

Mekanisme alih kelamin ikan nila *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) melalui manipulasi ekspresi gen aromatase

[Sex reversal mechanism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) by manipulation of aromatase gene expression]

Upmal Deswira^{1✉}, Agus Oman Sudrajat², Dinar Tri Soelistyowati²

¹ Program Studi Ilmu Akuakultur, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

² Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan - IPB
Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680

Diterima: 3 Maret 2015; Disetujui: 22 Desember 2015

Abstrak

Alih kelamin merupakan suatu teknik pengalihan kelamin menjadi jantan atau betina. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi mekanisme alih kelamin ikan nila pada penggunaan penghambat aromatase, madu, dan pestisida. Ikan nila fase bintik mata direndam dalam tiga larutan tersebut dan diamati ekspresi gen aromatase dan nisbah kelaminnya. Perendaman dilakukan selama 24 jam menggunakan penghambat aromatase (*imidazole*) 20 mg L⁻¹, madu (Perhutani, bunga kelengkeng) 10 ml L⁻¹, dan pestisida (Decis: deltamethrin 25 g L⁻¹) 1 µL L⁻¹. Kemudian dilakukan analisis ekspresi gen aromatase pada hari ke-1 dan ke-8 setelah perlakuan. Selanjutnya larva dipelihara sampai berumur 75 hari. Tingkat ekspresi gen aromatase tipe ovarium perlakuan *imidazole*, madu, dan pestisida pada hari ke-1 setelah perlakuan lebih rendah dibandingkan kontrol. Pada hari ke-8 tingkat ekspresi gen paling rendah pada perlakuan *imidazole* sedangkan yang paling tinggi pada perlakuan pestisida. Hasil ini menunjukkan bahwa terjadi proses maskulinisasi pada perlakuan *imidazole* dan feminisasi pada perlakuan pestisida yang diketahui dari persentase jantan berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Nilai persentase jantan pada perlakuan kontrol, *imidazole*, madu, dan pestisida secara berurutan yaitu 68,32%, 80,77%, dan 50,45%. Perlakuan madu tidak berbeda nyata dengan kontrol. Disimpulkan bahwa alih kelamin dipengaruhi oleh perubahan ekspresi gen aromatase tipe ovarium, peningkatan ekspresi gen aromatase tipe ovarium menyebabkan feminisasi, sebaliknya penurunan ekspresi gen menyebabkan maskulinisasi di perkembangan awal larva ikan nila.

Kata penting: alih kelamin, aromatase tipe ovarium, ikan nila, madu, penghambat aromatase, pestisida

Abstract

Sex reversal is a sex conversion technique to be male or female. This research was conducted to evaluate the mechanism of sex reversal in tilapia on the use of aromatase inhibitors (AI), honey and pesticide. The eye spot embryo of Nile tilapia was immersed into those solutions and examined the expression of aromatase gene and sex ratio. The sex reversal was carried out by immersion of eye spot embryo for 24 hours using 20 mg L⁻¹ AI (*imidazole*), 10 ml L⁻¹ honey (Perhutani, longan flower), and 1 µL L⁻¹ pesticide (Decis: deltamethrin 25 g L⁻¹). Aromatase gene expression was analyzed on 1st and 8th day after treatment. Larvae were reared until 75 days-old. The level of gene expression of ovarian type aromatase in *imidazole*, honey, and pesticide treatment on 1st day after treatment were lower than control. While, on 8th day the lowest level of gene expression was on *imidazole* treatment and the highest was on pesticide treatment. The results indicated that masculinization occurred in *imidazole* treatment and feminization occurred in pesticide treatment which showed by male percentage that significantly different from the control ($p < 0.05$). The male percentage of control, *imidazole*, honey, and pesticide were 68.32%, 80.77%, 70.93% and 50.45%, respectively. Honey treatment was not significantly different from control. In conclusion, sex reversal was influenced by modulation of gene expression of ovarian type aromatase, the increasing of gene expression of ovarian type aromatase caused feminization, and otherwise the decreasing of gene expression caused masculinization in early development stage of Nile tilapia.

Keywords: sex reversal, ovarian type aromatase, Nile tilapia, honey, aromatase inhibitor, pesticide

Pendahuluan

Ikan nila merupakan ikan konsumsi yang cepat matang gonad, mudah memijah dan memiliki perbedaan pertumbuhan antara jantan dan be-

tina. Menurut Lind *et al.* (2015) ikan nila jantan memiliki laju pertumbuhan lebih cepat dibandingkan dengan ikan betina. Budi daya monoseks jantan pada ikan nila menghasilkan ikan dengan

✉ Penulis korespondensi
Surel: upmaldeswira16@gmail.com

ukuran lebih besar dan seragam dibandingkan budi daya campuran (jantan dan betina) (Sayed & Moneeb 2015), sehingga budi daya monoseks jantan lebih menguntungkan. Salah satu cara untuk mendapatkan populasi monoseks yaitu dengan melakukan pengalihan kelamin menjadi jantan atau betina. Teknik alih kelamin yang diterapkan di Indonesia ada dua yaitu maskulinisasi untuk menghasilkan jantan dan feminisasi untuk menghasilkan betina (Zairin 2003). Alih kelamin dilakukan sebelum dan atau pada fase diferensiasi kelamin, sehingga perkembangan kelamin bisa diarahkan sesuai dengan tujuan.

Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk memperoleh populasi monoseks jantan pada ikan nila dengan berbagai bahan, dosis, dan metode pemberian yang berbeda. Pemberian hormon steroid 17α -metiltestosteron (MT) dan penghambat aromatase melalui pakan (Kwon *et al.* 2000; Liana 2007; Kaban 2010; Ariyanto 2010), perendaman (Nurlaela 2002; Sudrajat *et al.* 2007; Artanto 2010), madu melalui pakan (Syarifuddin 2004) atau perendaman (Heriyati *et al.* 2015). Penggunaan 17α -MT sudah dilarang, sedangkan perlakuan madu dan penghambat aromatase merupakan metode yang aman dan diperbolehkan penggunaannya. Menurut Beardmore *et al.* (2001), teknik perendaman merupakan teknik yang sukses diterapkan dalam alih kelamin karena lebih efisien daripada pemberian oral (pakan), terutama pada embrio atau tahap pascatetas.

Penghambat aromatase bekerja menghambat sintesis esterogen dengan menghalangi aktivitas aromatase, sehingga sintesis estrogen menjadi berkurang (Miller *et al.* 2008). Madu kaya akan flavonoid *chrysin* yang menjadi penghambat aktivitas enzim aromatase (Gambelunghe *et al.* 2003). Kalium dalam madu juga diduga berfungsi sebagai pengarah diferensiasi kelamin ikan melalui perubahan peredaran testosteron dan

pengendalian aktivitas androgen (Capelo *et al.* 1993).

Alih kelamin dapat terjadi secara alami akibat adanya pencemaran perairan yang disebabkan oleh kontaminasi limbah, seperti limbah pertanian berupa pestisida. Beberapa hasil penelitian menunjukkan proses feminisasi pada ikan yang terkontaminasi pestisida. Bahan ini memperkuat efek estrogenik dengan mengganggu poros reproduksi di beberapa tempat sehingga menyebabkan peningkatan kadar 17β estradiol (E₂) plasma dan penurunan konsentrasi testosteron plasma (T) (Tian *et al.* 2012). Deltamethrin merupakan pestisida kelas kimia piretroid yang mampu menurunkan kadar testosteron plasma. Tikus jantan yang diberi deltamethrin selama 65 hari dengan dosis 1 atau 2 mg kg⁻¹ mengalami penurunan kadar testosteron plasma (NPIC 2010) sehingga ikan yang terpapar jenis pestisida ini diduga akan mengalami gangguan dalam proses diferensiasi kelaminnya yang mengarah pada feminisasi.

Bahan aktif yang terkandung dalam madu, penghambat aromatase, dan pestisida (deltamethrin), diduga berpengaruh dalam proses alih kelamin dengan memengaruhi ekspresi gen aromatase tipe ovarium. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi mekanisme alih kelamin ikan nila pada penggunaan penghambat aromatase (PA), madu, dan pestisida (deltamethrin) melalui perendaman embrio ikan nila fase bintik mata berdasarkan ekspresi gen aromatase dan nisbah kelamin.

Bahan dan metode

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli sampai September 2014, bertempat di Laboratorium Produksi Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Embrio fase bintik mata yang digunakan untuk percobaan seks reversal diperoleh dari hasil pemijahan induk betina dan induk jantan ikan nila nirwana berukuran 300-400g dengan perbandingan 1:1. Induk dipijahkan secara alami di dalam akuarium berukuran 100 cm x 50 cm x 60 cm. Selama pemeliharaan, induk diberi pakan dengan kadar protein 35% secara *at satiation* setiap pagi dan sore hari. Embrio fase bintik mata dipanen setelah tiga hari pascafertilisasi. Bahan dan dosis yang digunakan untuk perlakuan alih kelamin adalah PA (*imidazole*) 20 mg L⁻¹ (Nurlaela 2002), madu (Perhutani, bunga kelengkeng) 10 ml L⁻¹ (Heriyati *et al.* 2015), dan pestisida (Decis: bahan aktif deltametrin 25 g L⁻¹) 1 µL L⁻¹ (Tian *et al.* 2012).

Percobaan alih kelamin dilakukan melalui perendaman embrio fase bintik mata menggunakan bahan berupa *imidazole*, madu, dan pestisida. Setiap perlakuan diulang tiga kali. Embrio drendam dalam larutan perlakuan sesuai dengan dosisnya selama 24 jam dengan kepadatan sebanyak 80 ekor per ulangan. Perendaman dilakukan pada akuarium berukuran 20 x 20 x 20 cm³ (volume air 1,5 L), kemudian dipelihara dalam akuarium pemeliharaan sampai hari ke-14. Selanjutnya larva berumur 14 hari dipindahkan ke dalam akuarium pemeliharaan berukuran 80 x 40 x 40 cm³ dengan volume air 50 L, kemudian volume air ditingkatkan sampai 75 L ketika larva sudah berumur 45 hari. Untuk menjaga kualitas air setiap akuarium dilengkapi dengan filter dan heater akuarium (28°C), serta dilakukan penggantian air sebanyak 75% setiap dua hari.

Pakan pertama berupa cacing sutra mulai diberikan ketika larva berumur 2 hari. Pemberian pakan ini dilakukan secara *ad libitum*. Pada umur 25 hari, larva diberi pakan komersial dengan kadar protein 38% yang diberikan secara *at satiation* dengan frekuensi tiga kali sehari.

Ekspresi gen aromatase dianalisis pada hari ke-1 dan ke-8 setelah perlakuan. Jaringan yang dianalisis pada larva ialah bagian tengah badan sampai kepala. Analisis ekspresi gen dilakukan di laboratorium Reproduksi dan Genetika Organisme Akuatik, Departemen BDP, FPIK IPB.

Ekspresi gen aromatase dianalisis menggunakan metode RT-PCR. Sampel jaringan diambil pada waktu hari pertama dan kedelapan pascaperlakuan. Setiap ulangan diambil sebanyak dua ekor untuk dilakukan ekstraksi RNA. RNA total diekstraksi menggunakan mini kit total RNA khusus untuk jaringan. Konsentrasi RNA total hasil ekstraksi diukur menggunakan NanoDrop 2000 Spectrophotometer. Sintesis cDNA dari RNA total dilakukan menggunakan kit *Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads*, FSRMB, (GE Healthcare) dengan prosedur sesuai dengan panduan.

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen aromatase tipe ovarii sekuen gen aromatase tipe ovarii ikan mujair dengan no akses: AF135850 (Heriyati *et al.* 2015). Primer tersebut adalah tiArm1-F:5'ATGGATCTGATCTCTGCTTGT-3' dan tiArm1-R:5'-CAAACCAAACAGAAAGAAGG-3'. Hasil PCR diseparasi menggunakan elektroforesis dengan gel agarosa 2%. DNA divisualisasi dengan pewarna etidium bromida menggunakan cahaya ultraviolet. Tingkat ekspresi gen diperoleh dengan membandingkan total pixel gen aromatase tipe ovarii dengan β-actin menggunakan piranti lunak UN-SCAN-IT gel 6.1.

Identifikasi jenis kelamin dilakukan dengan menganalisis gonad ikan nila setelah berumur 75 hari dengan menggunakan metode asetokarmin. Metode analisis asetokarmin mengikuti metode Guerrero & Shelton (1974).

Nilai laju pertumbuhan harian (LPH) diperoleh berdasarkan hasil sampling bobot larva

ikan nila. Penimbangan bobot dimulai ketika larva berumur 14 hari. Pada akhir pemeliharaan dilakukan perhitungan tingkat kelangsungan hidup (TKH) dan persentase kelamin jantan.

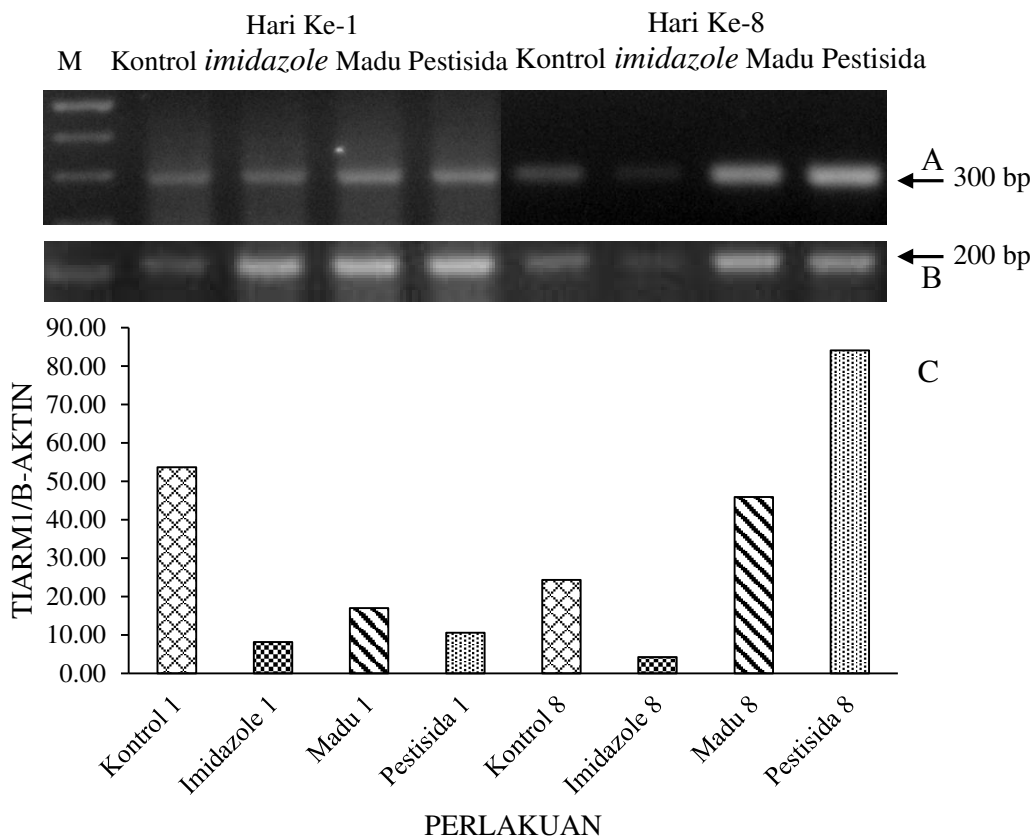
Data persentase kelamin jantan, laju pertumbuhan harian (LPH) dan tingkat kelangsungan hidup (TKH) dianalisis sidik ragam menggunakan SPSS 16. dengan tingkat kepercayaan 95% dan uji lanjut dengan uji Duncan. Tingkat ekspresi gen aromatase secara deskriptif.

Hasil

Hasil elektroforesis dan tingkat ekspresi gen aromatase kontrol, *imidazole*, madu, dan pestisida yang diperoleh dengan menggunakan UN-SCAN-IT gel 6.1 tersaji pada Gambar 1. Gambar ini menunjukkan tingkat ekspresi gen aromatase tipe ovarii satu dan delapan hari setelah perlaku-

an. Tingkat ekspresi gen aromatase tipe ovarii setelah diberi perlakuan perendaman 24 jam dengan *imidazole*, madu, dan pestisida lebih rendah dibandingkan kontrol. Pada hari kedelapan setelah perlakuan terlihat perbedaan tingkat ekspresi gen antar perlakuan. Tingkat ekspresi gen paling rendah pada perlakuan *imidazole* sedangkan yang paling tinggi pada perlakuan pestisida.

Data hasil penelitian berupa persentase kelamin jantan, laju pertumbuhan harian (LPH), dan Tingkat Kelangsungan Hidup (TKH) disajikan pada Tabel 1. Persentase kelamin jantan tertinggi pada perlakuan *imidazole* sebesar 80,77% dan terendah pada perlakuan pestisida (50,45%). Kedua perlakuan ini berbeda nyata dibandingkan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan perlakuan madu dengan persentase kelamin jantan sebesar 70,93% tidak berbeda nyata.



Gambar 1. Ekspresi gen aromatase tipe ovarii (A) dan β -aktin (B) pada satu hari dan delapan hari setelah perlakuan; M=marker DNA; tanda panah menunjukkan target gen; tingkat ekspresi gen aromatase tipe ovarii dibandingkan dengan β -actin menggunakan UN-SCAN-IT gel 6.1 (C).

Tabel 1. Persentase kelamin jantan, Laju Pertumbuhan Harian (LPH), Tingkat Kelangsungan Hidup (TKH) ikan nila hasil perlakuan AI, madu, dan pestisida

Perlakuan	Jantan (%)	LPH (%)	TKH (%)
Kontrol	68,32±2,79 ^b	8,98±0,13	68,06±8,83
<i>imidazole</i>	80,77±2,52 ^a	9,10±0,13	69,29±6,97
Madu	70,93±1,24 ^b	8,81±0,23	65,42±3,82
Pestisida	50,45±5,81 ^c	8,81±0,35	66,67±7,11

Keterangan: Huruf tika atas yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Nilai yang tertera merupakan nilai rata-rata dan simpangan baku.

Pembahasan

Aktivitas aromatase berkorelasi dengan tingkat ekspresi aromatase mRNA (Chang *et al.* 1997). Ekspresi gen aromatase satu hari setelah perendaman menunjukkan level ekspresi gen yang lebih rendah dibandingkan kontrol. Bahan aktif yang terkandung dalam *imidazole*, madu, dan pestisida mempengaruhi jumlah mRNA gen aromatase tipe ovarium. Pada hari kedelapan setelah perendaman, perlakuan *imidazole* mampu menurunkan tingkat ekspresi gen aromatase, sebaliknya perlakuan pestisida meningkatkan ekspresi gen aromatase. Pada ikan *Japanese flounder* (*Paralichthys olivaceus*) jantan terjadi penekanan ekspresi gen aromatase selama proses diferensiasi kelamin, sebaliknya terjadi peningkatan pada kelompok betina (Kitano *et al.* 1999). Peningkatan tingkat ekspresi gen aromatase juga terjadi pada ikan zebra (*Danio rerio*) yang terpapar pestisida (monokrotopos 40%) (Zhang *et al.* 2013). Tingginya ekspresi gen aromatase pada perlakuan pestisida mampu memacu peningkatan biosintesis estrogen, sehingga kadar estrogen meningkat dan mengarahkan terjadinya proses feminisasi.

Menurut Kwon *et al.* (2001), tingkat ekspresi gen aromatase tipe ovarium pada ikan nila betina terus meningkat pada 11 sampai 31 dpf, sedangkan pada ikan jantan mengalami penurunan, sehingga terjadi perbedaan yang signifikan antara

kedua jenis kelamin. Hal ini memperlihatkan bahwa aromatase tipe ovarium memainkan peran penting dalam menjaga atau mempercepat diferensiasi ovarium setelah diferensiasi seks awal. Perbedaan ekspresi gen aromatase di daerah gonad diduga menjadi faktor dalam memulai diferensiasi seksual. Hasil penelitian Kwon *et al.* (2000) menyebutkan larva nila diberi pakan dengan penghambat aromatase pada minggu pertama (11-17 dpf) atau direndam dalam larutan yang mengandung penghambat aromatase selama 3 jam pada 13 dpf menyebabkan peningkatan persentase jantan secara signifikan. Oleh karena itu gen aromatase tipe ovarium memainkan peran penting dalam diferensiasi seks pada ikan nila. Peran penting ini dicapai dengan penurunan ekspresi pada jantan dan peningkatan ekspresi pada betina (Kwon *et al.* 2001, Wang & Orban 2007, Blazquez *et al.* 2008, Injiri *et al.* 2008). Estrogen mungkin tidak hanya diperlukan untuk memicu diferensiasi ovarium, tetapi juga diperlukan untuk mempertahankan diferensiasi ovarium ini, di mana terjadi penurunan tajam tingkat transkrip gen ini pada hewan yang menjalani diferensiasi testis (Kitano *et al.* 1999, Wang & Orban 2007, Jørgensen *et al.* 2008).

Tingkat ekspresi gen aromatase tipe ovarium (Gambar 1) berkorelasi dengan persentase jantan yang diperoleh pada akhir pemeliharaan. Persentase kelamin jantan tertinggi pada perlakuan *imi-*

dazole sebesar 80,77% dan terendah pada perlakuan pestisida (50,45%) yang berbeda nyata dibandingkan kontrol ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan *imidazole*, madu, dan pestisida menyebabkan terjadinya alih kelamin pada ikan nila yang mengakibatkan proses maskulinisasi pada ikan yang diberi perlakuan *imidazole* serta proses feminisasi pada perlakuan pestisida. Penambahan bahan-bahan tertentu seperti hormon dan bahan kimia lain dalam media pemeliharaan ikan selama periode labil kelamin dapat memengaruhi proses diferensiasi kelamin (Devlin & Nagahama 2002). Penghambat aromatase mampu menghambat sintesis estrogen (Brodie *et al.* 1999) dan meningkatkan nisbah androgen estrogen (Kwon *et al.* 2000), sehingga terjadi peningkatan persentase kelamin jantan (Tabel 1).

Ikan zebra (*Danio rerio*) yang dipelihara dalam media mengandung pestisida $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (monokrotopos 40% mengakibatkan peningkatan persentase betina sebanyak 71% dibandingkan dengan kontrol 49% (Zhang *et al.* 2013). Ikan gupi (*Poecilia reticulata*) yang terpapar monokrotopos ($0,1$ dan 1 mg L^{-1}) mengalami peningkatan kadar estradiol- 17β secara signifikan, sehingga terjadi sintesis vitelogenin. Selain itu monokrotopos juga mengakibatkan penurunan kadar testosteron yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan testis dan penurunan jumlah sperma (Tian *et al.* 2012). Pada penelitian ini terjadi peningkatan persentase betina yang terlihat dari rendahnya persentase jantan (50,45%) dibandingkan dengan kontrol (68,32%). Hal ini mengindikasikan bahwa ikan yang terpapar pestisida (deltametrin) pada periode perkembangan gonad berdampak pada feminisasi.

Persentase kelamin jantan pada perlakuan madu (70,93%) tidak berbeda nyata dibandingkan kontrol. Demikian juga dengan level ekspresi

gen aromatasenya yang tetap tinggi pada hari ke-8. Hal ini diduga akibat kandungan K dan *chrysin* madu yang digunakan tidak mencukupi jumlah optimal untuk mengakibatkan terjadinya alih kelamin pada ikan nila. Sumber nektar dan lama penyimpanan diduga dapat memengaruhi konsentrasi bahan aktif yang terkandung di dalam madu. Flavonoid *chrysin* yang telah terbukti menjadi penghambat aktivitas enzim aromatase (aromatase *inhibitor*) (Gambelunghe *et al.* 2003). Kalium dalam madu juga diduga berfungsi sebagai pengarah diferensiasi kelamin ikan melalui modulasi peredaran testosteron, dan pengendalian tindakan androgen (Capelo *et al.* 1993).

Tingkat kelangsungan hidup dan laju pertumbuhan harian setiap perlakuan tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol (Tabel 1). Hal ini menandakan bahwa bahan-bahan yang digunakan untuk memicu proses alih kelamin ini tidak berbahaya bagi kelangsungan hidup ikan. Selanjutnya, tidak adanya perbedaan nyata nilai laju pertumbuhan harian karena ikan belum mencapai fase diferensial pertumbuhan. Popma & Masser (1999) menyatakan bahwa ikan nila jantan tumbuh dua kali lebih cepat daripada ikan betina. Hal ini menunjukkan adanya peluang perbedaan laju pertumbuhan ikan hasil perlakuan dibanding ikan kontrol, jika ikan dipelihara lebih lanjut (Heriyati 2012).

Simpulan

Alih kelamin dipengaruhi oleh perubahan ekspresi gen aromatase tipe ovari. Peningkatan ekspresi gen aromatase tipe ovari menyebabkan feminisasi, sebaliknya penurunan ekspresi gen menyebabkan maskulinisasi.

Daftar Pustaka

Ariyanto D. 2010. Diferensiasi kelamin dan performansi tiga genotipe ikan nila yang diberi bahan aromatase inhibitor hingga tahap

- pembesaran. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 67 hlm.
- Artanto AW. 2010. Pengaruh pemberian aromatase inhibitor melalui perendaman larva terhadap keberhasilan sex reversal dan pertumbuhan ikan nila merah *Oreochromis* sp. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. 44 hlm.
- Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI. 2001. Mono-sex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197(1-4): 283-301.
- Blázquez M, Gonzalez A, Papadaki M, Mylonas C, Piferrer F. 2008. Sex related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 158(1): 95-101.
- Brodie A. 1991. Aromatase and its inhibitor-An overview. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1-3): 255-261.
- Capelo AS, Asuncion C, Francisco T, Teodomiro F, Rafael P. 1993. Potassium regulates plasma testosterone and renal ornithinecarboxylase in mice. *Federation of European Biochemical Societies*, 333(1-2): 32-34.
- Chang XT, Kobayashi T, Kajiura H, Nakamura M, Nagahama Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 18(1): 57-66.
- Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influence. *Aquaculture*, 208(3-4): 191-364.
- Gambelunghe C, Rossi R, Somnavilla M, Ferranti C, Rossi R, Ciculi C, Gizzi S, Micheletti A, Rufini S. 2003. Effects of chrysin on urinary testosterone levels in human males. *Journal of Medicinal Food*, 6(4): 387-390.
- Guerrero RD, Shelton WL. 1974. An acetocarmine squash technique for sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 36(1): 56.
- Heriyati E. 2012. Sex reversal ikan nila menggunakan madu dan analisis ekspresi gen aromatase. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 37 hlm.
- Heriyati E, Alimuddin, Arfah H, Sudrajat AO. 2015. Ekspresi gen aromatase pada pengarah diferensiasi kelamin ikan nila *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) menggunakan madu. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 15(1): 39-50.
- Ijiri S, Hiroyo K, Tohr K, De-Shou W, Fumie S, Bindhu P, Masaru N, Y Nagahama. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 78(2): 333-341
- Jørgensen A, Morthorst JE, Andersen O, Rasmussen LJ, Bjerregaard P. 2008. Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6: 25.
- Kaban IRE. 2010. Pengaruh pemberian aromatase inhibitor melalui Pakan buatan terhadap keberhasilan sex reversal Ikan nila merah *Oreochromis* sp. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. 35 hlm.
- Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, Nagahama Y, Abe SI. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 23(2): 167-176.
- Kwon JY, 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. *Experimental zoology*, 287(1): 46-53.
- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*, 59(4): 359-370.
- Lind CE, Safari A, Agyakwah SK, Attipoe FYK., El-Naggar GO, Hamzah A, Hulata G, Ibrahim NA, Khawa HL, Nguyen NH, Maluwa AO, Zaid M, Zake T, Ponzoni RW. 2015. Differences in sexual size di-

- morphism among farmed tilapia species and strains undergoing genetic improvement for body weight. *Aquaculture Reports*, 1(4): 20-27.
- Liana YP. 2007. Efektifitas aromatase inhibitor yang diberikan melalui pakan buatan terhadap sex reversal ikan nila merah *Oreochromis* sp. *Akuatik - Jurnal Sumberdaya Perairan*, 2(1): 1-7.
- Miller WR, Bartlett, Brodie AM, Brueggemeier RW, Salle E, Lonning PE, Lombart A, Maass N, Maudelonde T, Sasano H, Goss PE. 2008. Aromatase inhibitors: Are there differences between steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors and do they matter? *The Oncologist*, 13(8): 829-837.
- National Pesticide Information Center (NPIC). 2010. Deltamethrin Technical Fact Sheet. Oregon (US): Oregon State University.
- Nurlaela. 2002. Pengaruh aromatase inhibitor pada perendaman embrio terhadap nisbah kelamin ikan nila merah (*Oreochromis* sp.). *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. 51 hlm.
- Popma T, Masser M. 1999. Tilapia life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center Publication No.283.
- Sayed AEH, Moneeb RH. 2015. Hematological and biochemical characters of monosex tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) cultivated using methyltestosterone. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72 (5): 36-42.
- Sudrajat AO, Astutik ID, Arfan H. 2007. Seks reversal ikan nila merah (*Oreochromis* sp.) melalui perendaman larva menggunakan aromatase inhibitor. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 6(1): 103-108.
- Syaifuddin A. 2004. Pengaruh pemberian suplemen madu pada pakan larva ikan nila (*Oreochromis niloticus*) GIFT terhadap nisbah jenis kelaminnya. *Skripsi*. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. 38 hlm.
- Tian H, Yun L, Wang W, Wu P, Ru S. 2012. Exposure to monocrotophos pesticide during sexual development causes the feminization/demasculinization of the reproductive traits and a reduction in the reproductive success of male guppies (*Poecilia reticulata*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(2):163-170.
- Wang XG, Orban L. 2007. Anti-Mullerian hormone and 11beta-hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males. *Developmental Dynamics*, 236(5): 1329-1338.
- Zairin M. 2003. Endokrinologi dan perannya bagi masa depan perikanan Indonesia [Orasi Ilmiah]. Institut Pertanian Bogor.
- Zhang X, Gao L, Yang K, Tian H, Wang W, Ru S. 2013. Monocrotophos pesticide modulates the expression of sexual differentiation genes and causes phenotypic feminization in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 157(1): 33-40.