman larva ikan nila berumur 17 hari setelah menetas menggunakan *chrysin* dengan dosis 20 mg L⁻¹ selama 24 jam, hasilnya larva mati 100% (Dabrowski *et al.* 2005), namun penyebabnya belum diketahui dengan jelas.

Kualitas air yang diukur dalam penelitian ini adalah suhu dan pH. Menurut Baroiller *et al.* (2009a), faktor lingkungan dapat memengaruhi rasio jenis kelamin banyak spesies ikan dan dapat menentukan diferensiasi kelamin. Suhu adalah isyarat lingkungan yang paling umum memengaruhi jenis kelamin disamping pH. Baroiller *et al.* (2009a), mengatakan bahwa ikan nila merupakan salah satu spesies ikan yang memiliki kepekaan yang tinggi terhadap faktor lingkungan terutama suhu dan pH. Suhu dalam penelitian ini berada pada kisaran 27-28°C (Tabel 4 dan 5), dan nilai ini masih dalam batas normal untuk pemeliharaan ikan nila seperti yang dinyatakan oleh Popma & Masser (1999) bahwa suhu optimum ikan nila adalah 25-28°C. Hal ini menunjukkan bahwa suhu dalam penelitian ini tidak berpengaruh terhadap pengarahannya kelamin jantan, sehingga pengaruh pengarahannya kelamin jantan hanya disebabkan oleh perlakuan. Hal ini didukung pula oleh pendapat yang menyatakan bahwa suhu merupakan faktor eksternal yang dapat berpengaruh terhadap perubahan fenotip betina menjadi jantan pada ikan yang memiliki genotip betina (XX), dan ikan tilapia akan memiliki fenotip jantan apabila pada saat larva diberi perlakuan suhu 35°C (Baroiller & D'Cotta 2001) atau di atas 32°C (Tessema *et al.* 2006, Wessel & Horstgan-Schwark 2007 in Baroiller *et al.* 2009b). Selain itu suhu juga mempunyai peranan dalam diferensiasi kelamin ikan pada stadia larva, seperti yang dikemukakan

oleh Kitano *et al.* (2000) dan D'Cotta *et al.* (2001), bahwa penghambatan aromatase bisa dikarenakan oleh faktor fisik, seperti suhu. Hal ini dapat dianggap bahwa penghambatan tindakan aromatase oleh faktor fisik dan kimiawi bisa meniru efek pembalikan kelamin oleh pemberian androgen pada beberapa spesies ikan (Kwon *et al.* 2000).

Menurut Reddon & Hurd (2013), pH memengaruhi rasio jenis kelamin jantan dan betina pada periode awal perkembangannya. Nilai pH air selama perlakuan dan pemeliharaan dari semua ikan perlakuan dan kontrol berada pada kisaran yang dapat ditoleransi oleh ikan nila, yaitu 5,9-7,8 (Tabel 4 dan 5). Kondisi ini masih pada kisaran optimum bagi ikan nila bahwa nilai pH untuk ikan nila adalah 6-9 (Popma & Masser 1999). Oleh karena itu persentase jantan yang dihasilkan dalam perendaman larva nila menggunakan madu, kalium, dan *chrysin* bukan karena pengaruh pH air selama penelitian. Pengaruh pH air sebesar 4-5 pada ikan kribensis (*Pelvicachromis pulcher*), menghasilkan jantan 90%, dan menghasilkan betina 90% pada keadaan pH netral (Oldfield 2005]. Pada kasus ikan *Apistogramma caetei* (Chiclids), jumlah populasi jantan dengan betina hampir seimbang terjadi pada pH asam (4,5-5,5), yang menghasilkan betina 40-47%, dan pada pH 6,5 yang menghasilkan hampir semuanya betina sebesar 96% (Baroiller *et al.* 2009a). Sementara perbedaan kelangsungan hidup pada perlakuan *chrysin* dan kalium dengan kontrol bukan disebabkan oleh kualitas air, karena nilai suhu dan pH selama perlakuan mempunyai kisaran nilai yang masih dalam kondisi optimum.

Simpulan

Madu hutan, madu ternak, dan madu bakau dapat digunakan untuk pengarahannya kelamin

jantan ikan nila. Ketiganya memiliki efektivitas yang sama, dengan peningkatan jantan sebesar rata-rata 18%.

Chrysin dan kalium yang merupakan bahan aktif dalam madu, berperan penting dalam mengarahkan diferensiasi kelamin ikan nila menjadi jantan. Analisis RT-PCR menunjukkan bahwa madu, *chrysin*, dan kalium dapat menekan ekspresi gen aroma-g pada jam ke-12 pascapereendaman, sehingga menyebabkan nila mengalami perubahan kelamin menjadi jantan.

Nilai kisaran suhu dan pH dalam penelitian ini tidak memengaruhi perubahan kelamin ikan menjadi jantan.

Persantunan

Penulis mengucapkan terima kasih kepada tim beasiswa Kaltim Cemerlang yang membiayai penelitian ini, dan Ibu Anna Octavera, S.Pi., M.Si, yang telah membantu penelitian ini secara teknis.

Daftar pustaka

Baroiller JF, D'Cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4): 399-409

Baroiller JF, D'Cotta H, Saillant E. 2009a. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual Development*, 3(2-3): 118-135

Baroiller JF, D'Cotta H, Bezavlt E, Wessel S, Hoerstgen-Schwark G. 2009b. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 151(1):30-38

Brett D, Pospisil H, Valcárcel J, Reich J, Bork P. 2001. Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genetics*, 30(1): 29-30

Bwanika GN, Murie DJ, Chapman LJ. 2007. Comparative age and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in lakes Nabugabo and Wamala, Uganda. *Hydrobiologia*, 589(1): 287-301

Capelo AS, Cremades A, Tejada F, Teodomiro F, Penafiel R. 1993. Potassium regulates plasma testosterone and renal ornithine decarboxylase in mice. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 333(1-2): 32-34

Dabrowski K, Gustavo R, Mary AGA. 2005. Use of phytochemicals as an environmentally friendly method to sex reverse Nile tilapia. *Fish Nutrition and Feed Technology Research*, 3 (11) : 287-303

D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun A, Baroiller JF. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*, 59(3): 265-276.

Dean W. 2004. Chrysin: is it an effective aromatase inhibitor? *Vitamin Research Products News*, 18(4): 4-5

Diotel N, Page YL, Mouriec, Sok-Keng T, Pellegrini E, Vaillant C, Anglade I, Brion F, Pakdel F, Bonchu C, Kah O. 2010. Review. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31 (2): 172-192

Ferreres F, Tomás-Barberán FA, Gil MAI, Francisco Tomás-Lorente F. 1991. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56(1): 49-56.

Guerrero RD, Shelton WL. 1974. An acetocarmine squash technique for sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 36(1): 56

Gennotte V, Kinkela PM, Ulysse B, Djetouan DA, Sompagnimdi FB, Tomson T, Melard C, Rougeot C. 2014. Brief exposure of embryos to steroids or aromatase inhibitor induces Sex Reversal in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323(1): 31-38

Howell WM, Hunsinger RN, Blanchard PD. 1994. Paradoxical masculinization of female mosquito fish during exposure to spiro nolactone. *The Progressive Fish-Culturist*, 56(1) : 51-55.

Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang De-Shou W, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile ti-

- lapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 78(2) : 333–341
- Kikuchi K, Hamaguchi S. 2013. Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*, 242 (4): 339-353
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe S. 2000. Aromatase inhibitor and 17 alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development* 56(1): 1-5.
- Kwon YJ, Haghpanah V, Kogson-Hurtado LM, McAndrew BJ, Penman DJ. 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *Journal of Experimental Zoology* 287(1): 46-53.
- Le Bail JC, Laroche T, Marre-Fournier F, Habrioux G. 1998. Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Letters*, 133(1): 101-106.
- Matty AJ. 1985. *Fish Endocrinology*. Timber Press Portland. USA. 267 p
- Mukti AT, Mubarak AS, Ermawan A. 2008. Pengaruh penambahan madu dalam pakan induk jantan lobster air tawar *red claw* (*Cherax quadricarinatus*) terhadap rasio jenis kelamin larva. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 1(1): 37-42
- Poonlaphdecha S, Pepey E, Huang SH, Canonne M, Soler L, Mortaji S, Morand S, Pfennig F, Melard C, Baroiller JF, D’cotta H. 2011. Elevated amh gene expression in the brain of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation. *Sexual Development*, 5 (1): 33–47.
- Popma T, Masser M. 1999. Tilapia life history and biology. *Southern Regional Aquaculture Center Publication*, No. 283: 1-4
- Reddon AR, Hurd PL. 2013. Water pH during early development influences sex ratio and male morph in a West African cichlid fish, *Pelvicachromis pulcher*. *Zoology*, 116 (3): 139-143
- Oldfield RG. 2005. Genetic, abiotic and social influences on sex differentiation in cichlid fishes and the evolution of sequential hermaphroditism. *Fish and Fisheries*, 6(2): 93–110.
- Sever DM, Halliday T, Waight V, Brown J, Davies HA, Moriarty EC. 1999. Sperm storage in female of the smooth new (*Triturus v. vulgaris* L.): I. ultrastructure of the spermathecae during the breeding season. *Journal of Experimental Zoology*, 283(1): 51-70.
- Soelistyowati DT, Martati E, Arfah H. Efektivitas madu terhadap pengarahannya kelamin ikan gapi (*Poecilia reticulata* Peters). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 65(2): 155-160
- Syaifuddin A. 2004. Pengaruh pemberian suplemen madu pada pakan larva ikan nila (*Oreochromis niloticus*) GIFT terhadap rasio jenis kelaminnya. *Skripsi*. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. 69 hlm
- Utomo B. 2008. Efektivitas penggunaan aromatase inhibitor dan madu terhadap nisbah kelamin ikan gapi (*Poecilia reticulata* Peters). *Skripsi*. Program Studi Teknologi dan Manajemen Perikanan Budi daya, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 48 hlm.