

Spermatogenesis ikan lele *Clarias* sp. jantan yang diberi pakan mengandung ekstrak purwoceng

Spermatogenesis of male catfish *Clarias* sp. fed diet supplemented with purwoceng extract

Poppy Dea Bertha, Muhammad Zairin Junior*, Dinar Tri Soelistyowati

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680

*Surel: zairinmz@live.com

ABSTRACT

Purwoceng *Pimpinella alpina* Molk has been a commercial medicinal plant that their root could be used as aphrodisiac, diuretic, and body fit enhancer. This research was performed to evaluate the effect of purwoceng on spermatogenesis of the male catfish *Clarias* sp. consisted of testis weight, gonado somatic index (GSI), and spermatocrite levels. The treatment comprised administering purwoceng extract through the feed at a dose of 0; 2.5; 5; 7.5 g/kg of feed. Experimental fish used were male catfish *Clarias* sp. with initial body weight of 200–300 g at the density of 10 fish/tank. Male catfish were maintained in tank sized 2×1,5×1 m³, filled with water at 60–70 cm deep. The result showed that purwoceng extract at a dose of 5 g/kg mixed in the feed increased testis weight, GSI values, and spermatocrite levels in adult male catfish.

Keywords: purwoceng extract, spermatogenesis, catfish

ABSTRAK

Purwoceng *Pimpinella alpina* Molk merupakan tanaman herbal komersial yang akarnya dilaporkan berkhasiat sebagai obat afrodisiak, diuretik, dan tonik. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh ekstrak purwoceng terhadap perkembangan testis ikan lele *Clarias* sp. yang meliputi peningkatan bobot testis, nilai GSI, serta nilai spermatokrit. Perlakuan terdiri atas pemberian ekstrak purwoceng melalui pakan dengan dosis 0; 2,5; 5 dan 7,5 g/kg pakan. Adapun ikan yang diujicobakan pada penelitian adalah ikan lele jantan dengan bobot awal 200–300 g dan padat tebar 10 ekor/bak. Pemeliharaan ikan dilakukan pada bak berukuran 2×1,5×1 m³ yang diisi air dengan ketinggian 60–70 cm. Hasil percobaan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak purwoceng dengan dosis 5 g/kg yang dicampur dalam pakan meningkatkan nilai bobot testis, nilai GSI dan kadar spermatokrit pada lele jantan dewasa.

Kata kunci: ekstrak purwoceng, spermatogenesis, ikan lele

PENDAHULUAN

Ikan lele *Clarias* sp. merupakan salah satu komoditas ikan air tawar yang bernilai ekonomis tinggi terutama di kawasan Asia Tenggara (Thien *et al.*, 2007). Budidaya lele masih sangat diminati oleh masyarakat Indonesia karena ikan lele termasuk jenis ikan yang cepat tumbuh dan mampu mencapai ukuran besar dalam waktu relatif singkat. Berdasarkan data KKP (2010), target produksi ikan lele *Clarias* sp. di Indonesia hingga tahun 2014 mencapai 900.000 ton per tahun. Target produksi ikan lele yang tinggi tersebut harus diikuti dengan ketersediaan benih

yang kontinu. Ketersediaan benih ikan lele bergantung pada kegiatan pemijahannya sehingga diperlukan kualitas induk yang baik. Induk jantan lele cenderung memiliki ukuran testis yang kecil dan adanya saluran vesikula seminalis yang bergerigi sehingga sperma ikan lele tidak dapat didialin. Hal itu menyebabkan pemijahan buatan pada ikan lele selama ini dilakukan dengan cara pembedahan. Kelemahan ikan lele jantan saat dibedah yaitu menghasilkan cairan sperma yang sedikit sehingga kegiatan pembedahan pada pemijahan buatan ini dianggap kurang efisien.

Perkembangan *germ cell* pada ikan jantan diatur oleh kelenjar pituitari yang merupakan

kelenjar utama yang mengatur reproduksi dan spermatogenesis secara umum. Melalui sistem ini, gonadotropin pituitari, LH dan FSH mengatur testis melalui reseptor yaitu LH reseptor dan FSH reseptor (García-López *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2008). Deteksi imunositokemikal protein reseptor FSH pada *Anguilla japonica*, sel Leydig, menandakan bahwa peran FSH pada spermatogenesis diatur oleh produksi androgen (Ohta *et al.*, 2007). Spermatogenesis yang diatur oleh hormon-hormon steroid dapat ditingkatkan melalui pemberian pakan yang mengandung hormon steroid tambahan dari luar.

Hormon steroid yang dihasilkan oleh suatu tumbuhan serta memiliki efek spesifik pada reproduksi organisme jantan dikenal dengan istilah fitoandrogen. Penggunaan fitoandrogen sebagai pengganti hormon jantan telah banyak diaplikasikan pada mamalia dan manusia untuk meningkatkan fungsi reproduksi jantan. Beberapa tanaman yang memiliki efek androgenik antara lain cabe Jawa *Piper retrofractum*, pasak bumi *Eurycoma longifolia* dan purwoceng *P. alpina* Molk. Purwoceng diketahui dapat meningkatkan hormon testosteron (Taufiqurrachman, 2012), menurunkan ekspresi caspase pada penis dan sel prostat tikus (Taufiqurrachman, 2013), serta memiliki efek positif dalam meningkatkan vitalitas pria dan mengurangi gejala andropause pada pria (Jasaputra & Herdiman, 2013; Nasihun, 2009).

Pemberian ekstrak purwoceng melalui pakan terhadap ikan lele diharapkan dapat mengatasi kelemahan aspek reproduksi pada ikan tersebut. Kegiatan ini merupakan penelitian awal karena ekstrak purwoceng belum pernah diaplikasikan untuk mempercepat kematangan gonad pada ikan lele jantan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak purwoceng *P. alpina* Molk yang disuplementasikan melalui pakan terhadap perkembangan testis ikan lele jantan.

BAHAN DAN METODE

Bahan uji

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan ikan lele *Clarias* sp. jantan yang berukuran 200–300 g dari pengumpul di daerah Parung, Kabupaten Bogor. Bahan perlakuan berupa simplisia purwoceng *P. alpina* Molk berasal dari tanaman purwoceng yang diperoleh dari kebun percobaan Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik di Desa Gunung Putri, Cipanas, Bogor.

Rancangan penelitian

Perlakuan yang diberikan yaitu pemberian ekstrak purwoceng melalui pakan buatan. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pemberian tiga dosis ekstrak purwoceng yang berbeda dengan satu kontrol. Masing-masing perlakuan terdiri atas sepuluh ekor ikan lele jantan yang belum matang gonad. Dosis purwoceng yang digunakan yaitu 0; 2,5; 5; 7,5 g/kg pakan. Pemberian ekstrak purwoceng dilakukan selama 30 hari kepada ikan uji. Setelah 30 hari perlakuan, lima ekor ikan uji diambil secara acak dari setiap bak lalu diamati bobot testis, nilai GSI, spermatokrit dan jumlah spermnya.

Persiapan wadah

Wadah yang digunakan untuk perlakuan adalah bak semen berukuran $2 \times 1,5 \times 1$ m³. Bak yang digunakan untuk perlakuan sebanyak empat buah. Sebelum digunakan bak dikeringkan, dibilas dengan air dan dikeringkan kembali. Bak yang sudah bersih diisi air dengan ketinggian 60–70 cm kemudian diberikan aerasi secukupnya. Masing-masing bak diberi penutup berupa hapa yang berukuran $2,5 \times 1 \times 1$ m³ untuk mencegah ikan uji loncat keluar dari bak.

Pembuatan ekstrak purwoceng

Tanaman purwoceng segar dijemur selama seminggu. Ketika tanaman sudah kering, seluruh bagian tanaman dihaluskan dengan *blender* sampai menjadi serbuk atau simplisia. Serbuk diekstraksi dengan cara melarutkan serbuk purwoceng ke dalam alkohol 70%. Setelah itu ampasnya disaring, lalu larutan ekstrak purwoceng dimasukkan ke dalam botol *sprayer* lalu disemprotkan ke pakan. Setiap dosis yang digunakan dilarutkan dalam 100 mL alkohol. Pembuatan larutan ekstrak dilakukan secara parsial per kg pakan.

Pemeliharaan ikan uji

Ikan lele ditebar dalam bak masing-masing perlakuan sebanyak sepuluh ekor berukuran 200–300 g/ekor ikan berjenis kelamin jantan. Ikan lele pada penelitian ini diadaptasi selama seminggu, kemudian diberi pakan perlakuan yaitu berupa pelet komersial dicampur dengan ekstrak purwoceng selama sekitar 30 hari masa penelitian, sebanyak tiga kali sehari. Setelah 30 hari perlakuan, pada ikan uji kemudian diperiksa adanya pengaruh perlakuan. *Sampling* pertumbuhan dilakukan pada setiap dua minggu

pemeliharaan. Pada hari ke-30 dilakukan pembedahan untuk pengamatan gonad ikan uji meliputi bobot testis, kadar spermatokrit, dan IGS (indeks gonadosomatik).

Parameter uji

Bobot testis

Perhitungan bobot testis dilakukan pada akhir hari ke-30 masa pemeliharaan. Ikan uji diambil sebanyak lima ekor secara acak dari setiap perlakuan. Selanjutnya ikan uji ditimbang bobot tubuhnya kemudian dilakukan pembedahan untuk diambil testisnya.

IGS

Indeks gonadosomatik (IGS) dapat diketahui dengan rumus:

$$\text{IGS} = \text{W gonad} / \text{W ikan} \times 100$$

Keterangan:

IGS	= indeks gonadosomatik
W gonad	= bobot gonad
W ikan	= bobot ikan

Kadar spermatokrit

Penghitungan spermatokrit dilakukan dengan cara memasukkan sampel cairan semen ke dalam tabung mikrohematokrit sampai 4/5 bagian. Ujung tabung disumbat dengan *crystoceal*. Tabung hematokrit disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 8000 rpm. Setelah itu dilakukan pengukuran kadar spermatokrit dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar spermatokrit (\%)} = x/y \times 100$$

Keterangan:

x	= padatan cairan semen (cm)
y	= total cairan semen (cm)

Analisis data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Analisis data hasil penelitian dilakukan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Bobot tubuh ikan lele

Hasil penimbangan rata-rata bobot tubuh ikan lele yang diberi perlakuan ekstrak purwoceng pada pakan sebanyak 0; 2,5; 5; dan 7,5 g/kg pakan disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan

Gambar 1, dapat diketahui bahwa perlakuan 0 g/kg pakan memiliki rata-rata bobot tubuh tertinggi dibanding dengan perlakuan lainnya yaitu sebesar 417,2±58,7 g sedangkan rata-rata bobot tubuh terendah, terdapat pada perlakuan 5 g/kg pakan yaitu sebesar 396,8±37,1 g. Ikan uji yang diberi ekstrak purwoceng dengan dosis yang berbeda memiliki rata-rata bobot tubuh lebih rendah dibanding kontrol.

Bobot testis ikan lele

Hasil penimbangan bobot testis ikan uji yang diberi perlakuan ekstrak purwoceng pada pakan sebanyak 0; 2,5; 5; dan 7,5 g/kg pakan disajikan pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2, dapat diketahui bahwa perlakuan ekstrak purwoceng 5 g/kg pakan memiliki rata-rata bobot testis tertinggi dibanding dengan perlakuan lainnya yaitu sebesar 3,06±0,48 g. Rata-rata bobot testis terendah terdapat pada perlakuan 0 g/kg pakan yaitu sebesar 1,81±0,45 g. Hal ini berarti bahwa ikan uji yang diberi perlakuan purwoceng memiliki rata-rata bobot testis yang lebih tinggi dibanding perlakuan kontrol.

IGS

Persentase perbandingan bobot testis terhadap bobot tubuh ikan dikenal dengan IGS. Nilai IGS pada ikan uji yang diberi perlakuan ekstrak purwoceng melalui pakan sebanyak 0; 2,5; 5; dan 7,5 g/kg pakan disajikan pada Gambar 3. Berdasarkan Gambar 3, dapat diketahui bahwa perlakuan 5 g/kg pakan memiliki nilai IGS tertinggi dibanding dengan perlakuan lainnya yaitu sebesar 0,79±0,29%. Nilai IGS terendah terdapat pada perlakuan kontrol sebesar 0,45±0,15%. Gambar 3 menunjukkan bahwa ikan uji yang diberi ekstrak purwoceng melalui pakan memiliki nilai IGS yang lebih tinggi dibandingkan kontrol.

Kadar spermatokrit

Hasil pengukuran spermatokrit ikan uji yang diberi perlakuan ekstrak purwoceng melalui pakan sebanyak 0; 2,5; 5; dan 7,5 g/kg pakan disajikan pada Gambar 4. Berdasarkan Gambar 4, dapat diketahui bahwa ikan uji pada perlakuan 2,5 g/kg pakan memiliki spermatokrit tertinggi dibanding dengan perlakuan lainnya yaitu sebesar 65,0±7,07%. Hal ini dapat diartikan dalam setiap 1 mL sperma terdapat 0,65 mL padatan spermatozoa sedangkan sisanya berupa cairan semen. Persentase kadar spermatokrit terendah terdapat pada perlakuan kontrol sebesar 43,34±4,72%.

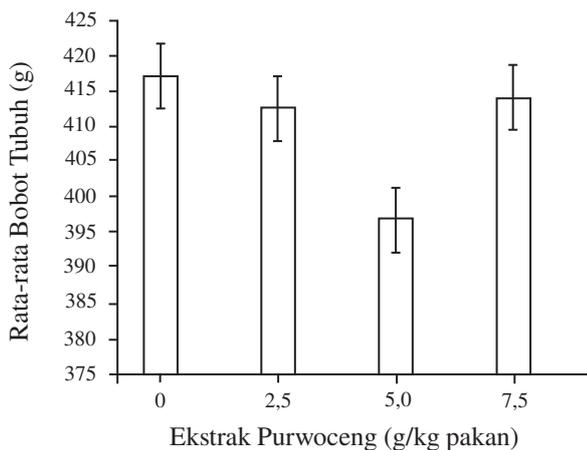
Diagram pada Gambar 4 menunjukkan ikan uji yang diberi ekstrak purwoceng melalui pakan, memiliki persentase kadar spermatokrit yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol.

Pembahasan

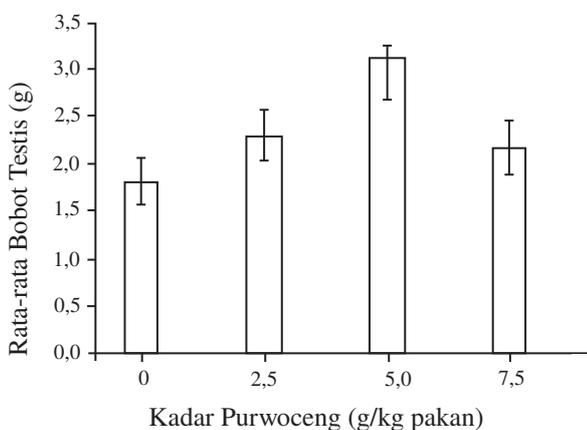
Ikan dengan perlakuan ekstrak purwoceng 5 g/kg pakan menunjukkan rata-rata bobot testis tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Pemberian ekstrak purwoceng melalui pakan meningkatkan rata-rata bobot testis ikan uji sehingga lebih tinggi daripada ikan uji pada perlakuan kontrol. Hal ini sejalan dengan penelitian penggunaan ekstrak purwoceng terhadap anak ayam jantan. Ekstrak purwoceng menimbulkan efek androgenik yang ditandai dengan peningkatan ukuran jengger dan ditunjang dengan adanya peningkatan bobot testis (Usmiati & Yuliani, 2010). Taufiqurrachman (2012) menyatakan bahwa ekstrak purwoceng dapat

meningkatkan hormon LH, FSH, dan testosteron yang mempengaruhi proses spermatogenesis. Spermatogenesis merupakan proses pembentukan sperma yang terjadi dalam tubulus semiferus yang terdapat di dalam testis hewan vertebrata. Ada lima tingkatan perkembangan testis ikan lele *C. batrachus* yang dikemukakan secara anatomi antara lain spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa (Sultz, 2008; Raghuvveer & Senthilkumaran, 2009; Raghuvveer & Senthilkumaran, 2010).

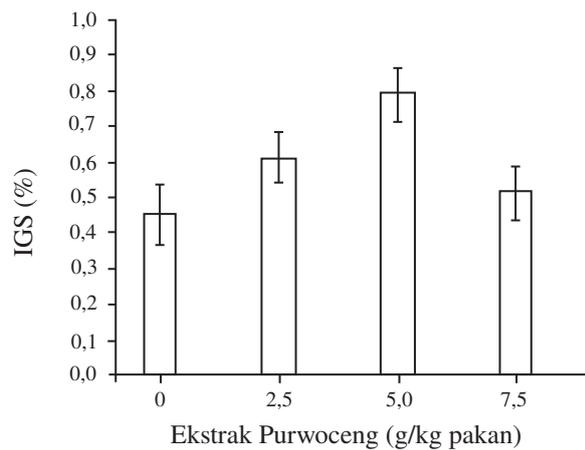
Perlakuan purwoceng memperlihatkan peningkatan bobot testis pada ikan uji tetapi rata-rata bobot tubuh ikan uji yang diberi ekstrak purwoceng nilainya lebih rendah dibandingkan ikan pada perlakuan kontrol. Umumnya pertambahan bobot gonad pada ikan jantan 5 sampai 10% dari bobot tubuh. Pada penelitian ini, ekstrak purwoceng mengaktifkan perkembangan gonad sehingga lebih banyak energi yang digunakan untuk perkembangan



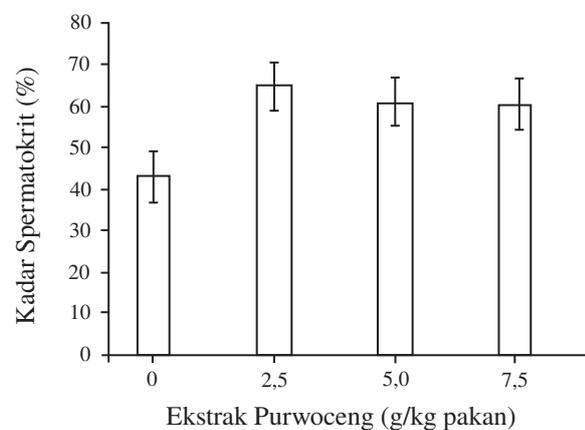
Gambar 1. Rata-rata bobot tubuh ikan lele pada dosis pemberian ekstrak purwoceng yang berbeda melalui pakan setelah 30 hari pemeliharaan.



Gambar 2. Rata-rata bobot testis ikan lele pada dosis pemberian ekstrak purwoceng yang berbeda melalui pakan setelah 30 hari pemeliharaan.



Gambar 3. Nilai indeks gonadosomatik (IGS) ikan lele pada dosis pemberian ekstrak purwoceng yang berbeda melalui pakan setelah 30 hari pemeliharaan.



Gambar 4. Persentase kadar spermatokrit ikan lele pada dosis pemberian ekstrak purwoceng yang berbeda melalui pakan setelah 30 hari pemeliharaan.

gonad. Akibatnya, pertumbuhan ikan yang diberi ekstrak purwoceng terganggu.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak purwoceng dilaporkan memiliki kandungan fitosterol yang dapat dikonversi menjadi hormon steroid pada hewan vertebrata khususnya mamalia yang digunakan untuk meningkatkan spermatogenesis. Reseptor androgen dan estrogen pada hewan dapat mengikat fitosterol sehingga dapat mempengaruhi rasio seks, gonad, dan hormonal (Hewit *et al.*, 2008). Pengikatan tersebut akibat dari adanya kemiripan struktur molekul stigmasterol, kolesterol dan testosteron. Struktur kimia hormon dari kelompok steroid seperti kortisol, testosteron, dan 17α -hidroksiprogesteron sama, baik untuk mamalia maupun ikan (Sayed *et al.*, 2012; Cerdà *et al.*, 2008).

Hasil perhitungan persentase nilai IGS ikan menunjukkan bahwa ikan uji yang diberi ekstrak purwoceng memiliki nilai IGS yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Ikan lele pada perlakuan 5 g/kg pakan memiliki nilai IGS tertinggi dibandingkan perlakuan lain. Hal ini berbanding lurus dengan nilai bobot testis pada perlakuan yang sama. Berdasarkan perhitungan spermatokrit, persentase padatan sperma terhadap cairan sperma juga menunjukkan perbedaan antarperlakuan. Cairan sperma adalah larutan spermatozoa yang berada dalam cairan seminal dan dihasilkan oleh hidrasi testis.

Kadar spermatokrit dapat digunakan sebagai indikator kekentalan sperma. Nilai spermatokrit tinggi menandakan cairan sperma tersebut bersifat kental sehingga memiliki padatan spermatozoa yang lebih banyak dibandingkan dengan cairan seminalnya. Kadar spermatokrit yang rendah menunjukkan cairan sperma tersebut memiliki kandungan padatan spermatozoa yang lebih sedikit dibandingkan dengan cairan seminalnya. Kadar spermatokrit ikan lele yang diberi perlakuan ekstrak purwoceng lebih tinggi dibandingkan ikan lele pada perlakuan kontrol. Nilai spermatokrit tertinggi terdapat pada perlakuan 2,5 g/kg pakan yaitu $65,0 \pm 7,07\%$.

Peningkatan jumlah spermatozoa seharusnya diikuti dengan peningkatan volume cairan seminal sehingga spermatozoa tetap mendapatkan zat makanan yang cukup dari cairan seminal tersebut. Cairan semen mengandung spermatozoa dan sekresi dari kelenjar vesikula seminalis, prostat serta kelenjar *cowper*. Komposisi kimia semen ikan menyatakan bahwa semen yang kental dengan konsentrasi tinggi mengandung kadar potassium lebih tinggi akan menghambat

pergerakan spermatozoa, sehingga motilitasnya rendah (Alavi *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2013).

Adanya peningkatan bobot testis, nilai GSI, dan kadar spermatokrit pada ikan uji menunjukkan peningkatan proses spermatogenesis pada ikan lele yang diberikan ekstrak purwoceng. Hal ini sesuai dengan penelitian Taufiqurrachman (2012) menunjukkan bahwa ekstrak purwoceng dapat meningkatkan aktivitas testis sehingga meningkatkan derajat spermatogenesis. Proses spermatogenesis dipengaruhi oleh hormon LH dan testosteron. Hasil uji farmakologis pada tikus jantan menunjukkan pemberian ekstrak purwoceng dapat meningkatkan kadar testosteron dan kadar LH. Peningkatan kadar testosteron ini disebabkan efek stimulasi ekstrak purwoceng terhadap LH dan konversi fitosterol yang ada pada ekstrak purwoceng menjadi testosteron pada jaringan hewan uji (Taufiqurrachman 2012). Aktivitas androgenik testosteron adalah mempengaruhi inisiasi dan pemeliharaan spermatogenesis dalam tubuli seminiferus testis. Hormon testosteron penting untuk mengontrol sifat-sifat seks sekunder dan aktivitas kelenjar reproduksi asesori. Testosteron tidak disimpan dalam tubuh tetapi segera dipecah menjadi androgen yang relatif inaktif dan diekskresikan keluar tubuh melalui urin dan feses (Zahavi & Perel, 2011; Oi-Kano *et al.*, 2013).

Peningkatan spermatogenesis ikan lele jantan pada penelitian ini diduga karena pengaruh senyawa yang terkandung dalam ekstrak purwoceng yang diberikan. Pada ekstrak purwoceng terdapat beberapa senyawa seperti stigmasterol, sitosterol, serta isoorientin. Senyawa isoorientin dapat menambah produksi sperma sedangkan senyawa sitosterol dan stigmasterol pada tanaman purwoceng bersifat androgenik. Akar purwoceng diketahui mengandung turunan senyawa kumarin, sterol, alkaloid, saponin, flavonoid, glikosida dan tannin. Kelompok furanokumarin seperti bergapten, isobargapten dan sphondin, stigmasterol, sitosterol, dan vitamin E (Rahardjo *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak purwoceng yang dicampur dalam pakan menunjukkan nilai bobot testis, nilai GSI dan kadar spermatokrit ikan lele jantan yang lebih tinggi daripada kontrol. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji manfaatnya sebagai hormon perangsang proses pemijahan pada organisme budidaya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alavi SMH, Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International* 30: 1–14.
- Cerdà J, Chauvigne F, Agulleiro MJ, Marin E, Halm S, Martínez-Rodríguez G, Prat F. 2008. Molecular cloning of Senegalese sole *Solea senegalensis* follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits and expression pattern during spermatogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 156: 470–481.
- García-López Á, Bogerd J, Granneman JC, van Dijk W, Trant JM, Taranger GL, Schulz RW. 2009. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology* 150: 357–365.
- Hewit LM, Kovacs TG, Dubes MG, Macclatchy DL, Martel PH, McMaster ME, Paice MG, Parrot JL, Heuvel MRVD, Van der Kraak GL. 2008. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 682–697.
- Jasaputra DK, Herdiman H. 2013. Protective effect of ethanol extract purwoceng to phone electromagnetic wave exposure as a risk factor for andropause. *Jurnal Medika Planta* 2: 47–52.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2010. Rencana Strategi Kementerian Kelautan dan Perikanan 2010–2014. Jakarta: Kantor Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Miura A, Nomura K, Imaizumi H, Jinbo T, Masuda Y, Tanaka H, Ohta H. 2013. Administration of 17 α -hydroxyprogesterone into mature male Japanese eel reduces sperm motility by decreasing potassium ion concentrations in the seminal plasma. *Aquaculture* 414: 217–223.
- Nasihun T. 2009. Pengaruh pemberian ekstrak purwoceng *Pimpinella alpina* Molck terhadap peningkatan indikator vitalitas pria studi eksperimental pada tikus jantan Sprague Dawley. *Jurnal Sains Medika* 1: 53–62.
- Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aida K, Miura T. 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biology Reproduction* 77:970–977.
- Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, Senbongi R, Iwai K. 2013. Oleuropein supplementation increases urinary noradrenaline and testicular testosterone levels and decreases plasma corticosterone level in rats fed high-protein diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24: 887–893.
- Raghuveer K, Senthilkumaran B. 2009. Identification of multiple DMRT1S in catfish: localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyltestosterone treatment. *Journal of Molecular Endocrinology* 42: 437–448.
- Raghuveer K, Senthilkumaran B. 2010. Cloning and differential expression pattern of vasa in the developing and recrudescing gonads of catfish, *Clarias gariepinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 157: 79–85.
- Rahardjo M, Wahyuni S, Trisilawati O, Djauhariya E. 2006. Ciri agronomis, mutu dan lingkungan tumbuh tanaman obat langka purwoceng *Pimpinella pruatjan* Molck. *Di dalam: Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVIII*. Bogor : Balittropokjanas TOI-Direktorat Tanaman Sayuran dan Biofarmaka. hlm 62–71.
- Sayed AEDH., Mahmoud UM, Mekkiaw IA. 2012. Reproductive biomarkers to identify endocrine disruption in *Clarias gariepinus* exposed to 4-nonylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78: 310–319.
- Schulz RW, Liemburg M, García-López Á, van Dijk W, Bogerd J. 2008. Androgens modulate testicular androgen production in African catfish *Clarias gariepinus* depending on the stage of maturity and type of androgen. *General and Comparative Endocrinology* 156: 154–163.
- Taufiqurrachman T. 2013. Decreased expression of caspase 3 in penis and prostate tissues of rat after the treatment with buceng *Pimpinella alpina* Molck & *Euricoma longifolia* Jack. *Medical Journal of Indonesia* 22: 2–8.
- Taufiqurrachman T. 2012. The effect of buceng extracts on androgen production in Sprague Dawley male rats. *Medical Journal of Indonesia* 21: 28–31.
- Thien PC, Dalsgaard A, Thanh BN, Olsen A, Murrell KD. 2007. Prevalence of fishborne zoonotic parasites in important cultured fish species in the Mekong Delta, Vietnam. *Parasitology Research* 101: 1.277–1.284.
- Usmiati S, Yuliani S. 2010. Efek androgenik dan anabolik ekstrak akar *Pimpinella alpina* Molck. (Purwoceng) terhadap anak ayam jantan. *Di dalam: Seminar Nasional Teknologi*

Peternakan dan Veteriner.
Zahavi A, Perel M. 2011. The information encoded
by the sex steroid hormones testosterone and

estrogen: a hypothesis. *Journal of Theoretical
Biology* 280: 146–149.