

## **PRESERVASI BEKU SPERMATOZOA IKAN CUPANG (*Betta splendens*) STRAIN HALF-MOON DALAM MADU DAN NaCl FISILOGIS**

**Rika Prihati Cahyaning Pertiwi<sup>1\*</sup>, Isdy Sulisty<sup>1</sup>, Purnama Sukardi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman

Kompleks GOR Soesilo Soedarman, Karangwangkal, Purwokerto 53123

\*Email: [rikapertiwi@unsoed.ac.id](mailto:rikapertiwi@unsoed.ac.id)

### **ABSTRACT**

*A study entitled “Chilled Preservation of Spermatozoa Half-moon Strain Fighting Fish (*Betta splendens*) in Honey and Physiological NaCl”, was conducted to determine preserved spermatozoa motility and viability of Fighting Fish in honey and NaCl solutions, under chilling temperature (-25°C). The study applied Completely Randomized Design (CRD) to examine three treatments, i.e aquadest, 0.09% NaCl and honey extenders, with quantuplicates. Data, being spermatozoa motility (%) and viability (time in second), were F-tested (ANOVA) and followed by LSD test (P<0.01). After storage of 7 days, the result showed that spermatozoa motility did not differ between treatments, however the viability of spermatozoa were significantly different (P<0.01). The highest viability was observed in sperm stored in extender Honey averaging 368.90±102.16 seconds, compared to the 0.09% NaCl extender (81.79±8.54 seconds), and aquadest (187.90±35.36 seconds). It was concluded that the Honey, NaCl 0.09% and aquadest as extenders could be used as preservation solution fighting fish spermatozoa. The best viability of spermatozoa was observed in honey extender.*

**Keywords:** *Betta Fish, Honey, NaCl, Preservation, Spermatozoa*

### **ABSTRAK**

Penelitian berjudul “Preservasi Beku Spermatozoa Ikan Cupang (*Betta splendens*) Strain Half-moon Dalam Madu Dan NaCl Fisiologis”, telah dilakukan untuk menguji motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan Cupang strain half-moon pasca preservasi beku (-25°C) dalam larutan madu dan NaCl fisiologis sebagai ekstender. Penelitian menerapkan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk mencoba 3 perlakuan, yaitu ekstender Aquades, NaCl fisiologis 0.09% dan Madu, dengan 5 ulangan. Data, berupa motilitas (%) dan viabilitas (detik) spermatozoa, diuji F dengan analisis variansi (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji BNT (P>0,01). Pasca preservasi beku selama 7 (tujuh) hari, hasil pengamatan menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa ikan Cupang antar perlakuan tidak berbeda, tetapi waktu viabilitas spermatozoa berbeda sangat nyata (P<0,01). Viabilitas tertinggi diamati pada spermatozoa yang disimpan dalam ekstender Madu yaitu 368,90 ± 102,16 detik, dibanding dengan ekstender NaCl 0,09% yaitu 81,79 ± 8,54 detik, dan Aquades sebesar 187,90 ± 35,36 detik. Kesimpulan penelitian bahwa ekstender Madu, NaCl 0,09% dan Aquades dapat digunakan sebagai bahan untuk preservasi beku spermatozoa ikan Cupang stain half-moon. Viabilitas spermatozoa terbaik pada ekstender madu.

**Kata Kunci:** Ikan Cupang, Madu, NaCl, Preservasi, Spermatozoa

## PENDAHULUAN

Ikan Cupang (*Betta splendens*) adalah salah satu jenis ikan hias air tawar yang sangat potensial di Indonesia, hal ini di karenakan ikan cupang memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Pemasaran ikan cupang meliputi berbagai wilayah kota-kota besar di Indonesia. Permintaan ikan Cupang semakin hari semakin meningkat baik di dalam negeri maupun di luar negeri. Dengan adanya permintaan yang meningkat sehingga mendorong perkembangan budidaya ikan hias di Indonesia. Dipasaran Ikan Cupang jantan memiliki nilai jual yang lebih tinggi sehingga sangat disukai dan diburu oleh pecinta ikan hias, selain itu ikan cupang jantan memiliki bentuk tubuh dan ekor yang lebih menarik dan beragam (Yustina *et al.*, 2012). Keterbatasan benih merupakan kendala dalam budidaya ikan cupang. Keterbatasan ini dipengaruhi oleh keberhasilan fertilisasi oleh spermatozoa sehingga ova ada yang tidak terbuahi secara sempurna (Masrizal dan Efrizal, 1997). Kendala dalam budidaya ikan cupang biasanya kesulitan dalam mendapatkan ikan jantan dengan kualitas baik dan ikan cupang betina yang jarang tersedia dipasaran, selain itu menurut Yustisina *et al.*, 2003 ikan cupang termasuk memiliki daya tetas yang rendah.

Salah satu cara budidaya ikan cupang yaitu dengan cara sistem pemijahan buatan, cara ini memudahkan pembudidaya ikan cupang untuk mendapatkan varietas baru. Kendala yang dihadapi para pembudidaya dalam pemijahan buatan adalah kurangnya ketersediaan jumlah spermatozoa dan rendahnya kualitas pembuahan spermatozoa pada waktu pemijahan buatan. Rendahnya pembuahan spermatozoa disebabkan oleh motilitas spermatozoa yang relative singkat (Simbolon *et al.* (2013), Nurman, 1998). Menurut Wijayanti dan Simanjutak (2006) menyatakan kelangsungan hidup spermatozoa diluar testis berkisar 1-2 menit ini di sebabkan karena spermatozoa terus bergerak hingga mati kehabisan energi. Berdasarkan informasi tentang keberlangsungan spermatozoa diluar testis inilah menunjukkan keterbatasan viabilitas dan motilitas spermatozoa dalam membuahi ova.

Dalam satu siklus reproduksi, ikan cupang betina dapat menghasilkan ribuan sampai jutaan ova per ekor, akan tetapi yang terbuahi hanya mencapai 5%. Menurut Yustina *et al* (2003), menyatakan bahwa ikan cupang berfekunditas kecil, telur yang dihasilkan saat pemijahan sekitar 755-900 butir. Salah satu cara untuk memperbanyak jumlah spermatozoa adalah dengan cara memberikan rangsangan hormonal. Menurut Marzinal dan Efrizal, (1997) bahwa Larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa antara 20-25 menit. Fungsi larutan ekstender fisiologis di gunakan untuk mempertahankan spermatozoa hidup lebih lama, sehingga frekuensi motilitas dan viabilitas spermatozoa dapat bertahan lebih lama setelah keluar dari testis. Menurut Sunarma *et al.*, (2010) menyatakan bahwa keberhasilan pengawetan spermatozoa ditentukan oleh kualitas bahan ekstender yang digunakan dalam proses penyimpanan spermatozoa sehingga dapat mengurangi aktifitas spermatozoa, memperpanjang hidup spermatozoa dan menjaga kualitas spermatozoa pada saat proses penyimpanan. Effendi (1997), menyatakan bahwa kemampuan spermatozoa secara normal setelah keluar dari testis berkisar antara 1-2 menit.

Madu merupakan salah satu bahan yang dapat di gunakan sebagai ekstender dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas dari spermatozoa (Tumanung *et al.*, 2015). Dalam ekstender madu terdapat bahan-bahan yang mengandung glukosa, sukrosa dan fruktosa yang dibutuhkan spermatozoa dalam plasma semen. Fruktosa merupakan turunan karbohidrat dan dapat dijadikan sumber energi untuk mendukung motilitas spermatozoa dan viabilitas spermatozoa pasca penyimpanan (Nainggolan *et al.*, 2015). selain madu bahan ekstender yang mengandung ion-ion  $\text{Na}^+$  ,  $\text{K}^+$  ,  $\text{Cl}$  , atau gula memiliki konsentrasi ekuivalen dengan konsentrasi osmotik pada plasma semen sehingga spermatozoa dapat bertahan hidup lebih lama (Billard *et al.*, 1995). Ekstender tidak hanya berfungsi sebagai pengontrol pH, tetapi juga sebagai sumber nutrisi bagi spermatozoa (Tiersch, 2006). Larutan fisiologis yang terkandung dalam plasma semen salah satunya adalah larutan NaCl fisiologis yang dapat mempertahankan viabilitas dan motilitas spermatozoa (Muchlisin *et al.*, 2004).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan objek ikan Cupang (*Betta splendens*) jantan strain half-moon yang matang kelamin. Tanda-tanda ikan cupang jantan matang kelamin adalah berwarna cerah, sirip ekor lebar, pada lubang urogenital terdapat tonjolan berwarna putih dan bintik – bintik hitam di bagian punggung.

Pengambilan spermatozoa ikan Cupang jantan strain half-moon dilakukan dengan cara:

- Mengukur panjang standar ikan Cupang dengan menggunakan penggaris dengan ketelitian 1mm dan menimbang bobot ikan Cupang menggunakan timbangan analitik (merk ohaus dengan ketelitian 0,0001), ini dilakukan pada semua ikan Cupang yang akan digunakan untuk penelitian.
- Ikan Cupang dimatikan dengan cara menusuk bagian dorsal kepala, kemudian dibedah dan diambil testisnya.
- Milt diambil 1 tetes kemudian diberi larutan ekstender 9 tetes. (1:9)

Pengawetan Spermatozoa ikan Cupang jantan strain half-moon dilakukan dengan cara:

- Memasukan milt 1 tetes dan ekstender aquades 9 tetes ke dalam tabung eppendorf, ini dilakukan pada ikan Cupang sebanyak 5 ekor.
- Memasukan milt 1 tetes dan ekstender Madu 9 tetes ke dalam tabung eppendorf, ini dilakukan pada ikan Cupang sebanyak 5 ekor.
- Memasukan milt 1 tetes dan ekstender NaCl fisiologis 9 tetes ke dalam tabung eppendorf, ini dilakukan pada ikan Cupang sebanyak 5 ekor.
- Kemudian semua sampel dimasukkan ke dalam Freezer (merk DEA) dan diawetkan pada temperature  $-25^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari.

Pengamatan spermatozoa ikan Cupang (*Betta splendens*) dilakukan menggunakan mikroskop (merk olimpus) dengan menghitung waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa dalam satu bidang pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara:

- a. Setelah disimpan di dalam freezer pada temperature  $-25^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari, setiap sampel dalam tabung eppendorf diambil dan dibiarkan mencair pada temperatur ruang (*Thawing*), setelah mencair kemudian diaktifkan menggunakan activator Ringer untuk ikan, kemudian diamati motilitasnya dibawah mikroskop.
- b. Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan mencatat berapa persentase spermatozoa yang bergerak pada saat *fast progressive* (pergerakan spermatozoa yang bergerak sangat cepat dengan arah maju) dan *slow progressive* (pergerakan spermatozoa yang bergerak lambat dengan arah maju) sampai spermatozoa tidak bergerak.
- c. Kemudian motilitas spermatozoa dipersentasekan dengan mengklasifikasikan pada kisaran nilai 1-5 yaitu 1 (tidak ada pergerakan yang teramati), 2 (pergerakan sel hanya 25%), 3 (pergerakan sel hingga 50%), 4 (pergerakan sel hingga 75%), dan 5 (pergerakan sel hingga 100%).

Pengamatan viabilitas spermatozoa ikan Cupang dilakukan dengan cara:

- a. Setelah disimpan dalam freezer pada temperature  $-25^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari, setiap sampel dalam tabung eppendorf diambil dan dibiarkan mencair pada temperatur ruang (*Thawing*), setelah mencair kemudian diaktifkan menggunakan activator Ringer untuk ikan, kemudian diamati viabilitasnya dibawah mikroskop.
- b. Catat waktu (detik) viabilitas spermatozoa yaitu mulai dari bergerak lamban, bergerak berputar di tempat, bergerak lemah sampai tidak bergerak lagi.

Data viabilitas dan motilitas spermatozoa ikan Cupang (*Betta splendens*) dianalisis variansi (ANOVA). Uji BNT dilakukan untuk membandingkan antar perlakuan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

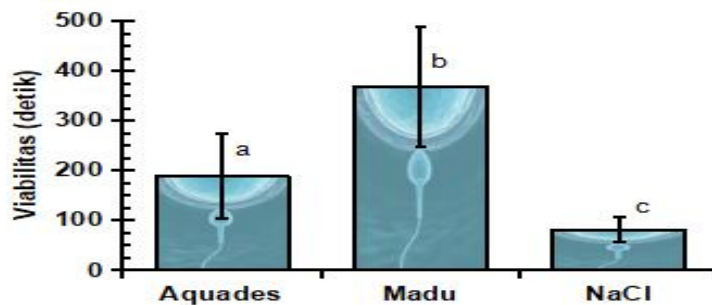
Hasil pengamatan pada penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan ekstender NaCl fisiologis menunjukkan rata-rata motilitas spermatozoa sebanyak 0,52% jumlah sel yang bergerak sama seperti rata-rata motilitas ekstender aquades sebagai kontrol, ini menunjukkan bahwa penggunaan ekstender tersebut efektif untuk mempertahankan motilitas spermatozoa ikan Cupang walaupun tidak seefektif pada penggunaan ekstender madu. Menurut Ohta dan Izawa (1996), spermatozoa yang disimpan dalam larutan isotonik berupa NaCl, Manitol, NaCl + CaCl dan NaCl<sub>2</sub> menunjuk motilitas yang rendah, hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan. Penelitian yang telah dilaksanakan menunjukkan bahwa penggunaan ekstender madu, NaCl fisiologis dan aquades terhadap viabilitas spermatozoa berpengaruh sangat nyata ( $p < 0,01$ ). Hal ini dibuktikan dengan hasil penelitian, bahwa spermatozoa ikan cupang pasca pengawetan dalam ekstender madu, NaCl fisiologis, serta aquades mampu bertahan hidup.

Ekstender madu dan NaCl serta aquades sebagai kontrol menunjukkan viabilitas yang baik. Ekstender yang mengandung fruktosa dapat di jadikan sumber energi untuk motilitas spermatozoa dan viabilitas pasca penyimpanan

(Nainggolan *et al*, 2015). Madu sebagai ekstender lebih baik dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa dari pada ekstender NaCl fisiologis dan aquades. Ekstender berbahan dasar gula memiliki konsentrasi ekuivalen dengan konsentrasi osmotik pada plasma semen sehingga spermatozoa dapat bertahan hidup lebih lama (Rahardianto *et al.*, 2012; Sunarma *et al.*, 2010).

**Tabel 1. Viabilitas Spermatozoa Ikan Cupang Pasca pengawetan 7 hari**

Ekstender	Viabilitas (detik)					rata-rata±SD
	1	2	3	4	5	
Aquades	204,0	204,5	178,5	124,5	228,0	187,90±35,36
Madu	309,5	301,5	568,5	361,0	304,0	368,90±102,16
NaCl	89,9	86,8	71,0	71,9	89,5	81,79±8,56



**Gambar 1. Viabilitas Spermatozoa Ikan Cupang Pasca pengawetan, grafik dengan superscripts berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P>0,05$ ).**

Gambar 1 menunjukkan bahwa penggunaan ekstender madu paling lama waktu viabilitasnya yaitu 368,90 detik. Sedangkan waktu viabilitas yang kedua pada ekstender aquades selama 187,90 detik dan waktu viabilitas yang terakhir pada ekstender NaCl fisiologis selama 81,79 detik. Penggunaan madu lebih efektif karena di dalam madu terdapat bahan-bahan seperti glukosa, fruktosa, sukrosa yang berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi spermatozoa pasca pengawetan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sunarma *et al* (2010) dan Rahardianto *et al* (2012), bahwa ekstender madu dapat digunakan untuk mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa pada ikan. Pada penggunaan ekstender NaCl fisiologis menunjukkan waktu yang paling rendah ini disebabkan di dalam NaCl fisiologis merupakan larutan isotonik yang kurang efektif dalam mempertahankan hidup dari spermatozoa. Menurut Ohta dan Izawa (1996), spermatozoa yang disimpan dalam larutan isotonik menunjukkan viabilitas rendah, hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan bahwa penggunaan ekstender NaCl fisiologis memiliki rata-rata viabilitas rendah dari pada ekstender madu. Madu sebagai ekstender dapat dijadikan sumber energi untuk spermatozoa yang lebih lengkap dibandingkan eksternder NaCl fisiologis dan ekstender aquades. Walaupun

penggunaan ekstender aquades dan NaCl fisiologis juga efektif tetapi hasilnya tidak sebaik penggunaan madu

Hasil pengamatan motilitas spermatozoa ikan cupang strain half-moon pasca pengawetan dalam madu dan NaCl fisiologis serta aquades sebagai kontrol pada temperature  $-25^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari menunjukkan, antar perlakuan tidak berbeda nyata ( $F$  hitung  $<$   $F$  table 0,01), hal ini menunjukkan, bahwa ekstender tidak terdapat perbedaan dalam mempertahankan motilitas spermatozoa ikan cupang strain half-moon, ada kemungkinan penggunaan ekstender berisi bahan-bahan dengan konsentrasi ekuivalen yang sesuai dengan konsentrasi osmotik plasma semen sehingga spermatozoa masih dapat aktif bergerak. Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Billard *et al* (1995), yang menyatakan bahwa ekstender yang mengandung ion-ion atau gula ekuivalen dengan konsentrasi osmotik pada cairan plasma semen sehingga spermatozoa dapat hidup lebih lama. Ekstender yang di dalamnya berupa DMA, DMSO dan gliserol dapat memperpanjang hidup spermatozoa (Akçay *et al.*, 2004). Milt yang dicampur dengan ekstender buatan secara nyata dapat memperpanjang waktu penyimpanan spermatozoa dan mempertahankan motilitas spermatozoa (Park dan Chapman, 2005). Penggunaan madu dan NaCl fisiologis sebagai ekstender terbukti dapat mempertahankan hidup dari spermatozoa ikan Cupang strain half-moon, hal ini karena di dalam ekstender tersebut terdapat bahan yang ekuivalen dengan konsentrasi osmotik plasma semen sehingga spermatozoa pasca pengawetan masih dapat bergerak. NaCl fisiologis adalah larutan yang mengandung bahan isotonik yang sesuai dengan konsentrasi osmotik pada plasma semen sebagai sumber nutrisi spermatozoa sehingga motilitas spermatozoa pasca pengawetan tetap terjaga ( Muchlisin *et al*, 2004; Alavi dan Cosson, 2006).

Pada Penggunaan ekstender madu dan NaCl serta aquades sebagai kontrol menunjukkan motilitas yang baik. Penggunaan madu sebagai ekstender menunjukkan, bahwa rata-rata motilitas yang paling tinggi sebanyak 0,55% sel yang bergerak. Ekstender madu lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa dari pada ekstender NaCl fisiologis dan aquades, ini menunjukkan penggunaan ekstender madu dapat digunakan sebagai ekstender dalam pengawetan spermatozoa dalam mempertahankan motilitas spermatozoa ikan Cupang, sesuai dengan pernyataan Sunarma *et al* (2010) bahwa madu sebagai ekstender mengandung larutan berbahan dasar gula, seperti glukosa, sukrosa dan fruktosa yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa.

## **PENUTUP**

### **Kesimpulan dan Saran**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dan pembahasan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstender Madu, NaCl fisiologis, dan Aquades dapat digunakan sebagai bahan untuk pengawetan spermatozoa. Viabilitas spermatozoa terbaik pada penggunaan ekstender madu.

Saran dalam penelitian mengenai spermatozoa perlu dilakukan lebih lanjut, terutama tentang pengawetan spermatozoa pada temperature yang berbeda-beda dan kombinasi ekstender yang lebih beragam sehingga didapatkan hasil spermatozoa pasca pengawetan yang memiliki viabilitas dan motilitas lebih baik dalam membuahi ovarium.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akçay, E., Y. Bozkurt., S. Secer, and Tekin. 2004. Cryopreservation of mirror Carp semen. *Turk J Vet Anim Sci*, 28:837-843.
- Alavi, S. M. Ha., J. Cosson. 2006. Sperm motility in fishes II. effects of ion and osmolality. *Cell Biology International*, 30:1-14.
- Billard, R., J. Cosson., G. Percheç, and O. Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in Carp. *Aquaculture*, 129:95-112.
- Masrizal., Efrizal. 1997. Pengaruh rasio pengenceran mani terhadap fertilisasi sperma dan daya tetas telur ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). *Fisheries Journal Garing*, 6:1-9.
- Muchlisin, Z. A., R Hashim, and A. S. C. Chong. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical Bagrid Catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the Motility after short-term storage. *Theriogenology*, 62:25-34.
- Nainggolan, R., Monijung R. D., dan W. Mingkid. 2015. Penambahan Madu Dalam Pengenceran Sperma Untuk Motilitas Spermatozoa Fertilisasi dan Daya Tetas Telur Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Budidaya Perairan*. **3(1)**: 131-140.
- Nurman. 1998. Pengaruh Penyuntikan Ovaprim Terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Lele Dumbo (*Clariass gariepinus* Burchell). *Fisheries Journal Garing*, 7: 34-42.
- Ohta, H., T. Izawa. 1996. Diluent For Cool Storage of The Japanese eel (*Anguilla japonica*) Spermatozoa. *Aquaculture*, 142:107-118.
- Park, C., F. A. Chapman. 2005. An Extender Solution for the Short-Term Storage of Sturgeon Semen. *North American Journal of Aquaculture*, 67:52-57.
- Rahardhianto, A., Nurlita Abdulgani, dan Ninis Trisyani. 2012. Pengaruh Konsentrasi Larutan Madu dalam NaCl Fisologis Terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) Selama Masa Penyimpanan. *Jurnal Sains dan Seni*. **1(1)**:58-63.
- Simbolon IS., Lubis TM., dan Adam M. 2013. Persentase Spermatozoa Hidup pada Tikus Wistar dan Sprague-Dawley. *Jurnal Medika Veterinaria*. **7(2)**: 0853-1943.
- Sukmawati E., Arifiantini R. I., dan Purwantara B. 2014. Daya Tahan Spermatozoa terhadap Proses Pembekuan pada Berbagai Jenis Sapi

Pejantan Unggul. *Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor*. **19(3)**: 168-175.

Sunarma, A., Budihastuti D. W., dan Y. Sistina. 2010. Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii*). *Jurnal Omni-Akuatika*. **9(11)**:51-55.

Tiersch, T. R. 2006. Fish Sperm Cryopreservation of Genetic Improvement and Concervation in Southeast Asia. *Fish for the People*, 4(2):21-33.

Tumanung, S., Sinjal H. J., dan Watung J. Ch. 2015. Penambahan Madu Dalam Pengenceran Sperma untuk Meningkatkan Motilitas, Fertilitas dan Daya Tetas Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*). *Jurnal Budidaya Perairan*. **3(1)**:55-58.

Wijayanti, G. E., dan Simanjutak, Sorta, B. I. 2006. Viabilitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti C.V*) Setelah Penyimpanan Jangka Pendek dalam Larutan Ringer. *Jurnal Perikanan (J. Fish. Sci)*. **8(2)**:207-214.

Yusntina., Arnentis., Darmawati. 2003. Daya Tetas dan Laju Pertumbuhan Larva Ikan Hias Betta splendens di Habitat Buatan. *Jurnal Natur Indonesia*, 5(2): 129-132.

-----.,Dian A.2012. Efektivitas Tepung Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) terhadap Maskulinisasi Ikan Cupang (*Betta splendens*). *Jurnal Biogenesis*. **9(1)**:37-44.