

Maskulinisasi ikan cupang *Betta splendens* melalui perendaman embrio dalam ekstrak purwoceng *Pimpinella alpina*

Masculinization of betta fish *Betta splendens* by embryo immersion in extract of purwoceng *Pimpinella alpina*

Harton Arfah*, Dinar Tri Soelistyowati, Asep Bulkini

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

*Surel: hartonarfah@yahoo.com

ABSTRACT

This study aimed to examine the effect of extract of purwoceng *Pimpinella alpina* for masculinization of *Betta splendens*. This research used completely randomized design with three treatments that were distinguished by doses of purwoceng extract, which were 10, 20, and 30 $\mu\text{L/L}$, and 0 $\mu\text{L/L}$ as control. The treatments were given by immersion to 35 embryos at eye spots phase or about 28-hours after fertilization, for eight hours. The immersion process was done for 8 hours. The result showed that 20 $\mu\text{L/L}$ dose of purwoceng extract produced 62.66% male, and hatching rate was 85.71%. This male percentage was higher compared to control (45.91%), but the hatching rate was lower than that of control (98.57%). At the higher dose (30 $\mu\text{L/L}$), male fish population and hatching rate reduced respectively 39.72% and 68.57%, respectively.

Keywords: masculinization, embryo immersion, purwoceng extract, *Betta splendens*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh dosis ekstrak purwoceng *Pimpinella alpina* extract dalam maskulinisasi ikan cupang hias *Betta splendens*. Penelitian ini menggunakan metode rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan tiga ulangan dosis ekstrak purwoceng, yaitu 10, 20, dan 30 $\mu\text{L/L}$, serta perlakuan 0 $\mu\text{L/L}$ sebagai kontrol. Perlakuan diberikan melalui perendaman selama delapan jam terhadap 35 embrio saat memasuki fase bintik mata atau sekitar jam ke-28 setelah pembuahan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis ekstrak purwoceng 20 $\mu\text{L/L}$ menghasilkan persentase ikan jantan sebesar 62,66%, dan daya tetas telur sebesar 85,71%. Persentase jantan tersebut lebih tinggi daripada kontrol (45,1%), tetapi derajat penetasannya lebih rendah daripada kontrol (98,57%). Pada dosis yang lebih tinggi (30 $\mu\text{L/L}$), populasi ikan jantan (39,72%), dan derajat penetasan (68,57%) adalah menurun.

Kata kunci: maskulinisasi, perendaman embrio, ekstrak purwoceng, *Betta splendens*

PENDAHULUAN

Ikan cupang *Betta splendens* jantan memiliki keunggulan antara lain harganya lebih tinggi dibandingkan dengan betina. Hal ini disebabkan beberapa keunggulan yang dimiliki oleh ikan jantan baik dari morfologi atau warna yang menjadi nilai estetikanya. Salah satu upaya untuk meningkatkan jumlah ikan jantan adalah dengan melakukan maskulinisasi untuk mengarahkan ikan menjadi berkelamin jantan.

Maskulinisasi sudah banyak dilakukan pada beberapa ikan hias menggunakan bahan yang berbeda-beda. Maskulinisasi dilakukan dengan pemberian hormon androgen pada fase diferensiasi

gonad pada ikan. Perubahan lingkungan yang diakibatkan pemberian hormon dari luar dapat menyebabkan rangsangan pada sistem saraf ikan dan memacu pelepasan hormon gonadotropin untuk pembentukan gonad jantan. Mylonas *et al.* (2010) menjelaskan bahwa perubahan lingkungan tersebut diterima oleh indra yang kemudian disampaikan ke sistem syaraf pusat. Setelah itu, informasi dikirim ke hipotalamus dan memerintahkan kelenjar hipofisis untuk mengeluarkan hormon gonadotropin. Hormon tersebut yang kemudian dibawa oleh darah dan ditransportasikan menuju gonad sebagai petunjuk untuk memulai pembentukan gonad jantan (testis).

Penggunaan hormon sintetik 17α -metiltestosteron sudah dilarang dalam kegiatan akuakultur karena sulit terdegradasi secara alami sehingga berpotensi mencemari lingkungan (Homklin *et al.*, 2009). Beberapa bahan lain yang dapat dijadikan alternatif untuk bahan pengganti hormon sintetik tersebut adalah bahan herbal/alami yang lebih ramah lingkungan. Bahan-bahan alami yang sudah digunakan dalam maskulinisasi di antaranya adalah madu (Soelistyowati *et al.*, 2007), *Tribulus terrestris* (Cek *et al.*, 2007), dan tepung testis sapi (Meyer *et al.*, 2008). Sanrego adalah tanaman yang bersifat afrodisiak yang telah dicoba berhasil meningkatkan libido rusa Timur jantan (Zumrotun *et al.*, 2006) sehingga berpeluang untuk digunakan dalam maskulinisasi ikan.

Ekstrak purwoceng *Pimpinella alpina* telah terbukti dapat meningkatkan kadar testosteron darah pada hewan percobaan tikus jantan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak purwoceng berfungsi sebagai afrodisiak (Rahardjo *et al.*, 2006). Pada percobaan ini diharapkan penggunaan ekstrak purwoceng dapat meningkatkan persentase ikan cupang jantan dan memperbaiki kelangsungan hidup. Selain itu, purwoceng adalah bahan herbal yang bersifat alami sehingga ramah lingkungan.

Purwoceng mengandung bahan aktif stigmasterol yang bersifat afrodisiak. Ekstrak tanaman purwoceng diharapkan dapat digunakan dalam maskulinisasi ikan cupang. Selama ini tanaman purwoceng banyak digunakan sebagai suplemen penambah vitalitas.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif bahan yang dapat digunakan untuk alih kelamin pada ikan, baik ikan hias dan ikan konsumsi. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh perendaman embrio ikan cupang hias dalam air mengandung ekstrak purwoceng terhadap persentase ikan jantan.

BAHAN DAN METODE

Rancangan penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan dua ulangan, serta satu perlakuan kontrol. Perlakuan dibedakan berdasarkan dosis ekstrak purwoceng yang diberikan melalui perendaman embrio yaitu 10, 20, dan 30 $\mu\text{L/L}$, dan kontrol tanpa perlakuan. Prosedur penelitian ini terbagi ke dalam beberapa tahapan yaitu pembuatan ekstrak purwoceng, pemijahan induk, perendaman embrio dalam ekstrak purwoceng, pemeliharaan

ikan uji pascaperlakuan, dan pengamatan kelamin sekunder ikan secara visual.

Pembuatan ekstrak purwoceng

Tanaman purwoceng yang digunakan berasal dari Kebun Percobaan Gunung Putri, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Ballitro) Cianjur, Jawa Barat. Tanaman yang didapatkan sudah dalam keadaan kering. Purwoceng yang sudah kering tersebut kemudian ditumbuk sampai menjadi bubuk. Purwoceng yang telah bubuk direndam dalam pelarut metanol 70% dengan perbandingan 1:2. Campuran tersebut kemudian diaduk selama tiga jam dan didiamkan (maserasi) selama 24 jam. Selanjutnya campuran tersebut disaring untuk mendapatkan ekstrak yang akan digunakan.

Pemijahan induk

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan cupang pada fase embrio. Embrio tersebut dihasilkan dari pemijahan induk ikan cupang hias jenis *halfmoon*. Induk yang telah matang gonad dan siap untuk dipijahkan. Induk terdiri dari satu pasang dengan perbandingan jantan dan betina 1:1. Induk cupang jantan yang sudah matang gonad dapat dilihat dari adanya bintik-bintik hitam pada sirip punggung dan garis vertikal berwarna kemerahan pada tutup insang. Pada betina, induk yang sudah matang gonad dapat dilihat dari perutnya yang membuncit dan terdapat dua sampai tiga garis vertikal berwarna kelabu pada sisi tubuhnya. Berdasarkan kriteria umurnya, cupang yang siap memijah adalah ikan yang sudah berumur lebih dari lima bulan (Axelrod & Burgess, 2004).

Pemijahan dilakukan dengan metode pemijahan alami, yaitu dengan memisahkan induk betina dan jantan terlebih dulu dalam satu akuarium. Induk betina ditempatkan pada wadah transparan dalam akuarium yang sama dengan induk jantan. Pemisahan induk dilakukan sampai induk jantan membuat busa-busa di permukaan air sebagai tanda siap memijah. Setelah induk jantan membuat busa-busa, induk betina kemudian disatukan dengan induk jantan dalam satu akuarium. Pemijahan terjadi saat induk jantan melingkarkan tubuhnya membentuk huruf U melilit induk betinanya.

Setelah proses pemijahan selesai, induk jantan dan betina dipindahkan ke dalam wadah yang berbeda. Telur yang dibuahi kemudian diangkat dan dipindahkan dalam stoples kapasitas 1,5 L untuk persiapan perlakuan.

Perendaman embrio dalam ekstrak purwoceng

Perendaman dilakukan pada embrio saat fase bintik mata atau sekitar jam ke-28 setelah pemijahan berlangsung. Embrio direndam dalam ekstrak tanaman purwoceng masing-masing dengan dosis 0, 10, 20, dan 30 $\mu\text{L/L}$ selama delapan jam dalam stoples yang berisi air sebanyak 1 L. Jumlah embrio yang digunakan pada setiap perlakuan adalah 35 embrio. Agar lebih mudah larut dalam air, ekstrak purwoceng ditambah etanol 95% sebanyak 0,5 mL per dosis sebelum dilarutkan dalam air. Pascaperlakuan, embrio dipindahkan ke dalam wadah pemeliharaan.

Pemeliharaan dan pengamatan ikan uji

Embrio dipelihara dalam stoples bervolume 1,5 L dan diisi air 1 L untuk pemeliharaan sampai menetas. Setelah menetas, pemeliharaan masih dilakukan di dalam stoples 1,5 L sampai larva berumur 1,5 bulan. Selanjutnya larva dipindahkan ke dalam akuarium berukuran $40 \times 40 \times 40 \text{ cm}^3$. Selama pemeliharaan dalam stoples, dilakukan pergantian air lima sampai tujuh hari sekali.

Jenis pakan yang diberikan dibedakan sesuai dengan kemampuan ikan dalam memakan makanan yang sesuai dengan bukaan mulutnya. Setelah kuning telur habis pada hari ketiga, ikan mulai diberi pakan air hijau yang diambil dari salah satu bak di Kolam Percobaan Babakan. Pemberian air hijau dilakukan sampai hari keenam. Pakan yang diberikan pada hari ketujuh sampai hari ke-13 adalah pakan alami *Artemia*. Setelah itu diberikan pakan campuran *Artemia* dan *Daphnia* sampai hari ke-17. Selanjutnya pakan *Daphnia* diberikan sampai akhir pemeliharaan yaitu pada hari ke-87. Pemberian pakan dilakukan dua kali sehari pada pagi dan sore hari.

Pemeliharaan ikan uji dilakukan selama 87 hari sampai terlihat perbedaan fenotipe kelamin sekunder ikan jantan dan betina. Ikan cupang jantan dapat dilihat dari warnanya yang cerah dan menarik, bagian perut ramping, serta sirip anal, punggung, dan ekor yang memanjang, sedangkan ikan cupang betina dapat dilihat dari warna yang pucat dan kurang menarik, perut gemuk, serta.

Variabel yang diamati

Parameter-parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi derajat penetasan telur yang dihitung dari jumlah embrio yang menetas dibandingkan dengan jumlah embrio yang ditebar, kelangsungan hidup yang dihitung dari jumlah larva awal yang dihasilkan dan jumlah ikan akhir perlakuan, persentase ikan jantan dengan

membandingkan jumlah jantan dari semua populasi dalam setiap ulangan, serta parameter bobot rata-rata akhir ikan uji. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Derajat penetasan telur pada embrio cupang yang telah direndam dengan ekstrak purwoceng berkisar antara 68,57–88,57% (Tabel 1). Hasil tersebut cenderung menurun seiring dengan meningkatnya dosis ekstrak purwoceng yang digunakan. Kelangsungan hidup pada akhir pemeliharaan berkisar 47,75–79,48% (Tabel 1). Selain kontrol, nilai kelangsungan hidup cenderung meningkat seiring dengan meningkatnya dosis ekstrak purwoceng yang digunakan. Persentase ikan jantan merupakan parameter utama dalam penelitian ini. Persentase ikan jantan tertinggi ada pada perlakuan 10 dan 20 $\mu\text{L/L}$ masing-masing sebesar 62,68% dan 62,66%, sedangkan persentase ikan jantan terendah ada pada perlakuan 30 $\mu\text{L/L}$ sebesar 39,72%. Persentase ikan jantan pada perlakuan kontrol sebesar 55,91% (Tabel 1). Bobot rata-rata akhir pada semua perlakuan memiliki nilai yang tidak seragam. Bobot rata-rata pada perlakuan 10 $\mu\text{L/L}$ yaitu sebesar 0,07 g, sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 20, 30, dan 0 $\mu\text{L/L}$ yaitu sebesar 0,06 g (Tabel 1).

Pembahasan

Persentase populasi ikan jantan tertinggi terdapat pada perlakuan 10 $\mu\text{L/L}$ dan 20 $\mu\text{L/L}$ (62,68% dan 62,66%). Nilai persentase populasi ikan jantan pada perlakuan tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol dengan persentase populasi jantannya sebesar 45,91%. Kenaikan persentase ikan jantan pada perlakuan 10 dan 20 $\mu\text{L/L}$ diduga dipengaruhi oleh bahan aktif yang terdapat dalam ekstrak purwoceng. Hal ini diduga karena di dalam tanaman purwoceng terdapat senyawa fitoandrogen berupa stigmasterol sebanyak 5,38% yang merupakan bahan baku pembuatan hormon steroid (Rahardjo *et al.*, 2006).

Persentase tertinggi populasi ikan cupang jantan yang telah dilakukan perendaman embrio dengan ekstrak purwoceng menunjukkan hasil yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian serupa menggunakan *aromatase inhibitor*. Gao *et al.* (2010) mencoba merendam larva ikan *bluegill sunfish* pada konsentrasi

aromatase inhibitor 250, 500, dan 1.000 µg/L . Hasil yang didapatkan bahwa konsentrasi 500 dan 1.000 µg/L menghasilkan jumlah ikan jantan yang lebih tinggi dibanding dengan kontrol.

Pada percobaan ini, dosis perendaman 10 dan 20 µL/L dinilai lebih baik dibandingkan dengan dosis yang lebih tinggi. Pada dosis 30 µL/L, persentase ikan jantan merupakan persentase terendah dari semua perlakuan termasuk kontrol dengan rata-rata 39,72%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis perendaman dalam kegiatan maskulinisasi ikan tidak selalu diikuti dengan peningkatan persentase populasi jantannya.

Hal serupa juga terjadi pada ikan lele Amerika *Ictalurus punctatus* yang diberikan 17α-metiltestosteron untuk menghasilkan populasi jantan yang lebih banyak dibandingkan dengan betinanya. Akan tetapi hasil yang didapatkan dari pemberian hormon 17α-metiltestosteron ini adalah populasi ikan dengan 100% betina. Hal tersebut diduga juga disebabkan oleh dosis yang berlebih. Selain itu, diduga juga pada ikan lele Amerika memiliki suatu zat yang menyerupai enzim aromatase sehingga 17α-metiltestosteron yang masuk ke dalam tubuh ikan dikonversi terlebih dahulu menjadi estradiol-17β dan berfungsi sebagai hormon tersebut. Seperti pada ikan lele Amerika, diduga pada ikan cupang juga memiliki enzim aromatase. Aromatase tersebut dapat mengkatalis androgen menjadi estrogen sehingga produksi estrogen yang berlebih tersebut akan merangsang ikan pada pembentukan gonad betina (Bhandari *et al.*, 2004).

Selain faktor dosis, keberhasilan pada pengarahan kelamin juga dipengaruhi oleh lama perlakuan dan fase ikan uji saat dilakukan perendaman. Perendaman pada saat embrio sampai fase bintik mata diduga merupakan fase paling efektif untuk melakukan kegiatan pengarahan kelamin karena perkembangan otak masih labil sehingga mudah untuk diarahkan (Soelistyowati *et al.*, 2007). Selain itu, pada fase

bintik mata embrio dianggap telah kuat untuk menerima perlakuan, sehingga dapat mengurangi resiko gagal menetas.

Peningkatan persentase populasi ikan jantan pada perendaman dengan dosis 10 dan 20 µL/L diduga karena bahan aktif dari purwoceng yang memengaruhi diferensiasi gonad. Perubahan lingkungan yang diakibatkan perendaman ekstrak purwoceng menyebabkan rangsangan pada sistem saraf ikan dan memacu pelepasan hormon gonadotropin untuk pembentukan gonad jantan

Keberhasilan terbaik kegiatan maskulinisasi pada ikan cupang adalah dengan perendaman hormon sintetik 17α-metiltestosteron pada dosis 20 mg/L. Pada perlakuan tersebut didapat persentase ikan jantan sebesar 95,90% (Junior, 2002). Namun, penggunaan 17α-metiltestosteron saat ini sudah dilarang karena bahan tersebut sulit terdegradasi secara alami sehingga berpotensi menimbulkan pencemaran lingkungan (Homklin *et al.*, 2009). Oleh karena itu, penggunaan ekstrak purwoceng bisa dijadikan salah satu alternatif untuk kegiatan maskulinisasi ikan cupang meskipun hasil akhirnya belum sebaik penggunaan 17α-metiltestosteron.

Penggunaan ekstrak purwoceng pada maskulinisasi ikan cupang dinilai tidak memberikan efek negatif pada dosis yang tepat. Hal ini terlihat pada nilai derajat penetasan (Tabel 1) yang menunjukkan nilai yang relatif tinggi. Perlakuan kontrol, 10, dan 20 µL/L menunjukkan nilai rata-rata derajat penetasan telur masing-masing sebesar 98,57%, 88,57%, dan 85,71%. Derajat penetasan telur pada perlakuan 30 µL/L terlihat lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Dosis yang berlebih dari ekstrak purwoceng dapat memberikan efek negatif yang ditunjukkan dengan rendahnya nilai HR ikan cupang.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium. Meskipun demikian, pada setiap perlakuan tidak diberikan kontrol lingkungan tambahan seperti penggunaan aerasi untuk menjaga kestabilan

Tabel 1. Parameter-parameter hasil pengamatan maskulinisasi ikan cupang hias dengan perendaman embrio dalam ekstrak purwoceng *Pimpinella alpina*

Perlakuan (ekstrak purwoceng; µL/L air)	Jumlah embrio	Derajat penetasan telur (%)	Kelangsungan hidup (%)	Persentase ikan jantan (%)	Bobot rata-rata akhir (g)
0	35	98,57±2,02	53,66±3,15	45,91±2,07	0,06±0,00
10	35	88,57±8,08	47,75±13,89	62,68±14,21	0,07±0,01
20	35	85,71±20,20	73,43±14,95	62,66±7,81	0,06±0,01
30	35	68,57±4,04	79,48±10,58	39,72±6,68	0,06±0,00

Keterangan: BETN: bahan ekstrak tanpa nitrogen.

kelarutan oksigen dan penggunaan termostat untuk menjaga kestabilan suhu. Hal ini bertujuan untuk meminimalisir kemungkinan faktor lain yang dapat memengaruhi perubahan kelamin, terutama parameter suhu. Liu *et al.*, (2008) menyatakan bahwa pada banyak ikan, tinggi rendahnya suhu dapat memengaruhi pembentukan gonad menjadi jantan atau betina. Suhu yang tinggi cenderung mengarahkan ikan pada pembentukan gonad jantan (testis). Sebaliknya, suhu yang rendah cenderung mengarahkan ikan pada pembentukan gonad betina (ovarium). Kenaikan suhu pada rentang 23–29 °C pada sebagian banyak ikan dapat meningkatkan presentasi populasi ikan jantan dalam satu keturunan. Kestabilan pada suhu tinggi 35 °C memberikan efek yang sangat kuat pada proses maskulinisasi ikan (Ito *et al.*, 2005).

Parameter kualitas air yang diamati pada penelitian ini adalah parameter suhu. Meskipun dilakukan di laboratorium, akan tetapi fluktuasi suhu yang terjadi setiap hari cenderung tinggi. Pengamatan yang dilakukan setiap pagi dan sore hari, tercatat bahwa suhu terendah dapat mencapai 23 °C dan suhu tertingginya 32 °C. Rata-rata fluktuasi harian suhu dapat mencapai 5 °C. Menurut Fernandino *et al.* (2008) dan Fernandino *et al.* (2012), fluktuasi suhu yang relatif tinggi ini diduga menjadi salah satu faktor kematian ikan. Selain karena suhu yang fluktuatif, kematian ikan juga diduga disebabkan oleh fase kritis pembentukan labirin. Axelrod dan Burgess (2004) menyatakan bahwa pada umur ikan sekitar tiga minggu organ labirin mulai terbentuk dan bersifat sangat sensitif. Pada beberapa ikan, organ tersebut tidak terbentuk sempurna, sehingga dapat menyebabkan kematian karena tidak berfungsi dengan baik.

Berdasarkan parameter pertumbuhan yang dinyatakan dengan bobot rata-rata akhir (Tabel 1), terlihat bahwa bobot rata-rata setiap perlakuan hampir seragam yaitu berkisar antara 0,06 dan 0,07 g. Hal ini menunjukkan bahwa perendaman embrio menggunakan ekstrak purwoceng tidak menghambat pertumbuhan ikan cupang.

KESIMPULAN

Penggunaan ekstrak purwoceng dalam maskulinisasi ikan cupang hias pada dosis 20 µL/L dapat meningkatkan persentase ikan cupang jantan hingga 62,66%, lebih tinggi daripada kontrol (45,91%). Pada dosis yang lebih tinggi persentase populasi ikan jantan menjadi menurun.

DAFTAR PUSTAKA

- Axelrod AR, Burgess WE. 2004. Atlas of Freshwater Aquarium Fishes, 10th ed. Neptune City, NJ: TFH Publications.
- Bhandari RK, Komuro H, Higa M, Nakamura M. 2004. Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper *Ephinephelus merra* by aromatase inhibitor. Zoological Science 21: 305–310.
- Cek S, Turan F, Atik E. 2007. The effects of gokshura *Tribulus terrestris* on sex reversal of guppy *Poecilia reticulata*. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 718–725.
- Fernandino JI, Hattori RS, Kimura H, Strussman CA, Somoza GM. 2008. Expression profile and estrogenic regulation of anti-Mullerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. Developmental Dynamic 237: 3.192–3.199.
- Fernandino JI, Hattori RS, Kishii A, Kimura H, Strobl-Mazuzulla PH, et al. 2012. The cortisol and androgen pathway cross talk in high temperature-induced masculinization: the 11b-hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. Endocrinology 153: 6.003–6.011.
- Gao ZX, Wang HP, Wallat G, Yao H, Rapp D, O'Bryant P, MacDonald R, Wang WM. 2010. Effects of a nonsteroidal aromatase inhibitor on gonadal differentiation of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Aquaculture Research 41: 1.282–1.289.
- Homklin S, Watanodorn T, Ong SK, Limpiyakorn T. 2009. Biodegradation of 17alpha-methyltestosterone and isolation of MT-degrading bacterium from sediment of Nile tilapia masculinization pond. Water Science and Technology 59: 261–265.
- Ito LS, Yamashita M, Takashima F, Strussmann CA. 2005. Dynamic and histological characteristics of gonadal sex differentiation in pejerrey *Odontesthes bonariensis* at feminizing and masculinizing temperatures. Journal of Experimental Zoology 303A: 504–514.
- Liu ZH, Zhang YG, Wang DS. 2008. Studies on feminization and differentiation of the Southern catfish *Silurus meridionalis*. Fish Physiology and Biochemistry 36: 223–235.
- Meyer D, Mraco G, Chan W, Castillo C. 2008. Use of Fresh Bull and Hog Testes in Sex Reversal of Nile Tilapia Fry. Honduras: Aquaculture

- Research Support Program US Agency for International Development (USAID).
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165: 516–534.
- Rahardjo M, Darwati I, Shusena A. 2006. Produksi dan mutu simplisia purwoceng berdasarkan lingkungan tubuh dan umur tanaman. *Jurnal Bahan Alam Indonesia* 5: 310–316.
- Soelistyowati DT, Martati E, Arfah H. 2007. Efektivitas madu terhadap pengarahannya kelamin ikan gapi *Poecilia reticulata* Peters. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 6: 155–160.
- Zumrotun, Masyud B, Thohari AM. 2006. Peranan sanrego *Lunasia amara* Blanco dalam peningkatan libido seksual rusa timur *Cervus Timorensis* de Blainville. *Media Konservasi* 11: 72–76.