

ARTIKEL

PAPARAN JANGKA PENDEK PIL KELUARGA BERENCANA YANG MENGANDUNG ETINILESTRADIOL DAN LEVONORGESTREL TIDAK MEMPENGARUHI KANDUNGAN ENERGI IKAN SERIBU (*Poecilia reticulata*)

[*Short Term Exposure to Birth Control Pill Containing Ethinylestradiol and Levonorgestrel Does Not Affect Energy Content in Guppy Fish (Poecilia reticulata)*]

Rully Adi Nugroho*, Andreas Binar Aji Sukmana, Desti Christian Cahyaningrum, Yohanis Beanal, Andhika Ryan Wijaya

Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Jl. Diponegoro 52-60, Salatiga, Jawa Tengah 50711.

ABSTRAK

Hormon steroid sintetik yang terkandung dalam pil Keluarga Berencana (KB) telah menjadi kontaminan di perairan global. Hormon etinilestradiol dan levonorgestrel memberikan dampak negatif terhadap perkembangan, perilaku dan kelangsungan hidup ikan di lingkungan perairan. Di Indonesia, perhatian terhadap potensi dampak etinilestradiol dan levonorgestrel terhadap organisme bukan target perairan masih sangat terbatas. Studi ini dilakukan untuk memahami perubahan kandungan energi dalam lemak dan protein pada ikan seribu (*Poecilia reticulata*) yang terpapar estrogen dan progestogen (campuran etinilestradiol dan levonorgestrel). Ikan guppy jantan dipapar dengan enam konsentrasi campuran etinilestradiol/levonorgestrel yang berbeda, yaitu 0 ng/L etinilestradiol dan levonorgestrel, 0,3 ng/L etinilestradiol dan 1,5 ng/L levonorgestrel, 3 ng/L etinilestradiol dan 15 ng/L levonorgestrel, 30 ng/L etinilestradiol dan 150 ng/L levonorgestrel, 300 ng/L etinilestradiol dan 1500 ng/L levonorgestrel, dan 3000 ng/L etinilestradiol dan 15000 ng/L levonorgestrel selama tujuh hari dan tidak diberi pakan selama percobaan. Kandungan energi diestimasi setelah perlakuan secara gravimetri. Penelitian ini menunjukkan bahwa paparan jangka pendek pil keluarga berencana yang mengandung campuran etinilestradiol dan levonorgestrel berturut-turut hingga 3000 ng/L dan 15000 ng/L tidak berbeda nyata dengan kontrol. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa paparan jangka pendek pil KB tidak mempengaruhi kandungan energi pada ikan seribu.

Kata Kunci: etinilestradiol, levonorgestrel, kandungan energi, ikan seribu, gravimetri

ABSTRACT

*Synthetic steroid hormones from the contraceptive drugs derived from birth control pills have become contaminants in global waters. The hormones ethinylestradiol and levonorgestrel are increasingly receiving attention as contaminants and can have a negative impact on the development, behavior and survival of fish in the aquatic environment. In Indonesia, the attention to the potential impact of ethinylestradiol and levonorgestrel on non-target aquatic organisms is still very limited. This study was conducted to understand the changes in energy content in guppy fish (*Poecilia reticulata*) exposed to synthetic estrogen and progesterone (a mixture of ethinylestradiol and levonorgestrel). We exposed male guppy fish to six different concentrations of ethinylestradiol/levonorgestrel mixtures, i.e., 0 ng/L of ethinylestradiol and levonorgestrel, 0.3 ng/L ethinylestradiol and 1.5 ng/L levonorgestrel, 3 ng/L ethinylestradiol and 15 ng/L levonorgestrel, 30 ng/L ethinylestradiol and 150 ng/L levonorgestrel, 300 ng/L ethinylestradiol and 1500 ng/L levonorgestrel, and 3000 ng/L ethinylestradiol and 15000 ng/L levonorgestrel for seven days and were not given food during the experiment. We estimated the energy content gravimetrically after treatment. This study found that taking a birth control pill with a mix of ethinylestradiol and levonorgestrel for a short time, up to 3000 ng/L and 15000 ng/L, did not make a big difference to the control group. The results of the study suggest that the energy content of guppy fish remains unaffected by short-term exposure to birth control pills.*

Keywords: *ethinylestradiol, levonorgestrel, energy content, guppy fish, gravimetry*

PENDAHULUAN

Berbagai macam obat-obatan untuk manusia dan hewan telah mencemari ekosistem air tawar dan laut (Mauro *et al.*, 2021, Hossain *et al.*, 2018). Beberapa studi menunjukkan bahwa berbagai bahan aktif farmasi ditemukan di air permukaan, air tanah, limbah, dan sedimen, bahkan di biota (Wydro *et al.*, 2024, Ortúzar *et al.*, 2022, Kairigo *et al.*, 2020, Comber *et al.*, 2018, Runnalls *et al.*, 2010, Rabiet *et al.*, 2006, Halling-Sørensen *et al.*, 1998). Bahan aktif farmasi dapat memiliki dampak negatif terhadap organisme akuatik termasuk ikan (Kayode-Afolayan *et al.*, 2022, Ortúzar *et al.*, 2022, Fent *et al.*, 2006).

Ethinylestradiol dan levonorgestrel merupakan pil kontrasepsi oral yang banyak digunakan di banyak bagian di dunia, termasuk Indonesia. Ethinylestradiol dan levonorgestrel merupakan estrogen dan progestin sintetik dan digunakan di pil keluarga berencana (KB). Estrogen dan progesteron ini dilepaskan ke lingkungan melalui urin dan feses orang dan ternak yang mengkonsumsinya (Yazdan *et al.*, 2022, Orlando dan Ellestad 2014, Liu *et al.*, 2012).

Konsentrasi ethinylestradiol yang diukur di lingkungan telah dilaporkan hingga 300 ng/L di perairan tawar dan laut dan hingga 4390 ng/L di air permukaan yang berasal dari limbah unit pengolahan air limbah (Almeida *et al.*, 2020, Montagner dan Jardim 2011). Rata-rata konsentrasi ethinylestradiol di dalam dan luar unit pengolahan limbah di 29 negara berturut-turut sebesar 78,4 dan 12,3 ng/L (Tang *et al.*, 2021). Di Malaysia, rata-rata konsentrasi levonorgestrel yang terdeteksi di unit pengolahan limbah adalah sebesar 263 ng/L (Al-Qaim *et al.*, 2015). Konsentrasi ethinylestradiol dan levonorgestrel di air limbah Australia berturut-turut sebesar 0,1 – 0,5 ng/L dan 0,2 – 0,6 ng/L (King *et al.*, 2016). Tetapi, gambaran yang representatif dari konsentrasi ethinylestradiol dan levonorgestrel pada air permukaan di Indonesia belum tersedia hingga saat ini.

Kidd *et al.*, (2007) menyatakan bahwa konsentrasi paparan kronis selama tujuh tahun terhadap *Pimephales promelas* dengan ethinylestradiol konsentrasi rendah (5-6 ng/L) menyebabkan feminisasi ikan jantan dengan produksi mRNA dan protein vitellogenin, berdampak pada perkembangan gonad yang dibuktikan dengan interseks pada jantan dan oogenesis yang berubah pada betina, dan akhirnya spesies ini hampir punah dari danau di Ontario Kanada. Levonorgestrel konsentrasi 3,3-40 ng/L diketahui dapat mengurangi reproduksi ikan karena maskulinisasi ikan betina, perubahan histologi gonad dan gangguan pada kadar hormon (Fent 2015). Levonorgestrel menyebabkan feminisasi pada ikan medaka (*Oryzias latipes*), selain maskulinisasi (Watanabe *et al.*, 2023). Weerasinghe *et al.*, (2023) menemukan bahwa estrogen dan progestogen sintetik yang berasal dari pil kontrasepsi di air menyebabkan menurunnya indeks gonadosomatik dan indeks hepatosomatik dan mengubah tingkat glukosa darah pada ikan betik (*Anabas testudineus*). Akan tetapi, meskipun hewan akuatik sama-sama terpapar estrogen dan progestin, informasi yang tersedia mengenai toksisitas gabungan keduanya masih sangat sedikit (Kidd *et al.*, 2023). Selain itu, belum

ada studi tentang efek campuran etinilestradiol dan levonorgestrel terhadap kandungan energi pada ikan. Banyak literatur yang tersedia fokus pada fisiologi manusia dan mamalia (misalnya Adeyanju *et al.*, 2019, Aremu *et al.*, 2019, Coricovac *et al.*, 2018), dan oleh karena itu, penelitian lebih lanjut yang fokus pada interaksi yang kompleks antara etinilestradiol dan levonorgestrel dengan hewan air, terutama ikan diperlukan. Memahami konsekuensi adanya etinilestradiol dan levonorgestrel dapat meningkatkan upaya perlindungan lingkungan terhadap ikan dan lingkungannya dan bermanfaat bagi masyarakat. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh pil KB yang mengandung campuran etinilestradiol dan levonorgestrel terhadap kandungan energi dalam bentuk lipida dan protein pada ikan seribu (*Poecilia reticulata*). Kandungan karbohidrat pada jaringan ramping ikan seribu diasumsikan dapat diabaikan (Resnick 1983).

BAHAN DAN METODE

Bahan Kimia dan Organisme Uji

Pil KB yang digunakan dalam studi ini diperoleh dari apotek. Pil ini mengandung etinilestradiol 0,03 mg dan levonorgestrel 0,15 mg. Hewan uji, penanganan dan percobaan dilakukan berdasarkan prinsip-prinsip Deklarasi Helsinki. Izin etis untuk penelitian ini telah diterima dari Komisi Etik Penelitian UKSW (nomor referensi etika 045/KOMISIETIK/EC/9/2023). Ikan seribu (*P. reticulata*) jantan dewasa (panjang 1,8-2,1 cm) diperoleh dari toko ikan setempat dan dibawa ke laboratorium Ekologi, Universitas Kristen Satya Wacana (UKSW) dalam tempat besar diaerasi. Di laboratorium seluruh ikan dimasukkan ke dalam akuarium besar yang berisi air sumur pada suhu $26 \pm 0,5$ °C selama dua minggu untuk menghindari stres karena penangkapan dan transportasi dan digunakan sebagai kultur ikan stok. Pakan ikan komersial diberikan dua kali sehari, sekali pada pagi dan sekali pada sore hari.

Pemaparan *P. reticulata* Dengan Pil KB

Ikan seribu (*P. reticulata*) jantan dewasa sehat diseleksi dari kultur stok dan dipelihara di akuarium volume 4 L (25×16×18 cm) yang berisi 2 L air sumur tanpa aerasi selama percobaan. Tiga ekor dipelihara di setiap akuarium bersih dan dipapar dengan enam konsentrasi campuran etinilestradiol dan levonorgestrel, yaitu 0 ng/L etinilestradiol + 0 ng/L levonogestrel, 0,3 ng/L etinilestradiol + 1,5 ng/L levonogestrel, 3 ng/L etinilestradiol + 15 ng/L levonogestrel, 30 ng/L etinilestradiol + 150 ng/L levonogestrel, 300 ng/L etinilestradiol + 1500 ng/L levonogestrel, dan 3000 ng/L etinilestradiol + 15000 ng/L levonogestrel, masing-masing dengan tiga ulangan. Kandungan energi (kJ) diestimasi pada setiap individu ikan seribu setelah tujuh hari perlakuan secara gravimetri mengikuti metode Reznick (1983) di laboratorium Ekologi UKSW. Individu dikeringkan pada suhu 60 °C selama 24 jam dan kemudian ditimbang (massa 1). Individu kemudian diekstraksi dengan eter anhidrat untuk menghilangkan trigliserida hingga mencapai massa konstan (massa 2), diabukan pada suhu 550 °C dalam tungku, dan ditimbang kembali (massa 3). Perbedaan antara massa 1 dan massa 2 sama dengan kandungan lipida individu dan dikalikan dengan 9,5 untuk konversi menjadi jumlah kalori. Massa 2 dikurangi massa 3 sama dengan kandungan protein dan dikalikan dengan 5,7 untuk menghasilkan jumlah kalori. Kalori dikonversi ke joule dengan dikalikan dengan 4,184.

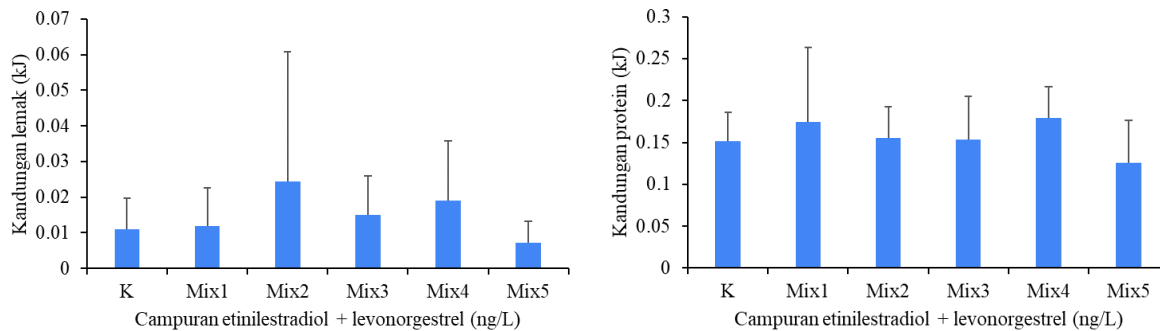
Analisis Data

Uji Shapiro-Wilk dan Bartlett berturut-turut digunakan untuk menguji normalitas dan homogeneitas varians data kandungan lemak dan protein. *Analysis of variance* (ANOVA) satu arah digunakan untuk membandingkan rata-rata antarperlakuan diikuti dengan uji perbandingan ganda Tukey jika diperlukan. Signifikansi statistik ditetapkan pada $p < 0,05$. Data dianalisis menggunakan SPSS versi 14.0.

HASIL

Ikan seribu (*P. reticulata*) uji berkelamin jantan dewasa menunjukkan perilaku normal selama penelitian yaitu tidak menggigit ikan lain dan tidak mengeluarkan gelembung secara terus menerus. Mortalitas ikan seribu jantan selama penelitian ini sebesar 1,85%.

Kandungan lemak dan protein pada ikan seribu jantan yang dipapar campuran etinilestradiol dan levonorgestrel selama tujuh hari dapat dilihat pada Gambar 1. Analisis statistika menunjukkan bahwa kandungan lemak dan protein pada ikan seribu jantan yang terpapar campuran etinilestradiol dan levonorgestrel pada konsentrasi hingga 3000 ng/L etinilestradiol + 15000 ng/L levonorgestrel selama tujuh hari tidak berbeda nyata (berturut-turut $p = 0,401$ dan $0,338$) antarkonsentrasi campuran setelah paparan. Rata-rata kandungan lemak dan protein berturut-turut adalah sebesar $0,0147 \pm 0,0062$ kJ dan $0,1565 \pm 0,0192$ kJ.



Gambar 1. Kandungan lemak dan protein pada ikan seribu yang dipapar dengan etinilestradiol dan levonorgestrel. K: Kontrol, Mix1: 0,3 ng/L etinilestradiol + 1,5 ng/L levonorgestrel, Mix2: 3 ng/L etinilestradiol + 15 ng/L levonorgestrel, Mix3: 30 ng/L etinilestradiol + 150 ng/L levonorgestrel, Mix4: 300 ng/L etinilestradiol + 1500 ng/L levonorgestrel, Mix5: 3000 ng/L etinilestradiol + 15000 ng/L levonorgestrel. Setiap batang menunjukkan nilai rata-rata \pm standar deviasi dari tiga ulangan. (*Fat and protein content in guppy fish exposed to ethinylestradiol and levonorgestrel. K: Control, Mix1: 0,3 ng/L ethinylestradiol + 1,5 ng/L levonorgestrel, Mix2: 3 ng/L ethinylestradiol + 15 ng/L levonorgestrel, Mix3: 30 ng/L ethinylestradiol + 150 ng/L levonorgestrel, Mix4: 300 ng/L ethinylestradiol + 1500 ng/L levonorgestrel, Mix5: 3000 ng/L ethinylestradiol + 15000 ng/L levonorgestrel. Each bar represents the mean value \pm deviation standard of three replicates*).

PEMBAHASAN

Oleh karena air yang digunakan dalam penelitian ini adalah air sumur yang tidak tercemar, etinilestradiol dan levonorgestrel diasumsikan tidak terdeteksi di air kontrol. Konsentrasi campuran etinilestradiol dan levonorgestrel yang digunakan dalam studi ini relatif rendah mengikuti temuan Almeida *et al.*, (2020) dan Oropesa dan Guimarães (2020) yang mendapatkan bahwa steroid sintetik etinilestradiol dan progesteron telah banyak dilaporkan terdapat di lingkungan perairan sebagai mikropolutan dalam rentang konsentrasi yang rendah.

Ada beberapa spesies air tawar dan air laut yang distudi responnya terhadap paparan bahan aktif pil kontrasepsi, termasuk ikan seribu (*P. reticulata*) (Martyniuk *et al.*, 2020). Meskipun demikian, studi-studi yang dilakukan sebagian besar hanya melihat responnya terhadap paparan etinilestradiol dan jarang yang mempelajari pengaruh campuran etinilestradiol dan levonorgestrel.

Kelainan metabolisme lipid dan protein pada ikan berdampak negatif terhadap kesehatan misalnya menyebabkan stres oksidatif, gangguan fungsi hati, tereduksinya imunitas nonspesifik dan meningkatnya trigliserida pada ikan betina, perkembangan dan produktivitas (Taj *et al.*, 2023, Sun *et al.*, 2021, Zhang *et al.*, 2020). Akan tetapi, hasil studi ini menunjukkan bahwa paparan campuran etinilestradiol dan levonorgestrel selama tujuh hari tidak mempengaruhi kandungan lemak dan protein pada ikan seribu jantan. Zhou *et al.*, (2019) juga mendapatkan bahwa ikan mas (*Carassius auratus*) yang terpapar etinilestradiol pada konsentrasi yang relevan dengan lingkungan (19,7 $\mu\text{g/L}$) selama 27 hari menunjukkan fisiologi (panjang, berat, indeks hepatosomatik, indeks gonadosomatik) yang tidak mengalami perubahan nyata setelah paparan etinilestradiol (Zhou *et al.*, 2019). Gemzell-Danielson *et al.*, (2022) dan Mawet *et al.*, (2015) juga mendapatkan bahwa kombinasi estrogen alami estetrol dan levonorgestrel diketahui memiliki dampak yang kecil terhadap metabolisme lipida dan karbohidrat pada manusia. Tidak adanya perbedaan kandungan lemak dan protein antara ikan kontrol

dan ikan yang diberi perlakuan campuran etinilestradiol dan levonorgestrel mengindikasikan bahwa pengaruh yang diinduksi oleh campuran etinilestradiol dan levonorgestrel mungkin tidak dapat diamati pada paparan konsentrasi rendah dalam jangka pendek berdasarkan titik akhir tradisional ini.

Studi yang lain menunjukkan bahwa paparan 200 ng/L 17 β -estradiol selama enam minggu mengubah metabolisme lipida ikan zebra (*Danio rerio*) jantan menjadi pola betina (Sun *et al.*, 2021). Zhang *et al.*, (2020) mendapatkan bahwa paparan 17 β -estradiol hingga konsentrasi 50 ng/L mempengaruhi regulasi endokrinologi terhadap metabolisme lipida pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Kandungan lemak pada otot ikan nila yang terpapar 17 β -estradiol melalui pakan selama 20 hari secara signifikan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol (Lazaro-Velasco *et al.*, 2019). Studi yang lain menunjukkan bahwa paparan 91,31 ng/L noretisteron yang merupakan progestin sintetik selama 10 hari dapat mempengaruhi perilaku berenang dan aktivitas enzim antioksidan pada larva medaka (*Oryzias melastigma*) dan menyebabkan maskulinisasi pada populasi dewasa (Dong *et al.*, 2023). Zhou *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa fisiologis ikan tidak mengalami perubahan nyata setelah paparan etinilestradiol, tetapi analisis metabolomik menunjukkan adanya penyimpangan yang signifikan berdasarkan kemometri dan mengindikasikan adanya gangguan pada metabolisme asam amino, metabolisme lipid, metabolisme energi, dan stres oksidatif (Zhou *et al.*, 2019). Saaristo *et al.*, (2019) menyatakan bahwa perilaku seksual dan transkriptom otak pada ikan seribu jantan dan betina merupakan penanda hayati pada aras organisme untuk pengaruh senyawa kimia peniru estrogen. Ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim antioksidan, pendekatan metabolomik dan transkriptomik lebih sensitif terhadap efek etinilestradiol pada konsentrasi yang relevan dengan lingkungan terhadap ikan air tawar dibandingkan dengan titik akhir tradisional.

Seperti yang ditunjukkan oleh studi ini dan studi-studi yang disitasi, pengaruh etinilestradiol dan levonorgestrel terhadap kandungan lipid dan protein pada ikan bersifat kompleks dan bergantung pada banyak faktor, termasuk pemilihan pendekatan yang lebih sensitif (Ács *et al.*, 2022, Wojnarowski *et al.*, 2022, Martyniuk *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2020). Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami sepenuhnya mekanisme dan konsekuensi paparan hormon terhadap fisiologi dan metabolisme ikan. Selain itu, langkah-langkah regulasi mungkin diperlukan untuk memitigasi potensi dampak lingkungan dari hormon sintesis terhadap ekosistem perairan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilakukan atas dana hibah penelitian Riset Bersama Dosen Mahasiswa (RBDM) Tahun Anggaran 2023 dari Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat UKSW.

KONTRIBUSI PENULIS

RAN: membuat konsep penelitian, membuat draf artikel, merevisi naskah akhir; ABAS: melakukan konseptualisasi dan revidi; DCC: melakukan konseptualisasi dan revidi; YB: mengumpulkan data penelitian; ARW: mengumpulkan data penelitian.

REFERENSI

- Ács, A., Liang, X., Bock, I., Griffiths, J., Ivánovics, B., Vászrhelyi, E., Ferincz, Á., Pirger, Z., Urbányi, B., Csenki, Z. 2022. Chronic effects of carbamazepine, progesterone and their mixtures at environmentally relevant concentrations on biochemical markers of zebrafish (*Danio rerio*). *Antioxidants*, 11(9), p.1776. <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/9/1776>.
- Adeyanju, O.A., Soetan, O.A., Soladoye, A.O., Olatunji, L.A. 2019. Oral hormonal therapy with ethinylestradiol/levonorgestrel improves insulin resistance, obesity and glycogen synthase kinase3 independent of circulating mineralocorticoid in estrogen-deficient rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(6), pp.577–586.
- Almeida, Â., Silva, M.G., Soares, A.M.V.M., Freitas R. 2020. Concentrations levels and effects of 17 α -Ethinylestradiol in freshwater and marine waters and bivalves: A review. *Environmental Research*, 185, p.109316.

- Al-Qaim, F.F., Abdullah, Md.P., Othman, M.R., Mussa, Z.H., Zakaria, Z., Latip, J., Afiq, W.M., 2015. Investigation of the environmental transport of human pharmaceuticals to surface water: a case study of persistence of pharmaceuticals in effluent of sewage treatment plants and hospitals in Malaysia. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(6), pp.1124–1135.
- Aremu, A.O., Lilian, D.C., Olufemi, S.A., Aderemi, O.L. 2019. Combined but not single treatment with ethinylestradiol/levonorgestrel and spironolactone reduces plasminogen activator inhibitor-1 in insulin-resistant ovariectomised rats. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 20(4). <https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1177/1470320319895933>.
- Cardoso, P.G., Resende-de-Oliveira, R., Rocha, E. 2019. Combined effects of increased temperature and levonorgestrel exposure on zebrafish female liver, using stereology and immunohistochemistry against catalase, CYP1A, HSP90 and vitellogenin. *Environmental Pollution*, 252(B), pp.1059–1067.
- Comber, S., Gardner, M., Pernilla, S., Leverett, D., Ellor B. 2018. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: A cause for concern? *Science of the Total Environment*, 613–614, pp.538-547. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969717324439>.
- Coricovac, D., Farcas, C., Nica, C., Pinzaru, I., Simu, S., Stoian, D., Soica, C., Proks, M., Avram, S., Navolan, D *et al.* 2018. Ethinylestradiol and levonorgestrel as active agents in normal skin, and pathological conditions induced by UVB exposure: In vitro and in ovo assessments. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), p.3600. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6275072/>.
- Dong, Z., Li, X., Chen, Y., Zhang, N., Wang, Z., Liang, Y.Q., Guo, Y. 2023. Short-term exposure to norethisterone affected swimming behavior and antioxidant enzyme activity of medaka larvae, and led to masculinization in the adult population. *Chemosphere*, 310, p.136844. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653522033379>.
- Fent, K. 2015. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment. *Environment International*, 84(12), pp.115–130. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0160412015300027>.
- Fent, K., Weston, A., Caminada, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, pp.122–159.
- Gemzell-Danielson, K., Cagnacci, A., Chabbert-Buffet, N., Douxfils, J., Foidart, J.-M., Kubba, A., Lasa, L.I.L., Mansour, D., Neulen, J., Neves, J., *et al.* 2022. A novel estetrol-containing combined oral contraceptive: European expert panel review. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*, 27(5), pp.373–383.
- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S., Lanzky, P., Ingerslev, F., Lützhøft, H.H., Jørgensen, S. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A review. *Chemosphere*, 36(2), pp.357–393.
- Hossain, A., Nakamichi, S., Habibullah-Al-Mamun, M., Tani, K., Masunaga, S., Matsuda, H. 2018. Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals in river surface water of Bangladesh. *Environmental Research*, 165, pp.258–266.
- Kairigo, P., Ngumba, E., Sundberg, L.-R., Gachanja, A., Tuhkanen, T. 2020. Contamination of surface water and river sediments by antibiotic and antiretroviral drug cocktails in low and middle-income countries: Occurrence, risk and mitigation strategies. *Water*, 12(5), p.1376. <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/5/1376>.
- Kayode-Afolayan, S.D., Ahuekwe, E.F and Nwinyi, O.C., 2022. Impacts of pharmaceutical effluents on aquatic ecosystems. *Scientific African*, 17, p.E01288.
- Kidd, K.A., Backhaus, T., Brodin, T., Inostroza, P.A., McCallum, E.S. 2023. Environmental risks of pharmaceutical mixtures in aquatic ecosystems: Reflections on a decade of research. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 43(3), pp.549–558. <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/etc.5726>.

- Kidd, K.A., Blachfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21), pp.8897–8901.
- King, O.C., van de Merwe, J.P., McDonald, J.A., Leusch, F.D.L. 2016. Concentrations of levonorgestrel and ethinylestradiol in wastewater effluents: Is the progestin also cause for concern? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(6), pp.1378–1385.
- Lazaro-Velasco, A., Isidro-Cristobal, H.M., Alcantar-Vazquez, J.P., Antonio-Estrada, C., Calzada-Ruiz, D., Torre, R.M.L. 2019. Effect of the combination of a cold-water temperature and exogenous estrogens on feminization, growth, gonadosomatic index and fat muscle content of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(1), pp.52–64.
- Liu, S., Ying, G.G., Zhang, R.Q., Zhou, L.J., Lai, H.J., Chen, Z.F. 2012. Fate and occurrence of steroids in swine and dairy cattle farms with different farming scales and wastes disposal systems. *Environmental Pollution*, 170, pp.190–201.
- Martyniuk, C.J., Feswick, A., Munkittrick, K.R., Dreier, D.A., Denslow, N.D. 2020. Twenty years of transcriptomics, 17 α -ethinylestradiol, and fish. *General and Comparative Endocrinology*, 286, p.113325.
- Mauro, M., Lazzara, V., Arizza, V., Luparello, C., Ferrantelli, V., Cammilleri, G., Inguglia, L., Vazzana, M. 2021. Human drug pollution in the aquatic system: The biochemical responses of *Danio rerio* adults. *Biology*, 10(10), p.1064. <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/10/1064>.
- Mawet, M., Malillard, C., Klipping, C., Zimmerman, Y, Foidart, J.M., Bennink, H.J.T.C. 2015. Unique effects on hepatic function, lipid metabolism, bone and growth endocrine parameters of estetrol in combined oral contraceptives. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*, 20(6), pp.463–475.
- Montagner, C.C., Jardim, W.F. 2011. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, Sao Paulo State (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(8), pp.1452–1462.
- Orlando, E.F., Ellestad, L.E. 2014. Sources, concentrations, and exposure effects of environmental gestagens on fish and other aquatic wildlife, with an emphasis on reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 203, pp.241–249. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24759355/>.
- Oropesa, A.L., Guimarães, L. 2020. Occurrence of levonorgestrel in water systems and its effects on aquatic organisms: A review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 254, pp.57–84. https://link.springer.com/chapter/10.1007/398_2020_44.
- Ortúzar, M., Esterhuizen, M., Olicón-Hernández, D.R., Gonzáles-López, J., Aranda, E. 2022. Pharmaceutical pollution in aquatic environments: A concise review of environmental impacts and bioremediation systems. *Frontiers in Microbiology*, 13, p.869332.
- Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J.-L., Budzinski, H., Elbaz-Poulichet, F. 2006. Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized mediterranean catchment. *Environmental Science and Technology*, 40(17), pp.5282–5288. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es060528p>.
- Reznick, D. 1983. The structure of guppy life histories: The tradeoff between growth and reproduction. *Ecology*, 64(4), pp.862–873. <https://www.jstor.org/stable/1937209>.
- Runnalls, T.J., Margiotta-Casaluci, L., Kugathas, S., Sumpter, J.P. 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: Steroids and anti-steroids as high priorities for research. *Human and Ecological Risk Assessment*, 16(6), pp.1318–1338.
- Saaristo, M., Johnstone, C.P., Xu, K., Allison, M., Wong, B.B.M. 2019. The endocrine disruptor, 17 α -ethinyl estradiol, alters male mate choice in a freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 208, pp.118–125. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X18309408>.
- Sun, S.X., Wu, J.L., Lv, H.B., Zhang, H.Y., Zhang, J., Limbu, S.M., Du Z.Y. 2021. Environmental estrogen exposure converts lipid metabolism in male fish to a female pattern mediated by

- AMPK and mTOR signaling pathways. *Journal of Hazardous Materials*, 406, p.124783. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32203715/>.
- Taj, S., Han, Q., Wu, X., Yin, H., Tian, L., Yang, H., Liu, Y., Huang, J. 2023. Effects of dietary protein-to-energy ratios on growth, immune response, antioxidative capacity, liver and intestinal histology, and growth-related gene expression in hybrid yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *Pelteobagrus vachelli* ♂). *Aquaculture Nutrition*, 2023, p.9106332. <https://www.hindawi.com/journals/anu/2023/9106332/>.
- Tang, Z., Liu, Z., Wang, H., Dang, Z., Liu, Y. 2021. Occurrence and removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in municipal wastewater treatment plants: Current status and challenges. *Chemosphere*, 271, p.129551.
- Watanabe, A., Myosho, T., Ishibashi, A., Yamamoto, J., Toda, M., Onishi, Y., Kobayashi, T. 2023. Levonorgestrel causes feminization and dose-dependent masculinization in medaka fish (*Oryzias latipes*): Endocrine-disruption activity and its correlation with sex reversal. *Science of The Total Environment*, 876, p.162740.
- Weerasinghe, C., Akhtar, N., Uddin, M.H., Rachamalla, M., Sumon, K.A., Islam, M.J., Bhandari, R.K., Rashid, H. 2023. Contraceptive-pill-sourced synthetic estrogen and progestogen in water causes decrease in GSI and HSI and alters blood glucose levels in climbing perch (*Anabas testudineus*). *Hydrobiology*, 2, pp.19–35. <https://www.mdpi.com/2673-9917/2/1/2>.
- Wojnarowski, K., Cholewińska, P., Palić, D., Bednarska, M., Jaroz, M., Wiśniewska, I. 2022. Estrogen receptors mediated negative effects of estrogens and xenoestrogens in teleost fishes – Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), p.2605. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8910684/>.
- Wydro, U., Wolejko, E., Luarasi, L., Puto, K., Tarasevičienė, Z., Jabłńska-Trypuć, A. 2024. A review on pharmaceuticals and personal care products residues in the aquatic environment and possibilities for their remediation. *Sustainability*, 16(1), p.169. <https://www.mdpi.com/2071-1050/16/1/169>.
- Yazdan, M.Md.S., Kumar, R., Leung, S.W. 2022. The environmental and health impacts of steroids and hormones in wastewater effluent, as well as existing removal technologies: A review. *Ecologies*, 3(2), pp.206–224. <https://www.mdpi.com/2673-4133/3/2/16>.
- Zhang, X., Zhong, H., Han, Z., Tang, Z., Xiao, J., Guo, Z., Zhou, Y. 2020. Effects of waterborne exposure to 17-estradiol on hepatic lipid metabolism genes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports*, 17, p.100382.
- Zhou, X., Li, Y., Li, H., Yang, Z., Zuo, C. 2019. Responses in the crucian carp (*Carassius auratus*) exposed to environmentally relevant concentration of 17 α -ethynylestradiol based on metabolomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183, p.109501. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31401330/>.