



Maskulinisasi Ikan Nila Melalui Perendaman Larva pada Suhu 36 °C dan Kadar Residu 17 α -metiltestosteron dalam Tubuh Ikan

Afpriyaningrum MD¹, Soelistyowati DT², Alimuddin², Zairin Jr M², Setiawati M², Hardiantho D³

¹Program Studi Ilmu Akuakultur, Sekolah Pascasarjana IPB

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

³Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar, Sukabumi, Jawa Barat.

Corresponding author: dissa.an@gmail.com; alimuddin@ipb.ac.id

ABSTRACT

The residue of 17 α -methyltestosterone (MT) in fish has been a concern related to food and the environment safety. This study aimed to determine sex ratio of Nile tilapia treated by MT immersion at 36 °C water temperature, and measure the level of testosterone in fish body. Three hundreds of ten-day-old post hatched larvae was immersed in one liter of water containing 2 mg MT, at 26 °C and 36 °C. Immersion was performed for 2 and 4 hours. The results showed that immersion at 36 °C and increasing immersion time increased male percentage. Higher male percentage was obtained in treatment 4 hours immersion at 36 °C (92.5% male) and the effective treatment 4 hours immersion at room temperature. By ELISA method, testosterone level in MT treated fish decreased sharply to 88.2% at one month after immersion, and being the same as control without MT immersion. Thus, masculinization in tilapia could be performed by MT immersion at 36 °C water temperature for 4 hours, and it is most likely that no MT residual in fish after one month post immersion.

Keywords: Nile tilapia, sex reversal, temperature, 17 α -methyltestosterone

1. Pendahuluan

Ikan nila *Oreochromis niloticus* merupakan komoditas ikan air tawar ekonomis tinggi, daya hidup tinggi dan memiliki dimorfisme kelamin di mana pertumbuhan ikan nila jantan lebih cepat daripada ikan betina sehingga budidaya monoseks jantan lebih menguntungkan dua kali lipat (Srisakultiew dan Komonrat 2013; Dagne *et al.* 2013). Hal ini disebabkan karena energi reproduksi dialihkan untuk pertumbuhan somatik (Beardmore *et al.*, 2001; Firdous *et al.*, 2011).

Produksi monoseks jantan menggunakan hormon androgen 17 α -metiltestosteron (MT) dilaporkan paling efektif menggunakan metode perendaman larva pada masa diferensiasi kelamin atau periode kritis, yaitu otak larva masih dalam keadaan bipotensial mengarahkan pembentukan kelamin secara morfologi, tingkah laku maupun fungsinya (Carman *et al.*, 2008; Megbowon dan Mojekwu 2014). Perendaman stadia larva ikan nila umur 10 dan 14 hari dengan 1.800 μ g/L MT selama 4

dan 8 jam menghasilkan jantan 91,6% dan 98,3% (Wasserman dan Afonso, 2003; Srisakultiew dan Komonrat, 2013). Pada ikan gapi diperoleh 100% jantan dengan perendaman menggunakan dosis 2 mg/L selama 24 jam (Zairin *et al.*, 2002). Namun, penggunaan MT telah dilarang di Indonesia berdasarkan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No: KEP.52/MEN/2014 karena potensi bahaya yang ditimbulkannya. Dalam *International Standards for Responsible Tilapia Aquaculture*, penggunaan metil dan etiltestosteron masih boleh dipergunakan (WWF, 2009). Beberapa peneliti melaporkan bahwa hormon MT cepat dimetabolisme dan diekskresikan. Konsentrasi MT di plasma ikan nila menurun pada jam ke-22 setelah penghentian pakan (Rincharde *et al.*, 1999). Konsentrasi MT di tubuh ikan setelah 24 jam menjadi 2,5-3,0% (Curtis *et al.*, 1991) dan setelah 100 jam berkurang menjadi 1% (Johnstone *et al.*, 1983).

Selain dengan MT, maskulinisasi dapat dilakukan dengan manipulasi suhu lingkungan berupa peningkatan suhu

(Bowman *et al.*, 2012). Suhu lingkungan berperan dalam seks diferensiasi karena sifat nila yang termosensitif (Barroiller *et al.*, 1995). Semakin tinggi suhu, maka rasio kelamin jantan semakin tinggi (Tessema *et al.*, 2006). Perendaman larva nila berumur 10, 20, 30 hari setelah pembuahan pada suhu 36,00-36,83 °C dengan lama perendaman 10, 20, 30 hari menghasilkan jantan sekitar 80% (Tessema *et al.*, 2007; Azaza *et al.* 2008; El-Fotoh *et al.*, 2014). Maskulinisasi dengan kombinasi perlakuan hormon MT dan suhu dapat dilakukan untuk memaksimalkan produksi ikan jantan dan meminimalkan penggunaan MT. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas penggunaan MT dosis rendah (2 mg/L) pada suhu 26 °C dan 36 °C melalui perendaman larva dalam waktu berbeda (2 dan 4 jam) terhadap keberhasilan alih kelamin jantan ikan nila, dan pengukuran residu testosteron pada tubuh ikan setelah perendaman dan selama pemeliharaan benih hingga umur 90 hari.

2. Metode Penelitian

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2015 sampai Juni 2016. Penelitian dilakukan di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar Sukabumi dan Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB.

Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan dua perlakuan suhu dan lama perendaman. Suhu yang digunakan adalah suhu ruang (26 °C) dan 36 °C. Lama perendaman yang diuji adalah 2 dan 4 jam, dengan kepadatan 300 ekor/L. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

Perlakuan maskulinisasi dan masa pemeliharaan

Larva ikan nila varietas SULTANA berumur 10 hari setelah menetas (bobot rerata 0,01 mg/ekor; panjang 0,8 cm) direndam dalam air mengandung MT (17 α -methyl-4-androsterone-17 α -ol-3-one, C₂₀H₃₀O₂; Argent, Philippines) dengan dosis 2 mg/L. Perendaman dilakukan menggunakan plastik berukuran 3 kg, diisi larva sebanyak 300 ekor/L. Ikan dipelihara

dalam akuarium (40x60x60 cm³) sampai hari ke-30 setelah perendaman. Selanjutnya benih dipindahkan ke hapa (2x1x1m³) sampai hari ke-90 setelah perendaman. Untuk menjaga kualitas air, akuarium dilengkapi dengan aerasi dan dilakukan pergantian air sebanyak 75% setiap 2 hari sekali. Kualitas air media pemeliharaan ikan nila selama penelitian, yaitu suhu berkisar 25-29 °C, oksigen terlarut 7,45-7,5 mg/L, pH 6,2-7,5 dan amonia 0,29-0,31 mg/L.

Pakan komersial berupa serbuk diberikan ketika kuning telur habis sampai hari ke-25. Setelah umur 25 hari larva diberi pakan komersial dengan konsentrasi protein 40%. Pemberian pakan dilakukan secara *ad satiation* dengan frekuensi pemberian tiga kali sehari. Sampling dilakukan setiap 15 hari untuk parameter laju pertumbuhan harian, 30 hari sekali untuk kualitas air dan konsentrasi MT di tubuh ikan. Tingkat kelangsungan hidup dihitung setelah perlakuan perendaman, dan pada akhir pemeliharaan (90 hari), serta penghitungan nisbah kelamin jantan pada akhir penelitian.

Ekstraksi dan pengukuran konsentrasi hormon testosteron

Pengukuran kadar testosteron dilakukan menggunakan metode ELISA /enzyme-linked immunosorbent assay (Risto *et al.* 2013) dengan kit RIDASCREEN metiltestosteron mengikuti prosedur dalam manual. Kadar testosteron diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

Pengukuran konsentrasi glukosa darah

Konsentrasi glukosa darah diukur untuk menguji pengaruh pemberian perlakuan kombinasi MT dan suhu terhadap tingkat stres larva. Kadar glukosa darah diekstraksi menggunakan kit *glucose-pap* (Germany) dengan prosedur sesuai manual. Konsentrasi glukosa darah diperiksa sesaat setelah perendaman. Sampel ikan yang digunakan sebanyak 300 ekor. Ikan digerus menggunakan *mortar* dan *pestle*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan plasma ikan. Sampel plasma sebanyak 10 μ L dicampur dengan 10 μ L akuades dan 1.000 μ L reagen, kemudian dihomogenkan dengan vortex. Inkubasi dilakukan selama 20 menit pada suhu 20-25 °C. Absorbansi

dibaca dan dibandingkan dengan blanko pada panjang gelombang 546 nm.

Identifikasi nisbah kelamin

Identifikasi nisbah kelamin dilakukan di akhir pemeliharaan (90 hari setelah perendaman). Sampel yang diambil sebanyak 30% dari populasi. Pemeriksaan nisbah kelamin dilakukan secara histologi (Soelistyowati *et al.*, 2007).

Analisis data

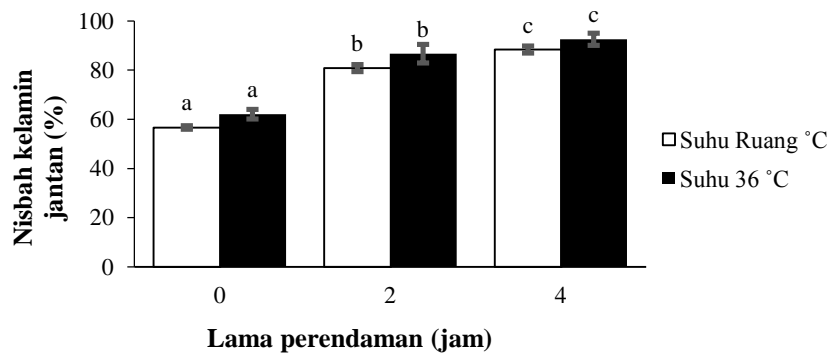
Data ditabulasi dan dianalisis dengan program MS. Office Excel 2010 dan uji two-way ANOVA pada P=0,05 menggunakan program SPSS versi 16. Perlakuan yang

berbeda nyata diuji lanjut dengan uji Duncan.

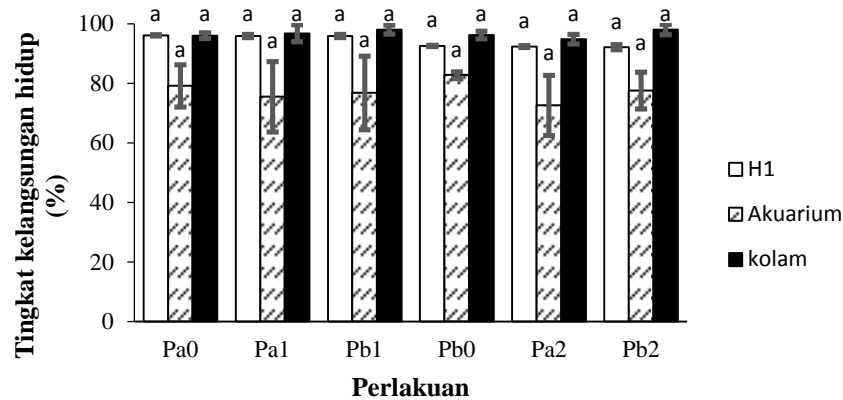
3. Hasil

Nisbah kelamin jantan

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa nisbah kelamin jantan (NKJ) pada perlakuan dua dan empat jam berbeda nyata dengan kontrol (P<0,05) (Gambar 1), sedangkan untuk perlakuan suhu ruang dan 36 °C pada dua dan empat jam tidak berbeda nyata antarperlakuan MT, tetapi berbeda nyata (P>0,05) dengan kontrol.



Gambar 1. Nisbah kelamin jantan yang direndam pada fase larva dalam air suhu berbeda dan mengandung hormon 17 α -metilttestosteron, dengan lama waktu perendaman berbeda.



Gambar 2. Tingkat kelangsungan hidup (TKH) ikan nila yang direndam pada fase larva dalam air suhu berbeda, dan mengandung hormon 17 α -metilttestosteron (MT), dengan lama waktu berbeda. H1 dan H90: TKH pada hari pertama dan hari ke-90 pascarendam. Pa0: Perendaman tanpa MT pada suhu ruang, Pa1: Perendaman MT pada suhu ruang selama 2 jam, Pb1: Perendaman MT pada suhu ruang selama 4 jam, Pb0: Perendaman tanpa MT pada suhu 36°C, Pa2: Perendaman MT pada suhu 36°C selama 2 jam, Pb2: Perendaman MT pada suhu 36°C selama 4 jam.

Tingkat kelangsungan hidup

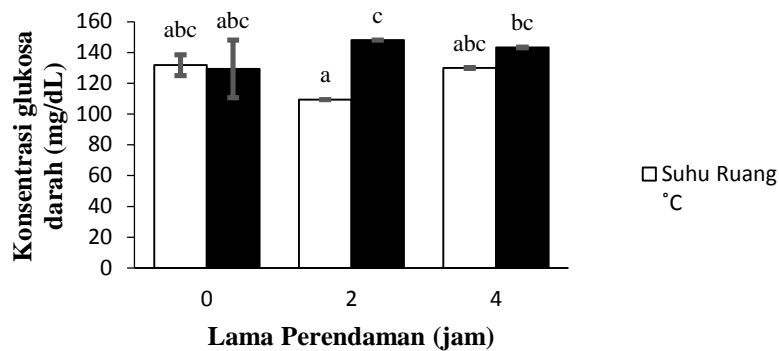
Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat kelangsungan hidup (TKH) ikan pada H1 (setelah perendaman) sebanyak 92,11-96,11%, TKH di akuarium sebanyak 72,56-82,72%, dan TKH di kolam sebanyak 94,78-98,00%. TKH ikan tidak berbeda nyata pada semua perlakuan ($P>0,05$) (Gambar 2).

Konsentrasi glukosa darah

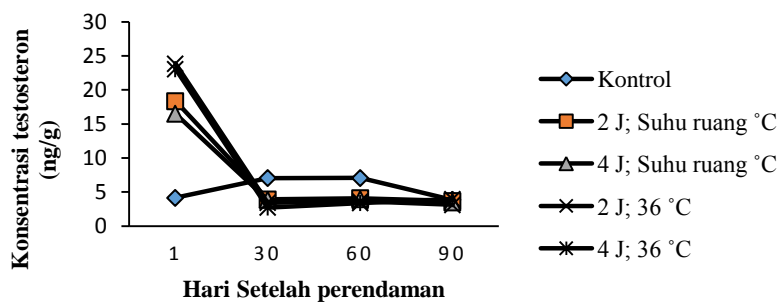
Konsentrasi glukosa darah setelah perendaman pada ikan menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$) kecuali antara perendaman pada suhu ruang dan suhu 36 °C pada lama perendaman 2 jam (Gambar 3).

Konsentrasi testosteron

Dengan menggunakan metode ELISA, konsentrasi MT pada air yang mengandung 2 mg MT yang dilarutkan dalam 1-L air adalah 100,18 ng/mL, sedangkan konsentrasi setelah perendaman pada perlakuan suhu 36 °C yaitu 23,05-23,86 ng/g, sama dengan kadar MT pada suhu ruang (16,49-18,35 ng/g) (Gambar 4). Konsentrasi testosteron pada masa pemeliharaan hari ke-30 setelah perendaman menurun tajam pada semua perlakuan MT, dan cenderung stabil hingga hari ke-90. Pada hari pertama konsentrasi testosteron pada ikan kontrol sebanyak 4,15 ng/g, cenderung meningkat pada hari ke-30 dan ke-60, kemudian menurun kembali setelah hari ke-90.



Gambar 3. Konsentrasi glukosa darah pada ikan nila sesaat setelah perendaman dalam air suhu ruang (bar putih) dan 36 °C (bar hitam) mengandung hormon 17 α -metiltestosteron.



Gambar 4. Konsentrasi testosteron dalam tubuh ikan nila yang direndam pada fase larva dalam air suhu berbeda (26 °C, dan 36 °C) dan mengandung hormon 17 α -metiltestosteron (MT), dengan lama waktu berbeda. Lama perendaman 2 jam (2 J), dan 4 jam (4 J).

3. Pembahasan

Kombinasi lama perendaman dan suhu meningkatkan jenis kelamin jantan (Gambar 1). Selanjutnya, lama perendaman berpengaruh signifikan terhadap persentase kelamin jantan ikan nila. Hasil yang diperoleh relatif sama dengan yang dilaporkan oleh Wassermann dan Afonso (2003). Namun demikian, pada penelitian ini perendaman dilakukan satu kali pada larva umur 10 hari, air suhu 36°C mengandung MT dosis 2 mg/L, kepadatan 300 ekor/L, selama 4 jam menghasilkan ikan nila jantan 92,5%. Wassermann dan Afonso (2003) merendam larva umur 10 dan 14 hari (dua kali perendaman) setelah penetasan menggunakan MT 1,8 mg/L, sebanyak dua kali perendaman dengan kepadatan 125 ekor/L, menghasilkan ikan nila jantan 98,3%. Kelangsungan hidup ikan kontrol yang tidak direndam, dan direndam MT adalah sama (Gambar 2). Hasil yang diperoleh ini sejalan dengan laporan Chakraborty *et al.*, (2011) bahwa pemberian MT tidak berpengaruh terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan nila.

Selain pengaruh MT, efek suhu lingkungan telah dilaporkan dapat meningkatkan nisbah kelamin jantan (Tessema *et al.*, 2006; Azaza *et al.*, 2008; El-Fotoh *et al.* 2014). Mekanismenya adalah melibatkan enzim aromatase (Piferrer 2011). Hal yang sama juga telah kami buktikan dengan menganalisis ekspresi gen penyandi aromatase (Fauzan *et al.*, 2016).

Tingkat kelangsungan hidup yang sama pada penelitian ini didukung oleh kadar glukosa darah yang secara umum adalah sama pada semua perlakuan (Gambar 3). Sementara itu, bila perendaman dilakukan dua kali, akibat pengambilan yang kurang hati-hati, dapat menyebabkan kelangsungan hidup larva menjadi lebih rendah. Dengan demikian, maskulinisasi ikan nila dapat dilakukan melalui perendaman MT satu kali dalam air suhu 36°C dan menggunakan jumlah larva lebih banyak. Selain itu, dengan pertimbangan efisiensi biaya, optimasi padat perendaman masih dapat dilakukan pada penelitian berikutnya.

Seperti disajikan pada Gambar 1, perendaman pada suhu 36°C meningkatkan persentase ikan jantan dibandingkan dengan suhu 26°C. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Tessema *et al.*, (2007), Azaza *et al.*, (2008) dan El-Fotoh *et al.*,

(2014). Namun demikian, pada penelitian ini perendaman dilakukan lebih singkat (2 dan 4 jam). Tessema *et al.* (2007) melakukan perendaman larva ikan nila umur 10 hari selama 10-30 hari. Kelangsungan hidup ikan nila pada penelitian ini (71,33%) relatif sama dengan yang dilaporkan oleh Azaza *et al.*, (2008) dan El-Fotoh *et al.*, (2014), yaitu 65%.

Pada perlakuan lama perendaman 4 jam, kadar glukosa darah ikan perlakuan adalah sama, sedangkan pada perlakuan perendaman 2 jam kadar glukosa darah pada ikan perendam suhu 26 °C lebih rendah daripada perlakuan suhu 36 °C (Gambar 3). Hal tersebut diduga karena ikan nila belum pulih dari stres akibat perendaman dalam jangka waktu jam pascarendam. Selanjutnya, kadar glukosa yang lebih tinggi pada ikan perlakuan perendaman 2 jam dan suhu 36 °C daripada suhu 26 °C diduga merupakan respons stres ikan akibat suhu tinggi.

Metode ELISA digunakan pada penelitian ini untuk mengukur konsentrasi testosteron dalam tubuh ikan (Memmat *et al.*, 2015). Berdasarkan Gambar 4, kadar testosteron yang diserap tubuh ikan berkisar 16,49-23,86 ng/g. Selanjutnya, kadar testosteron yang diserap oleh larva ikan nila lebih tinggi pada suhu perendaman 36 °C daripada 26 °C. Pada suhu perendaman yang sama, perlakuan lama perendaman tidak terlalu mempengaruhi penyerapan testosteron oleh larva ikan nila. Pada Gambar 1, persentase ikan nila kelamin jantan pada perlakuan perendaman 2 jam pada suhu 26 °C dan 36 °C adalah sama, demikian juga antarperlakuan lama perendaman 4 jam. Persentase ikan nila jantan pada perlakuan perendaman 4 jam adalah lebih tinggi daripada perlakuan 2 jam (Gambar 1). Dengan demikian, kadar testosteron yang diserap oleh tubuh larva ikan nila mempengaruhi persentase kelamin jantan, dan suhu sangat mempengaruhi penyerapan testosteron.

Seperti ditunjukkan pada Gambar 4, kadar testosteron menurun tajam pada H30 setelah perendaman, dan setelah itu cenderung stabil hingga H90. Kadar testosteron ikan perlakuan MT pada H30 relatif lebih rendah daripada ikan kontrol. Hal tersebut menunjukkan bahwa residu MT tidak ada lagi dalam tubuh ikan nila pada H30. Penurunan kadar steroid yang cepat juga telah dilaporkan oleh Padian dan Kirankumar (2012), bahwa penurunan

steroid sangat cepat sewaktu di awal dan secara bertahap stabil. Tingkat penurunan kadar hormon tergantung pada spesies, kemurnian steroid yang digunakan, organ yang dideteksi dan protokol perlakuan. Pada penelitian ini deteksi testosteron dilakukan menggunakan seluruh tubuh ikan nila.

Konsentrasi MT pada H30 hingga H90 relatif stabil dan sama dengan ikan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa MT tidak selamanya terakumulasi di dalam tubuh. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa mengonsumsi ikan nila setelah H30 pascarendam relatif aman. Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Padian *et al.*, (2012) bahwa residu steroid pada ikan dewasa tidak berbahaya bagi manusia karena konsentrasinya rendah (<5 ng/g ikan). Selanjutnya, Rizkalla *et al.*, (2004) juga menyatakan bahwa tidak ada potensi bahaya pada orang yang memakan ikan yang telah diberi perlakuan pemberian MT melalui pakan sebanyak 30-120 mg/kg sewaktu larva dengan lama pemberian 28 jam. Megbowon dan Mojekwu (2014) juga mengatakan bahwa hormon ini tidak memberikan efek pada daging ikan ketika larvanya diberi perlakuan, tidak berbahaya bagi manusia, pada lingkungan steroid ini juga *biodegradable* dan *mineralized*.

Sebutir telur ikan mengandung sebanyak 3 ng testosteron (Rothbard *et al.* 1987). Jadi testosteron pada larva sudah ada sejak fase telur. Meningkatnya konsentrasi testosteron pada H30 dan H60 pada ikan kontrol sesuai dengan pendapat Nakamura (2013) bahwa konsentrasi testosteron akan meningkat sesuai dengan bertambahnya umur ikan dan akan mencapai puncaknya ketika ikan jantan matang gonad.

Terdeteksinya konsentrasi MT pada ikan kontrol menggunakan kit MT diduga terjadi silang reaktivitas antara MT dan testosteron alami pada tubuh. Kit MT yang digunakan memang berpotensi silang reaktivitas dengan testosteron sebanyak 10%. Silang reaktivitas ialah kemampuan mendeteksi suatu senyawa karena struktur kimia yang hampir mirip. Penggunaan ELISA dengan kit testosteron juga dapat mendeteksi konsentrasi MT dalam tubuh ikan.

4. Kesimpulan

Perendaman selama 4 jam pada larva ikan nila umur 10 hari dalam 2 mg/L MT pada suhu 36 °C menghasilkan jantan tertinggi (92,50%) dengan tingkat kelangsungan hidup 98%. Kadar testosteron dalam tubuh ikan perlakuan relatif sama dengan kontrol pada hari ke-30 pascarendam.

Daftar Pustaka

- Azaza, M.S., Dhraief, M.N., Kraiem, M.M. 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of Thermal Biology*. 33: 98-105.
- Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197: 283-301.
- Bowman, M.P., Bowker, J., Carty, D.G., Straus, D.L., Farmer, B.D., Mitchell, A.J., Ledbetter, C.K. 2012. The safety of 17 α -methyltestosterone administered in feed to larval Nile tilapia. *AADAP. Drug Research Information Bulletin*. Drib no. 28
- Cakraborty, S.B., Mazumdar, D., Chatterji, U., Banerjee, S. 2011. Growth of mixed-sex and monosex Nile tilapia in different culture systems. *Turkish Journal Fisheries and Aquatic Sciences* 11:131-138.
- Carman, O., Jamal, M.Y., Alimuddin. 2008. Pemberian 17 α -metiltestosteron melalui pakan meningkatkan persentase kelamin jantan lobster air tawar. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 7 (1): 25-32.
- Curtis, L.R., Diren, F.T., Hurley, M.D., Seim, W.K., Tubb, R.A. 1991. Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 99: 193-201.
- Dagne A, Degefu F, Lakew A. 2013. Comparative growth performance of mono-sex and mixed-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. in pond culture system at sabeta, Ethiopian.

- International Journal of Aquaculture 3 (7): 30-34.
- El-Fotoh, E.M.A., Ayyat, M.S., El-Rahman, G.A.A., Farag, M.E. 2014. Mono sex male production in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using different water temperature. Zagazig Journal Agriculture Research 41 (1): 1-8.
- Fauzan, A.L., Soelistyowati, D.T., Zairin, JrM., Hardiantho, D., Setiawati, M., Alimuddin. 2016 Oktober. Ekspresi gen aromatase, rasio kelamin, dan kinerja budidaya ikan nila yang direndam hormon 17α -metilttestosteron pada suhu 36 °C. Jurnal Akuakultur Indonesia. In Press.
- Firdous, Z., Masum, M.A., Ali, M.M. 2011. Influence of stocking density on growth performance and survival of monosex tilapia *Oreochromis niloticus* fry. International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture 4(2): 99-103.
- Johnstone, R., Macintosh, D.J., Wright, R.S. 1983. Elimination of orally administered 17α -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* tilapia and *Salmo gairdneri* rainbow trout juveniles. Aquaculture 35: 249-257.
- Megbowon, I., Mojekwu, T.O. 2014. Tilapia sex reversal using methyltestosterone (MT) and its effect on fish, man and environment. Biotechnology 13 (5): 213-216.
- Memmat, M.I., Reham, A.A., Omaima, M.D., Asmaa, E.H. 2015. Detection of methyltestosterone and trenbolone acetate hormones residue in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Benha Veterinary Medical Journal 28 (1): 276-280.
- Nakamura, M. 2013. Morphological and physiological studies on gonadal sex differentiation in teleost fish. Aqua-Bio Science Monographs 6 (1): 1-47.
- Padian, T.J., Kirankumar, S. 2012. Recent advances in hormonal induction of sex-reversal in fish. Journal of Applied Aquaculture 13:205-230.
- Piferrer, P. 2011. Endocrine control of sex differentiation in fish. In: *The sense, supporting tissue, reproduction, and behavior*. Farrell AP, Cech JJ, Richards JG, Stevens ED editor. Columbia, Canada (US). Encyclopedia of fish physiology: From genome to environment. Page: 1490-1499.
- Richard, J., Dabrowski, K., Garcia-Abiado, M.A. 1999. Uptake and depletion of plasma 17α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: effect on plasma steroids and sex reversal. Steroids 64 (8): 518-525.
- Risto, U., Zehra, H.M., Biljana, S.D., Elizabeta, D.S., Aleksandra, T., Velimir, S. 2013. Validation of screening method for determination of methyltestosterone in fish. Macedonian Veterinary Review 36(1): 19-23.
- Rizkalla, E.H., Haleem, H.H., Abdel-Halim, A.M.M.R.H. 2004. Evaluation of using 17α -methyltestosterone for monosex *Oreochromis niloticus* fry production. Egyptian German Society of Zoology 43(a): 315-335.
- Rothbard, S., Moav, B., Yaron, Z. 1987. Changes in steroid concentrations during sexual androgenesis in tilapia. Aquaculture 61: 59-74.
- Safir, M., Alimuddin, Zairin, JrM., Setiawati, M., Suprayudi, M.A. 2015. Productivity of MT-treated Nile tilapia culture using different protein feed levels and supplemented with recombinant fish growth hormone. Strengthening science and technology towards the development of blue economy. Internasional seminar. 2015 Desember 3; Pekanbaru, Indonesia. Hlmn 7.
- Soelistyowati, D.T., Martati, E., Arfah, H. 2007. Efektivitas madu terhadap pengarahannya kelamin ikan gapi *Poecilia reticulata* Peters. Jurnal Akuakultur Indonesia 6(2): 155-160.
- Srisakultiew, P., Kamornrat, W. 2013. Immersion of 17α -methyltestosterone dose & duration on tilapia masculinization. Journal of Fisheries Sciences 7(4): 302-308.
- Tessema, M., Muller-Belecke, A., Horstgen-Schwark, G. 2007. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of

- Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture* 258: 270-277.
- Wassermann, G.J., Afonso, L.O.B. 2003. Sex reversal in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus by androgen immersion. *Aquaculture Research* 34: 65-71.
- WWF (World Wildlife Fund). 2009. International standards for responsible tilapia aquaculture. *Tilapia Aquaculture Dialogue*. WWF. 38 pp.
- Zairin, JrM., Yuniarti., Dewi, R.R.S.P.S., Sumantadinata, K. 2002. Pengaruh waktu perendaman induk di dalam larutan hormon 17α -metilttestosteron terhadap nisbah kelamin anak ikan gapi *Poecilia reticulata* Peters. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 1(1): 31-35.