

## Kadar Hormon Estradiol dan Testosteron Ikan Ringau (*Datnioides microlepis*) serta Sifat Monomorfisme

AHMAD MUSA<sup>1</sup>, MOCHAMMAD ZAMRONI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Riset Budidaya Ikan Hias

Jl. Perikanan No. 13 Depok, Indonesia. 16436

Email: ahmadmusasaid@knp.go.id

<sup>2</sup>Balai Riset Budidaya Ikan Hias

Jl. Perikanan No. 13 Depok, Indonesia. 16436

Email: mohammadzamroni.knp@gmail.com

### ABSTRACT

Ringau fish or tigerfish (*Datnioides microlepis*) was a fish which sexually cannot be determined morphologically (monomorphic). This study was aimed to determine the concentration of the hormones estradiol and testosterone in the blood of ringau fish related to gender. Six ringau fish with a total length of 20-25 cm and a weight of 121-260 consisting of 2 males, 2 females and 2 unknown sexes. For identification, each fish was tagged with a chip that was implanted on the back. Analysis of the hormone estradiol-17 $\beta$  and testosterone in fish blood was carried out using the ELISA technique using a commercial kit. The results showed that both males and females had the hormones estradiol and testosterone in an irregular pattern. As for fish that were stimulated by the hormone estradiol, there was a decrease in testosterone. This result confirms the previous assumption that this fish is monomorphic

Keywords: *Datnioides microlepis*; estradiol; monomorphic; testosterone

### INTISARI

Ikan ringau atau tigerfish (*Datnioides microlepis*) merupakan ikan yang belum dapat ditentukan jenis kelaminnya secara morfologi (monomorfik). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi hormon estradiol dan testosteron dalam darah ikan ringau berkaitan dengan jenis kelamin. Enam ekor ikan ringau dengan panjang total 20-25 cm dan bobot 121-260 yang terdiri dari 2 jantan, 2 betina dan 2 yang belum diketahui seksnya. Untuk identifikasi masing-masing ikan diberi *tag chip* yang diimplan pada bagian punggung. Analisis hormon estradiol-17 $\beta$  dan testosteron dalam darah ikan dilakukan dengan teknik ELISA menggunakan kit komersil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik jantan maupun betina memiliki hormon estradiol dan testosteron dengan pola yang tidak beraturan. Adapun pada ikan yang diberi rangsangan hormon estradiol terjadi penurunan testosteron. Hasil ini menguatkan dugaan sebelumnya bahwa ikan ini bersifat monomorfik

Kata kunci: *Datnioides microlepis*; estradiol; monomorfik; testosteron.

### PENDAHULUAN

Ikan ringau atau *tigerfish* merupakan ikan hias komoditas ekspor bernilai tinggi. Ikan yang bentuknya agak pipih dengan sirip yang berbentuk seperti duri ini menarik karena badannya yang bergaris-garis lebar seperti pita melintang dengan warna hitam dan putih kekuningan agak abu-abu. Mulutnya meruncing dan agak lebar. Tingkah lakunya yang tenang namun atraktif saat memangsakan pakan yang diberikan menjadi daya Tarik lain ikan hias ini. Ikan ringau termasuk dalam Familia Datnioididae, dan ikan ini juga dikenal dengan nama *Coius microlepis* (Kottelat *et al*,

1993). Jumlah pita bervariasi, tergantung dari spesies.

Spesies ini dijumpai di daerah Sumatera dan Kalimantan. Ukuran maksimal dari ikan ini di alamnya adalah sekitar 60 cm, tetapi bila di akuarium hanya dapat mencapai 40 cm (Kottelat *et al.* 1993, Axelrod *et al.* 1995). Menurut Axelrod *et al.* (1995) dan Sakurai *et al.* (1990) ikan ini akan hidup baik pada suhu 26–27<sup>0</sup> C, dengan air yang sedikit asam sampai netral (pH 6,5–7,0). habitat ikan ringau di Danau Sentarum adalah suhu berkisar antara 28,6-30,7<sup>0</sup>C, kadar oksigen terlarut berkisar antara 5,29-7,76 ppm, pH berkisar antara 4,55-5,92, kesadahan berkisar antara 12,2-61,02

ppm, dan alkalinitas berkisar 12,2-24,41 ppm, TDS berkisar antara 0,0029-0,0074, konduktivitas air berkisar antara 10,70-26,60, kadar amoniak 0,56-1,63 ppm, kadar nitrit 0-0,75 ppm, kadar nitrat 0-10 ppm, dan kadar fosfat 0,1-1 ppm (Zamroni *et al.*, 2015). Ikan ini juga ditemukan di sungai Tawang yang merupakan bagian Danau Sentarum (Nurdawati, 2008). Pakan yang disukai adalah pakan alami seperti cacing sutera dan udang kecil. Termasuk ikan yang agak agresif terutama bila dicampur dengan ikan yang lebih kecil.

17  $\beta$ -estradiol merupakan hormon steroid C-18 (berat molekul: 272, 4 Dalton) yang umumnya diproduksi oleh ovarium atau gonad betina dan juga dapat diproduksi dalam jumlah kecil pada testis dan kelenjar adrenal. Testosteron atau androgen merupakan hormon seks steroid yang dominan pada testis jantan. Hormon ini mempunyai berat molekul 288,41 Dalton. Proses sintesis testosteron berlangsung di sel *Leydig interstitial* pada testis yang memberikan respon pada *Interstitial Cell Stimulating Hormone (ICSH)*, atau yang lebih dikenal dengan *Luteinizing Hormone* (Braunstein, 1997). Rohmy *et al.* (2012) menyatakan bahwa berdasarkan ciri morfologi ikan Tiger fish merupakan ikan yang memiliki sifat monomorfik. Penelitian ini bertujuan memvalidasi fakta tersebut dengan cara membandingkan antara jenis kelamin dengan profil kandungan hormon estradiol dan testosteronnya.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Balai Riset Budidaya Ikan Hias–Depok. Ikan uji yang digunakan berupa enam ekor ikan ringau dengan panjang total 20-25 centimeter dan bobot 121-260 yang terdiri dari dua jantan diberi label J1 dan J2, dua betina diberi label B1 dan B2 serta dua yang belum diketahui seksnya (U). Satu ekor ikan yang belum diketahui kelaminnya diberi rangsangan hormon estradiol 50 mg/kg bobot tubuh untuk diketahui efeknya, darahnya diambil pada periode hari ke. Pengamatan dilakukan pada parameter kandungan hormon estradiol dan testosteron.

Penentuan konsentrasi estradiol dan testosteron dihitung dengan teknik *Enzyme linked immune assay (ELISA)* menggunakan kit komersil, dengan *limit deteksi* 0–3200 pg/mL untuk estradiol (Biomatik) dan 0 – 1600 ng/mL untuk testosteron (DRG).

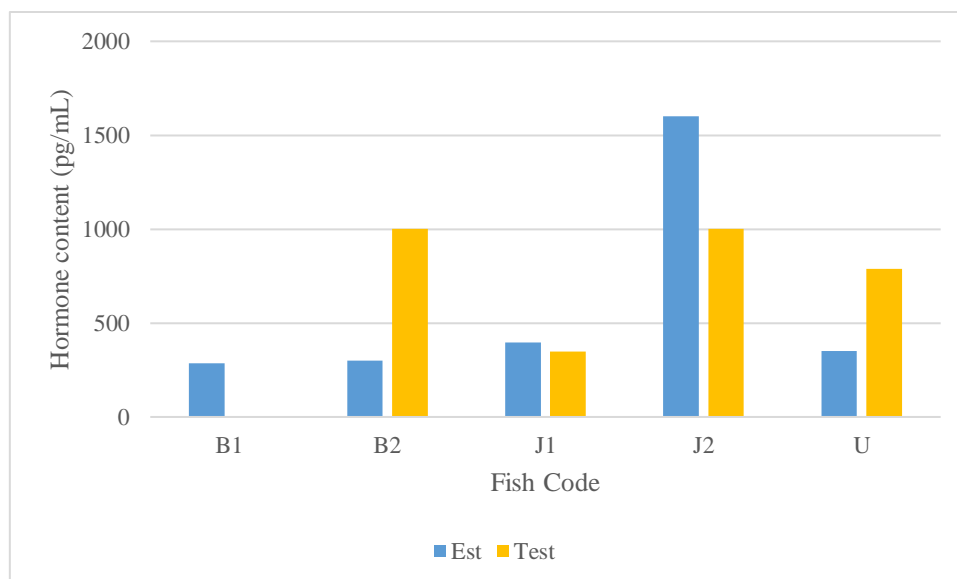
Analisis konsentrasi estradiol darah menggunakan kit ELISA BIOMATIK dengan tahapan kerja sebagai berikut: 1) *Microwell* yang telah dilapisi dengan anti-Estradiol antibodi (*polyclonal*) disiapkan; 2) 25  $\mu$ l larutan kalibrasi, kontrol dan sampel uji dimasukkan dengan menggunakan mikrotip baru ke dalam sumur yang sudah ditentukan dan dirangkap dua; 3) 200  $\mu$ l *enzyme conjugate* (0,03% Proclin 300, 0,015% 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane (BND) dan 0,010% 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (MIT)) ditambahkan ke dalam setiap sumur, didiamkan selama 10 detik agar tercampur secara sempurna; 4) Diinkubasi selama 120 menit pada suhu ruang; 5) Larutan yang terdapat pada sumur dikeluarkan dengan cepat, kemudian sumur dibilas sebanyak tiga kali dengan *wash solution* (400  $\mu$ l tiap sumur) yang telah diencerkan. Larutan yang ada pada sumur dibuang dengan membalikkan sumur pada kertas penyerap air untuk menghilangkan sisa larutan pada sumur. Sensitivitas dan ketepatan uji ini sangat dipengaruhi oleh ketepatan pada proses pembilasan. 6) 100  $\mu$ l *substrate solution* (Tetramethylbenzidine (TMB)) ditambahkan ke dalam masing-masing sumur; 7) Diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit; 8) 50  $\mu$ l *stop solution* (0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ditambahkan ke dalam masing-masing sumur untuk menghentikan reaksi enzimatik; 9) Hasil dibaca pada panjang gelombang 450 $\pm$ 10 nm pada ELISA *reader* 10 menit setelah pemberian *stop solution*; dan 10) Nilai kandungan konsentrasi estradiol dihitung secara otomatis dengan menggunakan software Gen 5.

Analisis testosteron menggunakan ELISA kit DRG dengan tahapan sebagai berikut: 1) Jumlah yang diinginkan dari *well* microtiter disiapkan; 2) 25  $\mu$ L masing-masing standar, kontrol, dan sampel dimasukkan dalam sumur yang sesuai menggunakan mikrotip *disposable*; 3) 200  $\mu$ L enzim konjugat dimasukkan ke dalam masing-masing *well*

dengan hati-hati, dibiarkan selama 10 detik agar tercampur sempurna; 4) Selama 60 menit diinkubasi pada suhu kamar (tanpa menutupi mikroplate); 5) Isi *well* dibuang, lalu dibilas 3 kali dengan *wash solution* yang diencerkan (400  $\mu$ L per sumur), mikroplate dihentakkan pada kertas penyerap untuk menghilangkan sisa tetesan; 6) 200  $\mu$ L larutan substrat dimasukkan ke setiap *well*; 7) Mikroplate diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar; 8) Reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu$ L *stop solution* ke setiap sumur; 9) Absorbansi (OD) setiap sumur pada 450  $\pm$  10 nm diukur dengan pembaca pelat mikrotiter 10 menit setelah penambahan *stop solution*; dan 10) Nilai kandungan konsentrasi estradiol dihitung secara otomatis dengan menggunakan software Gen 5. Kandungan hormon estradiol dan testosteron ikan uji kemudian dibandingkan dengan jenis kelaminnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan estradiol dan testosteron pada ikan betina dan jantan Ringau (*Datnioides microlepis*) tidak memiliki pola yang jelas. Kandungan estradiol ikan Betina 1 (B1) sebesar 286,8 pg/mL sedang kadar testosteronnya tidak terukur atau terlalu kecil hingga tidak masuk dalam limit deteksi kit. B2 memiliki testosteron 1002 pg/mL, lebih tinggi dibanding estradiolnya yang hanya 300,9 pg/mL. Kedua ekor ikan jantan J1 dan J2 memiliki estradiol yang lebih tinggi dibanding testosteron. Konsentrasi estradiol pada ikan J1 sebesar 395,4 pg/mL sedang testosteronnya 349,1 pg/mL. Sedang ikan J2, konsentrasi estradiol dan testosteronnya masing-masing sebesar 1600,9 dan 1002 pg/mL. Ikan yang belum diketahui kelaminnya (U) menunjukkan testosteron sebesar 789,4 pg/mL, lebih tinggi dibanding estradiolnya yang hanya 351,9 pg/mL.



Gambar 1. Estradiol and testosterone content on each fish

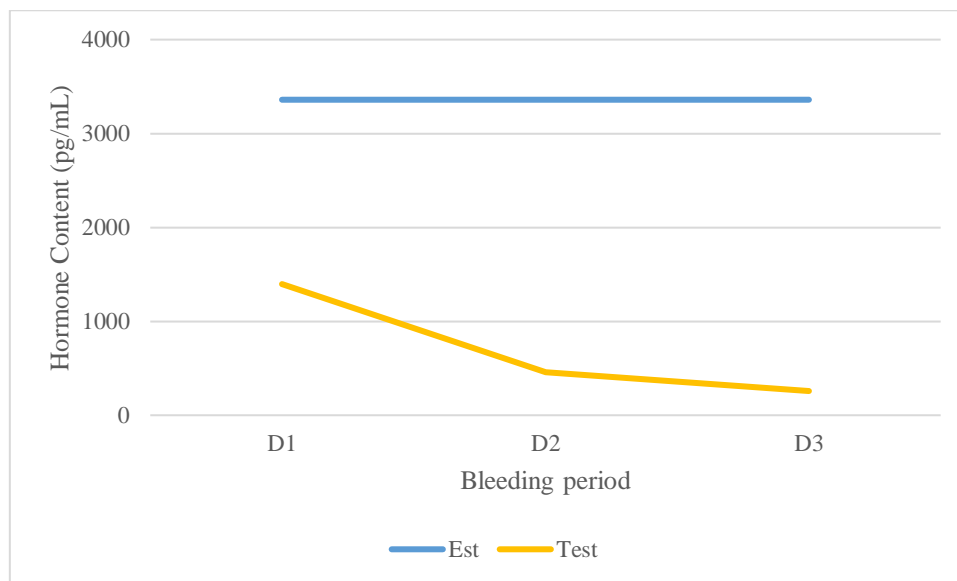
Konsentrasi hormon steroid yang janggal dapat menjadi *biomarker* akan adanya gangguan endokrin pada ikan (Jobling & Tyler 2003). Data yang dipublikasikan tentang efek hormon steroid pada fungsi reproduksi kadang bertolak belakang (Zlabek *et al.*, 2009). Dalam ikan betina, E2 dan T adalah steroid seks plasma dominan selama oogenesis, sementara T dan 11- ketotestosterone (11-KT) meningkat

selama spermatogenesis pada jantan (Skjæraasen *et al.*, 2004). Baik reseptor estrogen dan androgen telah diidentifikasi dalam perkembangan awal gonad ikan, keduanya berfungsi untuk mekanisme aksi steroid eksogen pada diferensiasi gonad (Devlin & Nagahama 2002).

Ikan uji yang diberi rangsangan hormon estradiol menunjukkan peningkatan konsentrasi

estradiol yang melebihi limit deteksi yaitu di atas 3200 pg/mL. Sedang konsentrasi testosteronnya menurun dari hari ke-1 hingga hari ke-3 yaitu dari 1396,7 menjadi 258 pg/mL. peningkatan kandungan hormon estradiol dalam darah calon induk ikan kerapu bebek yang diberi estradiol melalui pakan cukup tinggi (1229 pg/mL) setelah dua bulan dan 1282 setelah empat bulan perlakuan (Muzaki *et al.*,

2013) namun masih lebih rendah dibanding konsentrasi yang terukur pada perlakuan ini. Konsentrasi plasma 17- $\beta$ -estradiol pada betina dan jantan ikan Catfish (*Rhamdia quelen*) yang diberi 10mg E2 kg<sup>-1</sup> bobot tubuh memiliki kesamaan. Pada ikan jantan, tidak terdapat perbedaan antara kontrol dan dan yang diberi 0,1 atau 1 mg E2 kg<sup>-1</sup> bobot tubuh (Costa *et al.*, 2010).



Gambar 2. Estradiol and testosterone content on estradiol stimulated fish

Adanya perubahan selisih konsentrasi hormon ini mungkin disebabkan terdiferensiasinya testosteron menjadi estradiol oleh enzim aromatase hati (Utiah, 2002). Pada ikan (teleostei), testosteron dihasilkan oleh lapisan sel teka dari testis akan masuk ke dalam lapisan granulosa. Di dalam lapisan granulosa testosteron diubah menjadi estradiol dengan bantuan enzim aromatase (Sumantri, 2006). Kandungan testosteron dalam ikan balashark (*Balantiocheilus melanopterus*) berbanding lurus dengan curah hujan (Chumaidi *et al.*, 2008).

Di daerah tropis, umumnya ikan memijah pada musim penghujan seperti rainbow (*Telmatherina celebensis*-Boulenger) di Sulawesi (Syahroma, 2004). Induk patin (*Pangasius hypophthalmus*) yang betina memiliki hormon testosteron yang lebih tinggi dibandingkan hormon estradiolnya (Utiah, 2002). Sebaliknya yang terjadi pada ikan nila

(*Tilapia aurea*) dimana yang jantan memiliki hormon estradiol lebih tinggi dari yang betina (Terkatin-Shimony & Yaron, 1978). Konsentrasi testosteron lebih tinggi dibanding konsentrasi estradiol ikan arwana papua (*Scleropages jardinii*) dan tidak terdapat pengaruh bobot terhadap konsentrasi kedua hormone (Musa & Chumaidi, 2010).

Konsentrasi hormon estradiol pada ikan tilan merah (*Mastacembelus erythrotaenia*) berkisar antara 0,011–0,576 ng/mL, sedang konsentrasi hormon testosteron berkisar antara 0,065–0,793 ng/mL. Tidak terdapat korelasi antara bobot dengan konsentrasi hormon estradiol, sedang testosteron cenderung tinggi pada ikan uji yang berukuran kecil (Musa & Subandiyah, 2010). Fluktuasi konsentrasi hormon pada ikan arwana pinoh (*S. macrocephalus*) sangat bervariasi. Nilai estradiol ialah 0,3–1,82 ng/mL pada awal dan 0,87–16,25 pada akhir penelitian. Nilai

testosteron ialah 0,08-5,83 ng/mL pada awal dan 0,09-3,61 ng/mL pada akhir penelitian (Musa & Satyani, 2011).

Hasil ini menyulitkan untuk pendugaan kelamin berdasarkan perbandingan hormon estradiol dan testosteron, hingga menguatkan bahwa ikan Ringau memang bersifat monomorfik (Rohmy *et al.*, 2012a). Monomorfisme ini juga terdapat pada ikan arwana Pinoh (Musa & Satyani, 2010), arwana Papua (Musa & Chumaidi, 2011), Tilan merah (Musa & Subandiyah, 2011) dan *Tropheus moori* (Sefc, 2008). Sperma ikan Ringau sudah berkembang dengan baik pada ukuran panjang standar 20,0-24,9 cm, namun kuantitas dan kualitasnya masih fluktuatif, sedangkan induk betina produktif paling banyak ditemukan pada ukuran lebih dari 30,0 cm. Ikan ini sangat sulit memijah di luar habitat aslinya, dimana stimulasi pemijahan secara hormonal belum berhasil, salah satunya disebabkan oleh waktu matang gonad antara induk jantan dan betina tidak bersamaan (Rohmy *et al.*, 2012b). Meskipun demikian, upaya untuk mendeteksi kelamin sebelum pematangan gonad tetap perlu dilakukan, demi mempermudah pengaturan *sex* rasio dan pemijahan yang efektif.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik jantan maupun betina memiliki hormon estradiol dan testosteron dengan pola yang tidak beraturan. Adapun pada ikan yang diberi rangsangan hormon estradiol terjadi penurunan testosteron. Hasil ini menguatkan dugaan sebelumnya bahwa ikan ini bersifat monomorfik

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Riset Budidaya Ikan Hias untuk *support* fasilitas pengukuran hormon dan ibu Darti Satyani atas bimbingan dan arahnya.

## DAFTAR PUSTAKA

Axelrod, H.R., Axelrod, G.S., Burgess, W.E., Scott, B.M., Pronek, N. & Walls, J.G. 2004. *Atlas of Freshwater Aquarium Fishes*. Tenth edition. New Jersey: TFH Publications. 1158 pp.

- Braunstein, G.D. 1997, *Testes*. In Francis S.G and ordon J.S (eds), *Basic and Clinical Endocrinology*. 5th ed. London: Prentice-Hall International Inc.
- Chumaidi, Priyadi, A., dan Subagdja, J. 2008, Perkembangan Kematangan Gonad Induk Betina Balashark (*Balantiocheilus melanopterus* Bleeker) dengan Implantasi Hormon LHRH-a. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan V Hasil Penelitian Kelautan dan Perikanan*, Jurusan Perikanan dan Kelautan Universitas Gadjah Mada dan Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Hasil Kelautan dan Perikanan.
- Costa, D. D. M., Neto, F. F., Costa, M. D. M., Morais, R. N., Garcia, J. R. E., Esquivel, B. M., & Ribeiro, C. a O. 2010. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- $\beta$ -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comparative Biochemistry and Physiology-C Toxicology and Pharmacology*. vol. 151(2): 248-257. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.002>.
- Devlin RH, Nagahama Y 2000. Sex determination and sex differ- entiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. vol. 208: 191-364. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00057-1.
- Jobling S, Tyler CR 2003. Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure Appl Chem*. vol. 75: 2219-2234. doi:10.1351/pac20037511 2219.
- Kottelat, M., Whitten, A.J., Kartikasari, S.N. & Wirjoatmodo, S. 1993. *Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Jakarta: Periplus Edition.
- Musa, A. & Chumaidi. 2010. Konsentrasi hormon estradiol dan testosteron dalam darah ikan arwana Papua (*Scleropages jardinii*). *Prosiding Seminar Nasional "Green Technology for Better Future*. Malang, 20 November 2010.
- Musa, A. & Satyani, D. 2011. Konsentrasi hormon estradiol dan testosteron dalam darah ikan arwana pinoh (*Scleropages macrocephalus*). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur* 2011. Bali, 19-21 Juli 2011.
- Musa, A. & Subandiyah, S. 2011 Konsentrasi hormon estradiol dan testosteron dalam darah ikan tilan merah (*Mastacembelus erythrotaenia*). *Prosiding Forum Perairan Umum Indonesia* 8. Palembang, 26-27 September 2011.
- Muzaki, A., Wardana, IK., Sembiring, SBM., & Haryanti. 2013. Pemberian hormon estradiol secara oral terhadap perkembangan gonad calon induk ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur* 2013
- Nurdawati. 2008. Studi distribusi temporal ikan di sungai tawang Kalimantan Barat. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan V Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*, Universitas Gajah Mada. Yogyakarta, 26 Juli 2008

- Rohmy, S., Satyani, D., Cindelar, S., Himawan, Y. 2012. Determinasi seks ikan hias tiger fish (*Danioides microlepis*). *Seminar Nasional Ikan (Masyarakat Iktiologi Indonesia)*, Makassar.
- Rohmy, S., Satyani, D., Cindelar, S., Himawan, Y. 2012. Perkembangan gonad ikan hias tigerfish (*Danioides microlepis*) pada tiga kelompok ukuran berbeda. *Prosiding Indoaqua-Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*.
- Sakurai, A., Sakamoto, Y. & Mori, F. 1990. *Aquarium fish of the world. The comprehensive guide to 650 species*. San Fransisco: Chronicle Books, 288 pp.
- Sefc, K. M. 2008. Variance in reproductive success and the opportunity for selection in a serially monogamous species: Simulations of the mating system of *Tropheus* (Teleostei: Cichlidae). *Hydrobiologia*. vol. 615(1): 21–35. <http://doi.org/10.1007/s10750-008-9563-1>.
- Skjæraasen J, Salvanes AGV, Karlson Ø, Dahle R, Nilsen T, Norberg B. 2004. The effect of photoperiod on sexual maturation, appetite and growth in wild Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Physiol Biochem*. vol. 30:163–174. doi: 10.1007/s10695-005-4319-6.
- Sumantri D. 2006. Efektifitas Ovaprim dan Aromatase Inhibitor dalam Mempercepat Pemijahan pada Ikan Lele Dumbo *Clarias* sp. [Skripsi]. Bogor: Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Syahroma, H.N. 2004. Karakteristik reproduksi ikan endemik rainbow selebensis (*Telmatherina celebensis* Boulenger), diunduh dari [http://www.rudyc.com/PPS702-ipb/09145/syahroma\\_h\\_nasution.pdf](http://www.rudyc.com/PPS702-ipb/09145/syahroma_h_nasution.pdf) pada tanggal 24 Juli 2010.
- Terkatin-Shimony, A., dan Yaron, Z., 1978. Estrogens and estrogenic effect in *Tilapia aurea* (Cichlidae, Teleostei). *Annual Biology animalia, Biochemistry, Biophysics*. vol. 18(4): 1007–1012.
- Utiah, A. 2002. *Gonadal maturation of Asian catfish in captivity with stagnant water pond system*. Diunduh dari <http://www.ipb.ac.id> pada tanggal 25 Januari 2008.
- Zamroni M, Musa A, Sugito S, Sutrisna R, Zulkifli A. 2015. Kajian ekologis habitat dan pertumbuhan ikan ringau (*Danioides microlepis*) di Danau Sentarum, Kalimantan Barat. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. vol. 1: 707-713.
- Zlabek, V., Randak, T., Kolarova, J., Svobodova, Z., & Kroupova, H. 2009. Sex differentiation and vitellogenin and 11-ketotestosterone levels in chub, *Leuciscus cephalus* L., Exposed to 17 $\beta$ -Estradiol and Testosterone During Early Development, *Bull Environ Contam Toxicol*. vol. 82: 280–284. <http://doi.org/10.1007/s00128-008-9579-2>.