

**POTENSI STEROID ALAMI TUMBUHAN PASAK BUMI  
(*Eurycoma longifolia* Jack) UNTUK MASKULINISASI  
IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

**DISERTASI**



Oleh

**NOOR SYARIFUDDIN YUSUF  
NIM. 117080100111014**

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN  
MINAT BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**



**POTENSI STEROID ALAMI TUMBUHAN PASAK BUMI  
(*Eurycoma longifolia* Jack) UNTUK MASKULINISASI  
IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

**DISERTASI  
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN  
MEMPEROLEH GELAR DOKTOR**



Oleh

**NOOR SYARIFUDDIN YUSUF  
NIM. 117080100111014**

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN  
MINAT BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**





**POTENSI STEROID ALAMI TUMBUHAN PASAK BUMI  
(*Eurycoma longifolia* Jack) UNTUK MASKULINISASI  
IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

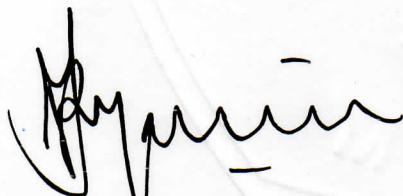
Oleh

**NOOR SYARIFUDDIN YUSUF  
NIM. 117080100111014**

**Menyetujui,  
Komisi Pembimbing**



**Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS.  
Promotor**




**Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA., Ph.D.  
Ko-Promotor 1**



**Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si  
Ko-Promotor 2**

**Mengetahui,  
Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**



**Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.  
NIP. 196003221986011001**

## IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Potensi Steroid Alami Tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Untuk Maskulinisasi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Nama Mahasiswa : Noor Syarifuddin Yusuf

NIM : 117080100111014

Program Studi : Ilmu Perikanan dan Kelautan

Minat : Bioteknologi Perikanan dan Kelautan

### KOMISI PEMBIMBING

Promotor : Prof.Dr.Ir. Sri Andayani, MS.

Ko-Promotor 1 : Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D.

Ko-Promotor 2 : Dr.Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si.

### KOMISI PENGUJI

Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si.

Penguji 2 : Dr. Ir. Muhammad Fajar, MS.

Penguji 3 : Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc.

Penguji 4 : Prof. Dr. agr. Mohamad Amin, S.Pd., M.Si.

Ujian Akhir Disertasi : 26 November 2019



## PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur sengaja plagiasi, saya bersedia Disertasi (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, Desember 2019  
Penulis



Noor Syarifuddin Yusuf  
NIM.117080100111014



# SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI



19 0185 D

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
PASCASARJANA**

**SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI**  
Nomor: 2907/UN10.F40/PN/2019

Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama	: Noor Syarifuddin Yusuf
NIM	: 117080100111014
Program Studi	: Program Doktor Ilmu Perikanan Dan Kelautan
Fakultas	: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas	: Universitas Brawijaya

Dengan Judul Disertasi  
**Potensi Steroid Alami Tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) untuk Maskulinisasi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**

Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal **28 November 2019** dan dinyatakan **bebas plagiasi** dengan kriteria toleransi  $\leq 5\%$ .

Direktur



Prof. Dr. Marjono, M.Phil  
NIP. 196211161988031004

Malang, 28 November 2019  
Ketua Badan Penerbitan Jurnal



Indah Yanti, S.Si., M.Si.  
NIP. 19791129 200501 2 002





## RIWAYAT HIDUP



Noor Syarifuddin Yusuf anak keempat dari empat bersaudara dari pasangan Bapak H. Mohamad Said Yusuf dan Ibu Hj. Siti Zakiah, dilahirkan di Banjarbaru Kalimantan selatan tanggal 3 Juli 1971. Menikah dengan Siska Yolanda dan dikarunia tiga orang putra-putri yaitu Marsya Aulia Almavira Yusuf, Garry Noor Muhammad Yusuf dan Raisya Queen Diandra Yusuf.

Menyelesaikan pendidikan dasar di SDN Mawar Kencana NI.3 Banjarbaru pada tahun 1984, Pendidikan Menengah Pertama di SMP Negeri 2 Banjarbaru pada tahun 1987, Pendidikan Menengah Atas di SMA Negeri 1 Banjarbaru pada tahun 1990. Pendidikan Sarjana Strata-1 ditempuh di Program Studi Budidaya Perikanan Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru Kalimantan Selatan dan lulus sebagai sarjana perikanan (S.Pi) pada tahun 1996. Gelar Magister Sains (M.Si) diperoleh pada tahun 2005 dari Program Studi Ilmu Perairan Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

Sejak tahun 1998 sampai sekarang, bekerja sebagai staf edukatif di Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan Program Studi Budidaya Perairan Universitas Palangkaraya, Kalimantan Tengah .

Malang, Desember 2019  
Penulis

Noor Syarifuddin Yusuf  
NIM.117080100111014



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan Syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan Rahmat dan HidayahNya hingga dapat menyelesaikan laporan hasil disertasi pada Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan Program Pasca Sarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Kekuatan diantara kelemahan, kemudahan diantara kesulitan, kemampuan diantara ketakberdayaan selama menempuh perkuliahan hingga penyelesaian disertasi menjadi titik terang bahwa tak seorangpun yang mampu menyelesaikan pekerjaan tanpa keterlibatan, motivasi dan bantuan pihak lain, oleh karena itu dengan ketulusan, keikhlasan dan kerendahan hati penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu baik dari perkuliahan, penelitian hingga penyelesaian disertasi.

Penghargaan dan terima kasih yang setinggi tingginya penulis haturkan kepada Ibu Prof.Dr.Ir. Sri Andayani, MS. selaku promotor, ibu Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D. dan Bapak Dr.Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si. selaku ko-promotor. Ungkapan terima kasih atas segala bimbingan, saran, koreksi, pengertian, kesabaran dan motivasi yang diberikan sehingga menumbuhkan kekuatan dan kepercayaan penulis untuk menyelesaikan disertasi ini. Ungkapan terima kasih dan penghargaan dihaturkan kepada Bapak Prof. Dr. Ir.Chanif Mahdi, MS., Bapak Dr. Ir. Maheno, MS. Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si., Dr. Ir. Muhammad Fajar, MS. Dan Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc. selaku penguji internal Universitas Brawijaya, Ibu Dr. Ir. Ety Riani, MS selaku penguji eksternal dari Institut Pertanian Bogor dan Prof. Dr. agr. Mohamad Amin, S.Pd., M.Si. dari Universitas Negeri Malang yang telah memberikan arahan, saran-saran dan bimbingan guna melengkapi disertasi ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Rektor, Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Ketua dan sekretaris program Doktor FPIK UB, semua dosen pengampu mata kuliah Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan UB dan seluruh staf administrasi atas segala bantuan dan keikhlasannya selama proses perkuliahan hingga akhir studi.

Penulis sampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Palangka Raya, Dekan Fakultas Pertanian Palangka Raya, Ketua Jurusan Perikanan Universitas Palangka Raya dan seluruh staf yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk melanjutkan studi.Terima kasih disampaikan kepada kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan bantuan Beasiswa Program Pendidikan Dalam Negeri (BPPDN).

Terima kasih yang tulus dan sedalam dalamnya penulis sampaikan kepada seluruh rekan-rekan seperjuangan di Program Doktor FPIK, terkhusus Angkatan 2011 yang telah banyak membantu dan bersama-sama melaksanakan perkuliahan terkhusus kepada Firliyanti, Anang Najamuddin, Yuliadi Hodi, Febri Susane Ivonne Menajang dan Nova Laurin Isye Mourin Ogi.

Terima kasih dan doa yang selalu dipanjatkan atas ilmu yang bermanfaat untuk para guru yang banyak memberikan pengaruh pada kehidupan penulis yaitu Almarhum Prof.Dr.Ir. Ali Hasymi, MS.,MA; Almarhum Prof. Ir. Djasmani Hisbi, MS; Almarhum Ir. Gusti Chairudin, M.Si; Almarhum Ir.Saaludin Husin; Ir. Riswandy Bandung, MS dan Ir. Suhaili Asmawi, MS.





Rasa hormat dan terima kasih yang tiada henti penulis haturkan kepada ayahanda almarhum H. Mohammad Said Yusuf dan Ibunda tercinta almarhumah Hj. Siti Zakiah yang telah melahirkan, membesarkan, mendidik dan tiada henti memberikan kasih sayang. Rasa hormat dan terima kasih yang sedalam dalamnya penulis haturkan kepada istri terkasih Siska Yolanda, saudaraku terkasih Endah S. Qomariah, Isnaeni Rofiqah dan Hamdi, Akhmad Bayhaqie dan Wahidah, Muhammad Faqih Fadillah dan Aninditha yolanda, Bapak dan ibu mertua almarhum Bapak Mahran Nita dan almarhumah Ibunda Mini Hendratna serta anak-anak tercinta Marsya Aulia Almavira Yusuf, Garry Noor Muhammad Yusuf dan Raisya Queen Diandara Yusuf atas pengertian, pengorbanan, dukungan, kasih sayang dan doa selama ini.

Ucapan terima kasih yang tulus ikhlas disampaikan kepada semua pihak yang telah banyak membantu dalam banyak hal selama menempuh pendidikan, melaksanakan penelitian dan menyelesaikan disertasi baik secara langsung atau tidak, yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga semua amal kebaikan yang telah diberikan mendapatkan balasan yang berlipat ganda dari Allah SWT.

Malang, Desember 2019  
Penulis,

Noor Syarifuddin Yusuf  
NIM.117080100111014.



## GLOSARIUM

μg	microgram
μL	microliter
μm	micrometer
°C	derajat celsius
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry International
BB	Berat Badan
buccal cavity	rongga mulut
C3	3 atom karbon
C17	17 atom karbon (Steroid)
C19	19 atom karbon (Testosteron)
DDY	Deutschland, Denckenand dan Yoken
DNA	deoxyribonucleic acid
EPB	Ekstrak metanol akar Tumbuhan Pasak Bumi
et al.	and others
EtOAc	Etil asetat
euryhaline	Mentoleransi terhadap perbedaan salinitas yang luas.
FTIR	Spektrofotometer Fourier Transform Infra Red
FSH	Follicle Stimulating Hormone
G	gramme(s)
GCMS	Gas Cromatografy Mass Spectrometry
GF254	Menyerap cahaya pada gelombang 254 nm
HCl	Hidrogen clorida
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton(s)
Kg	kilo gram
KLT	kromatografi lapis tipis
KK	Kromatografi kolom
L	Liter
LH	Luteinizing hormone
LPS	Lipopolisakarida
LD	Lethal dosis
M	Molar
mA	miliampere
middle-aged male rats	Tikus jantan berusia 12 minggu
MeOH	metanol
ml	mililiter
mg	miligram
mm	milimeter
MT	Metil testosteron
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NaCl	Natrium clorida
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
OD	optical density
P	permeabilitas
PA	pro analisis
Psike	Jiwa
PCR	polymerase chain reaction
pH	<i>Power of Hydrogen</i>



pl	Isoelectric point
Rf	<i>Retention factor</i>
RNA	ribonucleic acid
SEM	Scanning Electron Microscopy
Simplisia	Bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat tradisional yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain merupakan bahan yang dikeringkan
solvent	Pelarut
sp	spesies
SPB	Ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi
ST	Stigmasterol sintetik
TEM	Transmission Electron Microscopy
UV	Ultraviolet
UV-Vis	Ultraviolet-visible
v	volt
v/v	Volume/volume
WC	Whole cell
w/v	Weigh/volume
XX	betina memiliki dua dari kromosom seks yang sama jenisnya (XX) dan disebut kelamin homogenik
XY	jantan memiliki dua kromosom seks berbeda (XY) dan disebut kelamin heterogenik





## RINGKASAN

Nama Mahasiswa: Noor Syarifuddin Yusuf, NIM : 117080100111014 Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan, Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, September 2019, "**Potensi Steroid Alami Tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Untuk Maskulinisasi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**", Komisi Pembimbing/Promotor : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS; Ko-Promotor I : Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D.; Ko-Promotor II : Dr. Ir. Abdul Rahem Faqih, MS.

Laporan hasil disertasi dengan judul "**Potensi Steroid Alami Tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Untuk Maskulinisasi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**" bertujuan menganalisis kandungan senyawa bioaktif steroid dari bagian tumbuhan Pasak Bumi untuk mendapatkan pelarut, metode ekstraksi yang menghasilkan steroid tertinggi, mengisolasi stigmasterol dari bagian tumbuhan pasak bumi yang memiliki kandungan steroid tertinggi dan menganalisis performa ekstrak steroid dan ekstrak kolom stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi pada maskulinisasi ikan Nila. Penelitian ini dilaksanakan dalam tiga tahapan dengan perincian sebagai berikut:

**Tahapan Pertama.** Melakukan analisis dan karakterisasi senyawa aktif tumbuhan Pasak Bumi yang diawali dengan penyiapan bahan baku bagian tumbuhan Pasak Bumi berupa akar, batang, kulit, daun dan ranting berbentuk serbuk halus atau tepung (Powder). Pengujian proximat untuk mengetahui persentase kandungan protein, lemak, air, karbohidrat dan kadar abu. Pengujian fitokimia bagian tumbuhan Pasak Bumi secara kualitatif dengan menganalisis golongan senyawa alkaloid, flavanoid, saponin, terpenoid, polifenol dan steroid pada bagian akar, batang, kulit, daun dan ranting. Analisis kandungan senyawa bioaktif steroid dari bagian tumbuhan Pasak Bumi memperlihatkan efektivitas metode pengekstraksi pada bagian tumbuhan Pasak Bumi adalah akar yang direflux dengan pelarut metanol (rendemen 9,22%), ranting yang disoklet dengan pelarut metanol (rendemen 6,09%), batang yang direflux dengan pelarut metanol (rendemen 4,30%), daun yang direflux dengan pelarut metanol (rendemen 3,87%) dan kulit yang disoklet dengan pelarut metanol (rendemen 3,37%).

Berdasarkan analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak metanol, kloroform, aseton dari daun, ranting, kulit, batang dan akar tumbuhan Pasak Bumi yang dibandingkan terhadap kedua senyawa standar (stigmasterol dan testosteron) dan analisis data ekstrak yang dihasilkan dengan variasi metode ekstraksi (maserasi, sokletasi dan reflux) dengan variasi pelarut (metanol, aseton, kloroform, kloroform-metanol (1:1)) dapat dijelaskan bahwa dari kedua senyawa target stigmasterol dan testosteron, hanya stigmasterol yang teridentifikasi pada bagian daun, ranting, kulit, batang dan akar sedangkan testosteron tidak teridentifikasi pada kelima bagian tumbuhan Pasak Bumi tersebut.

**Tahapan Kedua.** Mengisolasi stigmasterol dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi dan kandungan steroid tertinggi yaitu bagian akar. Pemisahan ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi dilakukan dengan metode kromatografi kolom untuk mendapatkan kristal stigmasterol, dari 1.095 gram total sampel tepung akar pasak bumi dihasilkan ekstrak metanol sebanyak 54,98 gram dengan persentase massa ekstrak rata-rata sebesar 4,93 % tepung akar pasak bumi. Stigmasterol sebanyak 590,1 mg dengan persentase stigmasterol total dalam ekstrak metanol sebesar 5,40 % dan rata-rata persentase stigmasterol dalam akar tumbuhan pasak bumi adalah 1,35 %.

Penentuan struktur kimia menggunakan spektrometer FTIR menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa steroid dengan gugus fungsi OH, C=C nonkonjugasi, C=O, dan C-H serta memiliki massa molekul m/z 396. Data interpretasi menunjukkan kemiripan dengan senyawa sterol.



GC-MS Ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi ditemukan 31 jenis senyawa. Persentase kandungan senyawa berkisar antara 0,93% sampai dengan 10,39% dan terdapat 5 jenis senyawa yang tidak diketahui namanya. Kandungan senyawa stigmasterol dalam ekstrak metanol yang di uji sebanyak 5,97%. Jenis steroid lainnya berupa sitosterol sebanyak 3,22%; senyawa spinasteron sebanyak 4,62% dan sebanyak 1,12% senyawa estratriennol sedangkan pengujian melalui GC-MS ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi memperlihatkan ekstrak kolom yang dihasilkan masih belum sepenuhnya senyawa stigmasterol. Sebanyak 15 jenis senyawa yang teridentifikasi. Persentase senyawa Stigmasterol hanya sebesar 32,82%. Senyawa lainya yang tergolong tinggi dari jenis steroid adalah Beta sitosterol 23,41% dan Kampesterol sebanyak 13,21%. Jenis steroid lainnya yang teridentifikasi adalah Spinastenon sebesar 2,1%; Sitostenon sebesar 1,27%; Stimastenon sebanyak 0,96% dan terdapat satu senyawa yang tidak teridentifikasi sebesar 0,9%.

Pengujian LC-MS/MS dari 22 jenis asam amino yang di analisis hanya teridentifikasi sebanyak 19 jenis asam amino pada ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi. Jumlah Arginin sebesar 2.360 mg/kg, Asam glutamat sebesar 1.230 mg/kg, Prolin sebesar 802 mg/kg, Asam aspartat 633 mg/kg dan lainnya sementara pada ekstrak kolom Stigmasterol hanya teridentifikasi 2 jenis asam amino yaitu Serin sebesar 0,42 mg/kg dan Fenil alanin sebesar 0,27 mg/kg.

**Tahapan Ketiga. Persentase Jantan.** Maskulinisasi ikan Nila menggunakan ekstrak metanol (EPB) dan ekstrak kolom stigmasterol (SPB) akar tumbuhan pasak bumi dengan analisis anova menunjukkan pengaruh pada persentase Jantan ( $P < 0,05$ ). EPB melalui pakan menghasilkan persentase jantan (80,36% - 82,10%) lebih tinggi dari EPB melalui perendaman (72,66% - 76,36%) sedangkan persentase jantan SPB melalui peredaman (65,82% - 67,14%) memperlihatkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan SPB melalui pakan (63,92% - 66,97%). Persentase jantan menggunakan  $17\alpha$ -Metil testosteron (MT) baik melalui perendaman (83,99%) dan melalui pakan (88,53%) masih lebih lebih tinggi dibandingkan pemberian EPB dan SPB.

**Persentase Interseks.** Analisis Anova menunjukkan pengaruh pada interseks Ikan Nila ( $p < 0,05$ ). Ikan nila yang yang tidak diberikan hormon (kontrol negatip) tidak terjadi fenomena interseks (0%) tetapi EPB melalui perendaman interseks yang terjadi (7,83% - 9,99%), EPB melalui pakan (6,71% - 6,96%), SPB melalui perendaman (7,13% - 10,36%) dan SPB melalui pakan (7,38% - 9,76%). Terlihat kecenderungan fenomena interseks lebih tinggi terjadi melalui perendaman dibandingkan melalui pakan.

**Kelangsungan hidup.** Analisis anova menunjukkan tidak ada pengaruh perlakuan ( $p > 0,05$ ), kecuali pemberian EPB melalui pakan berpengaruh terhadap kelangsungan hidup ( $p < 0,05$ ). Kelangsungan hidup ikan Nila dengan pemberian EPB melalui pakan (86,00% - 88,67%), EPB melalui perendaman (80,67% - 85,33%), SPB melalui pakan (80,67% - 82,67%) dan SPB melauai rendam (82,00% - 84,00%). Kecenderungan data memperlihatkan pemberian EPB baik melalui perendaman maupun lewat pakan menunjukkan kisaran nilai kelangsungan hidup ikan nila yang lebih tinggi.

**Persentase Laju Pertumbuhan Harian (SGP).** Analis anova memperlihatkan pemberian EPB berpengaruh pada persentase laju pertumbuhan harian (SGP) ( $p < 0,05$ ) sedang pemberian SPB tidak berpengaruh ( $p > 0,05$ ). SGP pemberian EPB melalui pakan (0,156% - 0,162%), pemberian EPB melalui perendaman (0,134% - 0,150%), pemberian SPB melalui pakan (0,127% - 0,129%) dan pemberian SPB melalui perendaman (0,125% - 0,127%). EPB memperlihatkan kecenderungan SGP lebih tinggi dibandingkan SPB dan EPB melalui pakan menunjukkan SGP yang lebih tinggi dibandingkan EPB melalui perendaman, SPB melalui pakan dan SPB melalui rendam. SGP melalui pakan cenderung lebih tinggi dibandingkan SGP melalui perendaman.

**Pertumbuhan Mutlak atau Pertambahan Berat (gram).** Analis anova memperlihatkan pemberian EPB berpengaruh pada pertambahan berat (gram) ( $p < 0,05$ ) sedang pemberian SPB tidak berpengaruh ( $p > 0,05$ ). Pertambahan berat pemberian EPB melalui pakan (9,35 gram - 9,65 gram), pemberian EPB melalui perendaman (8,07 gram - 9,02 gram), pemberian SPB melalui pakan (7,67 gram - 7,73 gram) dan pemberian



SPB melalui perendaman (7,49 gram – 7,60 gram). EPB memperlihatkan pertambahan berat lebih besar dibandingkan SPB dan EPB melalui pakan menunjukkan SGP yang lebih tinggi dibandingkan EPB melalui perendaman, SPB melalui pakan dan SPB melalui rendam. Secara umum pertambahan berat melalui pakan lebih tinggi dari pemberian melalui perendaman.

**Gambaran histologi.** Semua perlakuan menunjukkan adanya perkembangan pada diameter tubulus seminiferus gonad ikan Nila. Gambaran histologi perlakuan yang menerima hormon, perkembangan diameter terlihat lebih cepat (besar) dibandingkan dengan tanpa hormon atau perlakuan kontrol negatif.

**Profil hormon testosteron.** Semua ikan nila yang digunakan telah memiliki testosteron alamiah di dalam tubuhnya yang terlihat dari data ikan yang digunakan sebelum perendaman dan sebelum pemberian pakan memperlihatkan keberadaan hormon. Terdapat perbedaan pola antara perendaman dengan yang melalui pakan. Melalui perendaman hormon testosteron melonjak drastis (H-0) kemudian turun secara fluktuatif hingga (H-60) sedangkan melalui pakan, hormon testosteron dari (H-0) meningkat hingga (H-15) kemudian turun secara fluktuatif hingga (H-60).





## SUMMARY

Name of Student : Noor Syarifuddin Yusuf, NIM : 117080100111014 Doctoral Program of Fisheries and Marine Sciences, Postgraduate Program Faculty of Fisheries and Marine Sciences University of Brawijaya Malang, September 2019, "**Potential of Natural Steroid from Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) for Masculinization of Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**", Advisory Committee / Promoter : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS., Co-Promoter I : Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D., Co-Promoter II : Dr. Ir. Abdul Rahem Faqih, MS.

The dissertation report entitled "**Potential of Natural Steroids from Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) for Masculinization of Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**" aimed to analyze the content of bioactive steroid compounds from parts of pasak bumi to obtain solvents, extraction methods that produce the highest steroids. In addition, this study aimed to isolate stigmasterol from the parts of pasak bumi that have the most top steroid content. This study also analyzed the performance of steroid extracts and Stigmasterol column extracts of the pasak bumi on the tilapia masculinization. This research was conducted in three stages with the following details:

**The first stage**, analysis and characterization of the active compounds from Pasak Bumi plant. This process begins with the preparation of raw materials from parts of pasak bumi in the form of roots, stems, bark, leaves, and twigs, which have been in the form of fine powder or flour. Proximate assay to determine the percentage of protein, fat, water, carbohydrate, and ash content. Phytochemical assay of the pasak bumi parts qualitatively by analyzing the compounds of alkaloids, flavonoids, saponins, terpenoids, polyphenols, and steroids on the roots, stems, bark, leaves, and twigs. Analysis of bioactive steroid compounds from pasak bumi parts showed the effectiveness of the extraction method on pasak bumi parts was root refluxed with methanol solvent (yield 9.22%), twigs which were coupled with methanol solvent (yield 6.09%), stem that was refluxed with methanol solvent (4.30% yield), leaves refluxed with methanol (3.87% yield) and skins that were supplemented with methanol solvent (3.37% yield).

Based on Thin Layer Chromatography (TLC) analysis of methanol, chloroform, acetone extract from leaves, twigs, bark, stems and roots of the Pasak Bumi compared to the two standard compounds (stigmasterol and testosterone) resulted in the analysis of extract data with various extraction methods (maceration, socletation, and reflux). The results of different extraction methods with multiple solvents (methanol, acetone, chloroform, chloroform-methanol (1: 1)) showed that of the two stigmasterol and testosterone target compounds, only stigmasterol was identified in the leaves, twigs, bark, stems, and roots while testosterone not defined in the five parts of the plant Pasak Bumi.

**Second stage**. Isolation of stigmasterol from parts of Pasak Bumi which has the highest extract yield and most top steroid content, namely the root. Separation from the root of pasak bumi methanol extract was carried out by column chromatography method to obtain stigmasterol crystals. 1095 g of pasak bumi root powder produced 54.98 g of methanol extract with an average extract mass percentage of 4.93%. The amount of stigmasterol in methanol extract was 590.1 mg, with a percentage of 5.40%. The average percentage of stigmasterol in the roots of the post-earth plant was 1.35%.

Determination of the chemical structure using FTIR spectrometers showed that the isolate was a steroid compound with OH, C = C non-conjugated, C-O, and C-H functional groups and had a molecular mass of 396 m/z. Interpretation data showed similarities to sterol compounds.

GC-MS Pasak Bumi root methanol extract found 31 types of compounds. The percentage of compound content ranges from 0.93% to 10.39%, and there are five types of unknown compounds. The content of stigmasterol compounds in methanol extract was 5.97%. Other types of steroids in the form of sitosterol as much as 3.22%; spinasterone as much as 4.62% and estratriennol as much as 1.12%. GC-MS from the Stigmasterol column



extract of Pasak Bumi root showed that the extract of the column produced was not yet completely stigmasterol compound. A total of 15 types of compounds were identified. The percentage of Stigmasterol compounds is only 32.82%. Other compounds that were classified as high from this type of steroid are Beta sitosterol 23.41% and Kampesterol as much as 13.21%. Different types of steroids identified were Spinastenone at 2.1%; Sitostenon was 1.27%; Stimastenone was 0.96%, and there was one unidentified compound of 0.9%.

LC-MS/MS analysis of 22 types of amino acids analyzed only identified 19 types of amino acids in the Pasak Bumi root methanol extract. The study showed the amount of Arginine was 2,360 mg/kg; Glutamic Acid was 1,230 mg/kg, Proline was 802 mg/kg, Aspartic Acid was 633 mg/kg and others. The results of LC-MS/MS analysis on Stigmasterol column extracts identified only two types of amino acids, namely Serin at 0.42 mg/kg and Phenylalanine at 0.27 mg/kg.

**Third Stage.** Percentage of Male. Masculinization of tilapia used pasak bumi roots methanol extracts (EPB), and stigmasterol column extracts of pasak bumi root (SPB) with ANOVA analysis showed an effect on the percentage of males ( $P < 0.05$ ). EPB through feed produced a higher rate of males (80.36% - 82.10%) than EPB through immersion (72.66% - 76.36%). SPB produced a percentage of males through immersion (65.82% - 67.14%) showed results that are not much different from SPB through feed (63.92% - 66.97%). The percentage of males using  $17\alpha$ -Methyl testosterone (MT) through immersion (83.99%) and feed (88.53%) was still higher than that of EPB and SPB.

**Percentage of Intersex.** ANOVA analysis showed the effect on intersex Tilapia ( $p < 0.05$ ). Tilapia that were not given hormones (negative control) did not occur as an intersex phenomenon (0%) but administration of EPB through immersion occurred intersex (7.83% - 9.99%), EPB through feed (6.71% - 6.96%), SPB through immersion (7.13% - 10.36%) and SPB through feed (7.38% - 9.76%). The results showed a tendency for the intersex phenomenon to be higher through immersion than through feed.

**Survival rate.** ANOVA analysis showed no treatment effect ( $p > 0.05$ ), except that the administration of EPB through feed affected survival ( $p < 0.05$ ). Survival rate of Tilapia by giving EPB through feed (86.00% - 88.67%), EPB through immersion (80.67% - 85.33%), SPB through feed (80.67% - 82.67%) and SPB through immersion (82.00% - 84.00%). The trend of data showed that the administration of EPB either through immersion or feed showed a higher range of values for the survival of tilapia.

**Percentage of Daily Growth Rate (SGP).** ANOVA analysis showed that EPB administration affected the percentage of daily growth rate (SGP) ( $p < 0.05$ ), while giving SPB did not affect ( $p > 0.05$ ). SGP by giving EPB through feed (0.156% - 0.162%), giving EPB through immersion (0.134% - 0.150%), giving SPB through feed (0.127% - 0.129%) and giving SPB through immersion (0.125% - 0.127%). EPB showed a tendency for SGP to be higher than SPB. Giving EPB through feed showed a higher SGP compared to EPB through immersion. Giving SPB through feed showed a higher SGP compared to SPB through immersion.

**Absolute Growth or Weight gain (g).** ANOVA analysis showed that EPB administration affected weight gain (g) ( $p < 0.05$ ), whereas SPB administration did not affect ( $p > 0.05$ ). Weight gain due to EPB through feed (9.35 g - 9.65 g). Weight gain due to EPB administration through immersion (8.07 g - 9.02 g). Weight gain due to SPB administration through feed (7.67 g - 7.73 g). Weight gain due to SPB administration through immersion (7.49 g - 7.60 g). Giving EPB shows a higher weight gain than SPB. Weight gain due to EPB through the feed is higher than EPB through soaking, SPB was provided through feed and immersion. In general, weight gain due to administration of EPB and SPB through the feed was higher than through immersion.

**Histology Analysis.** All treatments showed development in the diameter of the seminiferous tubules of the Tilapia gonad. The histological figure in the treatment that received hormones showed that the development of gonad diameter was seen to be faster (larger) compared to without hormones or negative control treatments.



**The profile of Testosterone hormone.** All tilapia that were used already have natural testosterone in tilapia body which can be seen from the data of fish used before immersion and before feeding showed the presence of the hormone testosterone. The results showed there were differences in patterns between immersion and feed. The immersion treatment shows that testosterone increases (Day 0) then decreases fluctuatively until (Day 60), whereas through the feed, testosterone from (Day 0) rises to (Day 15) then decreases fluctuatively until (60th day).



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya hingga dapat menyelesaikan penulisan disertasi dengan judul **“Potensi Steroid Alami Tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Untuk Maskulinisasi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)”** pada Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan Program Pasca Sarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya

Disertasi ini mengkaji potensi tumbuhan Pasak Bumi yang berasal dari Kalimantan Tengah dalam menghasilkan bahan aktif steroid yang dipergunakan untuk kegiatan sex reversal atau pengalihan kelamin ikan Nila menjadi Jantan sebagai alternatif pengganti pemakaian hormon steroid sintetis. Penelitian dengan menggunakan bahan aktif alami dari tumbuhan masih sangat terbatas dan menyimpan potensi yang besar untuk pengembangan di masa depan.

Penulis berharap semoga hasil penelitian ini dapat menjadi alternatif dalam pengembangan dunia perikanan budidaya di masa mendatang khususnya untuk peningkatan produksi yang memanfaatkan seksual dimorfisme pada ikan. Penulis menyadari hasil penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan oleh karenanya kritik dan saran yang sifatnya membangun sangat diharapkan.

Malang, Desember 2019  
Penulis,

Noor Syarifuddin Yusuf  
NIM.117080100111014.



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI .....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI.....	v
RIWAYAT HIDUP .....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH .....	vii
GLOSARIUM .....	ix
RINGKASAN .....	xi
SUMMARY .....	xiv
KATA PENGANTAR .....	xvii
DAFTAR ISI.....	xviii
DAFTAR TABEL .....	xxi
DAFTAR GAMBAR .....	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxvi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian .....	6
1.4. Manfaat Penelitian .....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1. Deskripsi Pasak Bumi ( <i>Eurycoma Longifolia</i> Jack) .....	7
2.1.1. Bioekologi Pasak Bumi.....	7
2.1.2. Kandungan Kimia Pasak Bumi.....	10
2.1.3. Manfaat dan Kegunaan Pasak Bumi.....	11
2.2. Hormon Steroid dan Sterol .....	13
2.2.1. Testosteron .....	16
2.2.2. Stigmasterol .....	18
2.2.3. Ekstraksi Steroid .....	20
2.3. Diferensiasi Kelamin .....	22
2.4. Aromatase dan Aromatase Inhibitor .....	26
2.5. Sex Reversal (Pengaturan Jenis Kelamin).....	29
2.6. Mekanisme Maskulinisasi.....	31
2.7. Biologi Ikan Nila .....	32



<b>BAB III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....</b>	<b>34</b>
3.1. Kerangka Konsep .....	34
3.2. Hipotesis Penelitian .....	41
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>42</b>
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	42
4.2. Kerangka Operasional .....	42
4.3. Tahapan Penelitian .....	46
4.3.1. Penelitian Tahap I : Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Tumbuhan Pasak Bumi .....	46
4.3.2. Penelitian Tahap II : Isolasi Stigmasterol Dari Bagian Tumbuhan Pasak Bumi Yang Memiliki Rendemen Ekstrak Tertinggi.....	58
4.3.3. Penelitian Tahap III : Maskulinisasi Ikan Nila Menggunakan Rendemen Ekstrak Tertinggi dan Stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi.....	62
<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>74</b>
5.1. Penelitian Tahap Pertama .....	74
5.1.1. Pengujian Proximat Tumbuhan Pasak Bumi .....	74
5.1.2. Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Tumbuhan Pasak Bumi .....	76
5.1.3. Efektivitas Metode Pengekstraksi .....	78
5.1.4. Analisis Kualitatif Testosteron dan Stigmasterol dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	80
5.2. Hasil Penelitian Tahap 2 .....	84
5.2.1. Isolasi Ekstrak Kolom Stigmasterol dari akar tumbuhan Pasak Bumi.....	84
5.2.2. Spektroskopi (FTIR) Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi.....	86
5.2.3. GC-MS Ekstrak Metanol dan Stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi .....	89
5.2.4. LC-MS Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	92
5.2.5. LC-MS/MS Asam Amino Bebas Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	94

5.2.6. Karakterisasi dan Analisa Struktur Nano Menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM) Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	96
5.3. Hasil Penelitian Tahap 3 .....	98
5.3.1. Maskulinisasi Ikan Nila Melalui Perendaman dan Melalui Pakan .....	98
5.3.1.1. Nisbah Kelamin .....	98
5.3.1.2. Kelangsungan Hidup (%) Ikan Nila .....	106
5.3.1.3. Pertumbuhan Ikan Nila .....	110
5.3.2. Gambaran Histologi Gonad Ikan Nila .....	115
5.3.2.1. Pewarnaan Asetokarmin .....	115
5.3.2.2. Histologi Pewarnaan Gonad dengan Hematoksilin-eosin (HE) .....	117
5.3.3. Profil Hormon Testosteron Ikan Nila .....	123
5.3.4. Kualitas Air Pemeliharaan Ikan Nila .....	128
5.4. Pembahasan Umum .....	120
5.5. Kebaharuan Penelitian/Novelty .....	129
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>132</b>
6.1. Kesimpulan .....	132
6.2. Saran .....	133
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>134</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>152</b>



**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 2.1. Penelitian farmakologis manfaat dan Kegunaan tumbuhan pasak bumi .....	13
Tabel 4.1. Pengujian kualitatif senyawa bioaktif bagian tumbuhan pasak bumi .....	57
Tabel 4.2. Ekstraksi bagian tumbuhan Pasak Bumi dengan berbagai metode Maserasi, Soxhletasi dan Reflux .....	57
Tabel 4.3. Perbandingan efektivitas metode pengekstraksi pada bagian akar, batang, ranting, kulit dan daun tumbuhan Pasak Bumi .....	57
Tabel 4.4. Isolasi stigmasterol dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi .....	59
Tabel 5.1. Pengujian proximat tepung bagian tumbuhan Pasak Bumi	74
Tabel 5.2. Pengujian kualitatif senyawa bioaktif bagian tumbuhan Pasak Bumi .....	76
Tabel 5.3. Perbandingan efektivitas metode pengekstraksi pada bagian tumbuhan Pasak Bumi .....	78
Tabel 5.4. Isolasi stigmasterol dari akar tumbuhan Pasak Bumi .....	84
Tabel 5.5. Hasil GC-MS Ekstrak metanol Akar tumbuhan Pasak Bumi .....	89
Tabel 5.6. Hasil GC-MS Ekstrak Kolom stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	91
Tabel 5.7. Perhitungan standar stigmastrol .....	92
Tabel 5.8. Histologi gonad ikan Nila 60 hari setelah perlakuan perendaman dalam ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi .....	117
Tabel 5.9. Histologi gonad ikan Nila 60 hari setelah perlakuan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi melalui pakan .....	118
Tabel 5.10. Histologi gonad ikan Nila 60 hari setelah perlakuan perendaman dalam ekstrak kolom Stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi .....	119



Tabel 5.11. Histologi gonad ikan Nila 60 hari setelah perlakuan pemberian ekstrak kolom Stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi melalui pakan ..... 120

Tabel 5.12. Kualitas Air Selama Masa Pemeliharaan ..... 128





DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
Gambar 2.1.	Tanaman Pasak Bumi ( <i>Eurycoma longifolia</i> Jack) (sumber: <i>Angiosperm Phylogeny Group</i> , 2003) .....	8
Gambar 2.2.	Struktur Kimia Sterol: 1,2 siklopentanoperhidrofenantren .....	15
Gambar 2.3.	Rumus bangun steroid testosteron (Schunak 1990) .....	17
Gambar 2.4.	Biosintesis hormon steroid (Leusch, 2001) .....	18
Gambar 2.5.	Struktur Kimia Stigmasterol dengan rumus molekul: C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O dan berat molekul: 412.70. ....	19
Gambar 2.6.	Seksual lability jenis cichlid (Oldfield et al., 2005) .....	24
Gambar 2.7.	Sensitivitas tahapan diferensiasi kelamin terhadap hormon steroid Pada teleostei (Pifferrer, 2001) .....	25
Gambar 2.8.	Diagram pengaruh perlakuan hormon steroid terhadap pertumbuhan ikan teleostei (Piferrer, 2001) .....	26
Gambar 2.9.	Mekanisme pengaruh aromatase dan penghambatan aromatase oleh aromatase inhibitor terhadap efek tingkah laku (Hutchison, 1993) pada tingkat sel, aktivitas aromatase diatur oleh kontrol genomik dari sintesis enzim yang melibatkan testosteron (+) dan oleh kerja penghambatan secara langsung (-). ....	28
Gambar 2.10.	Ikan Nila ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	33
Gambar 3.1.	Kerangka konsep penelitian .....	40
Gambar 4.1.	Kerangka operasional penelitian .....	45
Gambar 4.2.	Proses pengeringan bagian daun (a), bagian batang (b) bagian akar (c) dan bagian kulit tumbuhan Pasak Bumi (d) ..	46
Gambar 5.1.	Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak aseton dengan pelarut EtoAC-kloroform (1 : 4) pada konsentrasi 10.000 ppm ..	81
Gambar 5.2.	Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak kloroform dengan pelarut EtoAC-kloroform (1 : 4) pada konsentrasi 10.000 ppm ..	81
Gambar 5.3.	Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak metanol dengan pelarut EtoAC-kloroform (1 : 4) pada konsentrasi 10.000 ppm ..	82



Gambar 5.4.	Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak metanol dengan pelarut metanol 100% dengan fase diam ODS pada konsentrasi 10.000 ppm .....	83
Gambar 5.5.	Perbandingan kromatogram .....	83
Gambar 5.6.	Spektrum inframerah dari ekstrak methanol (warna hijau) dan stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi (warna merah) .....	86
Gambar 5.7.	Hasil LC-MS/MS Kandungan Asam Amino Bebas Ekstrak Metanol Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	94
Gambar 5.8.	Hasil LC-MS/MS Kandungan Asam Amino Bebas Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	94
Gambar 5.9.	Karakterisasi dan analisa struktur nano dengan menggunakan scanning electron microscope (SEM) pada Pembesaran 500 X dari bahan larutan yang digunakan untuk maskulinisasi ikan nila .....	97
Gambar 5.10.	Persentase (%) Jantan rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Stigmasterol Pasak Bumi .....	98
Gambar 5.11.	Persentase (%) Intersex rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Stigmasterol Pasak Bumi .....	102
Gambar 5.12.	Persentase (%) Kelangsungan Hidup rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Stigmasterol Pasak Bumi .....	106
Gambar 5.13.	Persentase (%) Laju Pertumbuhan Spesifik rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Pasak Bumi .....	110
Gambar 5.14.	Pertambahan Berat (gram) atau Pertumbuhan Mutlak rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Stigmasterol Pasak Bumi .....	113
Gambar 5.15.	Jaringan gonad ikan nila umur 60 hari dengan pewarnaan asetokarmin; (a) gonad betina dengan sel telur, (b) gonad jantan dengan sel sperma, dan (c) gonad interseks (memiliki sel telur dan sel sperma) .....	115



Gambar 5.16. Testosteron dalam tubuh (pg/ml) rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol dan Ekstrak kolom Stigmasterol Pasak Bumi ..... 123

Gambar 5.17. Dinamika peningkatan dan penurunan Hormon Testosteron dalam tubuh (pg/ml) rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol dan Ekstrak kolom Stigmasterol Pasak Bumi ..... 126



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran		Halaman
Lampiran 1.	Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Tumbuhan Pasak Bumi .....	152
Lampiran 2.	Perbandingan Efektivitas Metode Pengekstraksi Pada Bagian Tumbuhan Pasak Bumi .....	156
Lampiran 3.	Isolasi Ekstrak Kolom Stigmasterol dari Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	157
Lampiran 4.	Spektroskopi (FTIR) Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	158
Lampiran 5.	Profiling GC-MS Ekstrak Metanol dan Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi .....	159
Lampiran 6.	LC-MS Ekstrak Metanol dan Stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi .....	161
Lampiran 7.	LC-MS/MS Asam Amino Bebas Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi ..	166
Lampiran 8.	Data dan uji statistik jumlah prosentase jenis kelamin ikan nila dengan perendaman ekstrak metanol tumbuhan Pasak Bumi .....	168
Lampiran 9.	Data dan uji statistik penambahan berat, SGP dan kelangsungan hidup ikan nila dengan perendaman Ekstrak metanol tumbuhan Pasak Bumi .....	170
Lampiran 10.	Data dan uji statistik jumlah dan prosentase jenis kelamin ikan nila melalui pakan dengan penambahan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi .....	172
Lampiran 11.	Data dan uji statistik penambahan berat, SGP dan kelangsungan hidup ikan nila melalui pakan dengan penambahan ekstrak metanol tumbuhan Pasak Bumi .....	174
Lampiran 12.	Data dan uji statistik jumlah dan prosentase jenis kelamin ikan nila dengan perendaman ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi .....	177
Lampiran 13.	Data dan uji statistik jumlah penambahan berat, SGP, kelangsungan hidup ikan nila melalui perendaman dengan penambahan ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi .....	179



Lampiran 14. Data dan uji statistik jumlah dan prosentase jenis kelamin ikan nila dengan pemberian ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan ..... 182

Lampiran 15. Data dan uji statistik jumlah dan prosentase jenis kelamin ikan nila melalui pakan dengan penambahan Ekstrak Kolom Stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi ..... 184



## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Fenomena perbedaan bentuk atau karakter antara individu jantan dan individu betina pada suatu spesies disebut dengan seksual dimorfisme. Pada ikan Nila atau udang Galah pertumbuhan individu jantan jauh lebih cepat jika dibanding individu betina. Menurut Kurniasih (2004) dibandingkan memelihara ikan dengan mencampurkan sekaligus ikan berkelamin jantan dengan ikan berkelamin betina, pemeliharaan ikan untuk satu jenis kelamin yang lebih cepat pertumbuhannya sangat menguntungkan karena menghasilkan biomassa yang lebih besar pada periode waktu yang sama.

Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di dunia sangat terkenal sebagai salah satu ikan yang ekonomis (Biswas *et al.*, 2005). Memiliki banyak keunggulan karena sangat mudah dibudidayakan, sifatnya yang toleran pada perubahan kondisi lingkungan, perkembangan dan pertumbuhan tubuhnya cepat, sangat mudah bereproduksi alami di alam dan masyarakat sangat menyukai dagingnya yang tebal (Shalaby *et al.*, 2007). Sifat ikan Nila yang mudah berkembang biak inilah yang menyebabkan terjadinya pemijahan tidak terkontrol dan memperlambat pertumbuhan ikan Nila (Dunham, 2004).

Budidaya ikan Nila jantan secara tunggal (monoseks) terbukti dapat memperbaiki produksi, memperbaiki pertumbuhan dan meningkatkan jumlah berat total organisme per satuan area (Phillay dan Kutty, 2005) dengan selisih hasil panen mencapai 30-50 % lebih tinggi jika dibandingkan budidaya ikan Nila dengan mencampurkan secara bersama antara ikan betina dengan ikan jantan dalam satu kolam yang sama (Mair *et al.*, 1995). Dalam budidaya ikan Nila monoseks jantan tidak terjadi reproduksi liar di kolam budidaya karena



berkurangnya tingkah laku keinginan seksual sehingga ikan dapat tumbuh dengan seragam sehingga dapat mencapai ukuran yang besar (Biswas *et al.*, 2005).

Ikan Nila monoseks jantan umumnya didapatkan melalui kegiatan pembalikan arah kelamin (sex reversal) menggunakan hormon androgen. Hormon yang digunakan untuk jantanisasi pada ikan adalah  $17\alpha$ -metiltestosteron atau  $17\alpha$ -MT (Zairin, 2003). Pemakaian  $17\alpha$ -MT sekarang ini telah dibatasi karena dikhawatirkan meninggalkan residu, baik di ikan maupun di perairan (Pandian dan Kirankumar, 2003).

Efek samping testosteron sintetik yang membahayakan adalah bersifat karsinogenik. Riani *et al.*, (2008), melaporkan bahwa penggunaan  $17\alpha$ -MT pada hewan uji menyebabkan timbulnya benjolan-benjolan yang abnormal, sebagai gejala awal karsinogenik. Kementerian Kelautan dan Perikanan berdasarkan Surat Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan dengan Nomor 52/KEPMEN-KP/2014 yaitu tentang klasifikasi obat ikan, memberikan larangan penggunaan jenis obat-obat tertentu pada aktivitas budidaya ikan. Jenis  $17\alpha$ -MT termasuk salah satu hormon yang dilarang. Tingginya kekhawatiran penggunaan hormon  $17\alpha$ -MT terhadap gangguan kesehatan pada manusia dan lingkungan hidup mendorong pencarian bahan alternatif yang lebih aman sebagai pengganti dari penggunaan hormon sintetik.

Pemberian hormon alamiah yang berasal dari steroid hewan telah terbukti berhasil seperti yang dilakukan oleh Muslim (2010) memperoleh hingga 83% ikan Nila Jantan dengan memberikan sebanyak 6% tepung dari testis sapi yang dicampur kedalam setiap kilogram pakan yang diberikan ketika stadia larva, sedangkan Iskandar (2010) memberikan sebanyak 5 ml/liter ekstrak tepung sapi melalui teknik perendaman memperoleh sebesar 85,6% ikan Nila jantan. Pemberian hormon bahan alamiah lain dari ekstrak hewan Teripang Pasir sebanyak 25 mg/l melalui perendaman selama 36 jam pada juvenil udang Galah



mampu meningkatkan jumlah jantan hingga sebesar 67% (Triajie, 2008) sedangkam penelitian yang dilakukan Emilda (2008) menghasilkan persentase ikan Gapi berkelamin jantan sebanyak 61,11% melalui pemberian 400 mg/kg pakan ekstrak steroid yang berasal dari jeroan Teripang yang diberikan secara oral dan hasil sebesar 65,13% ikan Gapy jantan dengan esktrak steroid jeroan Teripang 4 mg/l air melalui teknik perendaman.

Pada awalnya steroid sebagai hormon kelamin dianggap hanya ada pada hewan tetapi eksplorasi yang dilakukan pada tahun-tahun belakangan ini ternyata menemukan banyak pada tumbuh-tumbuhan yang dikenali dengan nama senyawa fitosteroid (Harborne, 2006; Cseke *et.al.*, 2006). Senyawa ini sering disebut dengan istilah “*estrogen like*” (Tremblay dan Van Der Kraak, 1998) karena memiliki kemiripan struktur molekul dengan isoflofonoid dan estrogen yang juga memiliki kemampuan berikatan pada reseptor estrogen. Senyawa  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol adalah bentuk fitosteroid yang umumnya terdapat di dalam tumbuhan.

Penelitian yang dilakukan oleh Tremblay dan Van der Kraak (1998) pada ikan jantan dan ikan betina jenis Rainbow Trout yang diberi perlakuan dengan  $\beta$ -sitosterol ternyata meningkatkan proses vitelogenesis ikan betina Rainbow Trout bahkan pada sel hati ikan jantan Rainbow Trout tersebut mampu menghasilkan vitelogenin. Senyawa  $\beta$ -sitosterol mempunyai efek estrogenik sehingga meningkatkan vitelogenesis sedangkan stigmasterol mampu menimbulkan efek androgenik. Parks *et al.*, (2001) melaporkan bahwa dalam limbah cair bubuk kertas yang mengandung fitosteroid senyawa stigmasterol menyebabkan terjadinya maskulinisasi pada ikan betina Mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*).

Maskulinisasi menggunakan fitoandrogen diteliti oleh Putra (2011), ekstrak tumbuhan Purwoceng (*Pimpinella alpina*) dengan konsentrasi 20 mg/l



melalui perendaman memperoleh 73,3% ikan Nila jantan. Maskulinisasi pada Ikan Cupang (*Betta splendens*) (Bulkini 2012; Cahyani 2014), Ikan Pelangi (*Iriatherina wernerii*) (Nurkhasanah 2015; Sofia 2017) dan ikan sinodontis (*Synodontis eupterus*) Rohmy (2018). Jantanisasi ikan Guppy (*Poecilia reticulata*) menggunakan ekstrak cabe jawa (*Piper retrofractum*) yang dilakukan oleh Yusrina (2015) dan ikan sinodontis (*Synodontis eupterus*) oleh wijaya (2017). Efek maskulinisasi pada ikan nila tilapia berbahan tumbuhan herbal melalui pakan telah dilaporkan seperti penggunaan tumbuhan lidah buaya atau *Aloe Vera* (Gabriel et al., 2017), tumbuhan kara benguk (*Mucuna pruriens*) (Mukherjee, Ghosal, & Chakraborty, 2015b) dan tumbuhan herbal thailand jenis *Butea superba* (Kiryakit, 2014).

Salah satu tumbuhan yang banyak terdapat di hutan-hutan Kalimantan tengah yang diduga memiliki efek androgenik adalah tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) yang secara tradisional dipergunakan oleh masyarakat setempat sebagai obat kuat (afrodisiak). Tumbuhan Pasak Bumi meningkatkan kadar testosteron dalam tubuh dan telah diujicobakan dan dibuktikan kepada manusia dan mencit. Aktivitas senyawa bioaktif atau metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas fisiologi dari tumbuhan pasak bumi ini mempunyai potensi besar untuk diaplikasikan pada kegiatan budidaya perikanan, terutama yang berkaitan dengan pembalikan arah kelamin pada ikan.

Aplikasi *sex reversal* yaitu membalikan arah perkembangan kelamin ikan yang semestinya betina diarahkan menjadi jantan atau sebaliknya yang berkelamin betina diarahkan menjadi berkelamin jantan dilakukan pada waktu gonad ikan belum mengalami atau menjelang proses diferensiasi gonad ikan menjadi ikan jantan atau betina setelah telur menetas. Menurut Govoroun et al., (2001) pada masa diferensiasi jaringan bakal gonad ikan teleostei sangat labil sehingga sangat mudah diintervensi oleh faktor lingkungan berupa hormon steroid



dari luar (*eksogenus*) atau bahan asing yang masuk dalam tubuh (*xenobiotik*).

Dalam hal ini puncak sensitivitasnya terjadi setelah fase pembelahan sel jaringan gonad. Fenomena ini terjadi pada saat fungsi kromosom kelamin belum aktif bekerja untuk menentukan jenis kelamin yang akan terbentuk (Carman *et al.*, 1998).

Secara normal mekanisme aksi kerja hormon steroid saat mempengaruhi proses diferensiasi kelamin diawali dengan masuknya hormon steroid dalam sel, berdifusi ketika melintasi membran plasma dan di dalam sitoplasma melakukan interaksi dengan reseptor spesifik dan selanjutnya pindah menuju inti yang terikat pada reseptor di kromatin. Bila kondisi ini terjadi terbentuklah rangkaian RNA spesifik sehingga efek-efek hormon steroid dapat diwujudkan melalui rangkaian proses fisiologis (Djojosoebagio, 1999). Hormon steroid yang diberikan menyebabkan zigot yang memiliki genotipe XX berkembang menjadi karakter jantan secara fenotipe, begitu pula sebaliknya zigot yang memiliki genotipe XY berkembang menjadi karakter betina secara fenotipe (Wirchins and Lee, 2002).

Menurut Tave (1992) karena ikan hidupnya di dalam air maka proses fertilisasi terjadi secara eksternal sehingga proses diferensiasi jaringan, organ maupun gonad berlangsung dalam air dan sangat mudah dipengaruhi lingkungan sekitarnya karena kondisinya sangat sangat labil. Meskipun jenis kelamin ikan secara genotif sudah terbentuk namun bersamaan proses perkembangan gonad karakter fenotifnya akan terbentuk dengan demikian pengarahannya kelamin ikan dapat dilakukan pada fase tersebut dengan intervensi hormon steroid dari luar.

## 1.2. Perumusan Masalah

Perumusan masalah penelitian ini sebagai berikut:

1. Bagaimana gambaran kandungan senyawa bioaktif steroid dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yaitu akar, batang, daun, kulit dan ranting atau cabang



pohon. Melalui pelarut dan metode ekstraksi seperti apa yang mampu menghasilkan steroid tertinggi.

2. Bagaimana mengisolasi bahan aktif stigmasterol dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki kandungan steroid tertinggi
3. Bagaimana performa dan kinerja dari ekstrak steroid dan stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi pada maskulinisasi ikan Nila.

### 1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Menganalisis kandungan senyawa bioaktif steroid dari bagian tumbuhan Pasak Bumi dan mendapatkan pelarut, metode ekstraksi yang menghasilkan steroid tertinggi.
2. Mengisolasi stigmasterol dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki kandungan steroid tertinggi
3. Menganalisis performa ekstrak steroid dan ekstrak kolom stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi pada maskulinisasi ikan Nila.

### 1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mengungkapkan potensi bioaktif steroid tumbuhan Pasak Bumi dalam maskulinisasi ikan sehingga dapat dipergunakan pelaku usaha Ikan Nila dalam mengembangkan sistem budidaya monoseks untuk pengganti hormon sintetik dan memberikan kontribusi akademis kepada berbagai pihak yang berminat terhadap aplikasi teknologi pembalikan jenis kelamin pada komoditas budidaya perikanan.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Deskripsi Tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack)

#### 2.1.1. Bioekologi Tumbuhan Pasak Bumi

Tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) hanya ditemukan di sebagian wilayah Asia Tenggara yaitu di kawasan semenanjung Malaya yaitu Myanmar, Thailand, Laos, Kamboja, Vietnam, Malaysia dan sebagian wilayah Indonesia dan Filipina (Siregar *et al.*, 2003; Minorsky, 2004). Pulau Kalimantan dan Pulau Sumatera adalah tempat penyebaran tumbuhan ini di Indonesia (Ang dan Lee, 2002; Bedir *et al.*, 2003). Suku-suku yang menempati wilayah Indonesia sudah sejak dahulu kala sudah memanfaatkan menggunakannya, terlihat begitu beragam nama yang diberikan pada tumbuhan Pasak Bumi.

Wilayah Sumatera, masyarakat Lampung menyebutnya Kayu Kebel, Bidara Putih sebutan di Palembang, sebutan di Sumatera Utara adalah Bidara Putih atau Bidara Laut, Pule, Bidara Laut, Lawang (Bangka), Bedara Puti (Belitung), Kayu Petimah (Aceh), Besan Peku Gancang, Begu Gajan (Batak). Daerah Sulawesi suku Bugis menyebutnya Bidara Mapai sedangkan suku Makasar menyebutnya Kayu Pai atau Bidara Pai. Wilayah pulau Jawa sebutan suku Jawa untuk tanaman ini adalah Widara Putih, orang Jakarta menyebutnya Babi Kurus. Pada wilayah Kalimantan suku Banjar menyebut Pasak Bumi, suku Dayak di Kalimantan Timur menyebut Dara Pahit atau Bidara Pahit sedangkan di Kalimantan Tengah disebut Tanyu Ulat, Sahalai, Tunglirit (Republika Online, 2012). Orang-orang di Malaysia menyebutnya Tongkat Ali, Lempung Pahit, Payung Ali, Tongkat Baginda, Muntah Bumi, Petala Bumi, Akar Jangat Seining, Tungke Ali, Pasak Bumi, Babi Kurus, Bidara Laut, Bidara Pait, Kebel. Sementara di Thailand di sebut Plaa-lai, Plaalai Pueak, dan Tung Saw (Hadad dan Taryono,



1998; Pandua *et al.*, 1999).

*Angiosperm Phylogeny Group* (2003), menempatkan taksonomi tumbuhan

Pasak Bumi adalah sebagai berikut:

Regnum: Magnoliopsida

Divisio: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclassis: Dilleniidae

Ordo: Sapindales

Famili: Simaroubaceae

Genus: *Eurycoma*

Jenis: *Eurycoma longifolia* Jack



Gambar 2.1. Tanaman Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) (Sumber : *Angiosperm Phylogeny Group*, 2003)



Tumbuhan Pasak Bumi termasuk tumbuhan semak. Tingginya mencapai 10 meter bahkan ketinggiannya ada yang mencapai 15 m lebih dengan diameter 15-20 cm. Tumbuhan Pasak Bumi umumnya tidak memiliki cabang-cabang pada bagian batang utamanya. Batangnya licin, terlihat kokoh dengan warna coklat abu-abu, bentuk ranting-ranting menyerupai payung dengan daun yang melingkar (rosette), daun lanset atau bundar telur dan ujung sedikit meruncing. Tipe daun majemuk menyirip berwarna coklat kehitaman berjumlah ganjil, memiliki panjang 0,3 m hingga 1 m, anak daun berwarna hijau tua berjumlah 20 sampai 30 pasang dengan ukuran 5-25 cm x 1,25-3 cm, berbentuk oblong, pinggirnya bergelombang dan berwarna coklat kehitaman pada bagian tangkai daun. Bunga tumbuhan Pasak Bumi lebarnya mencapai 0,6 cm berwarna merah jingga memiliki benjolan kelenjar di ujungnya dengan bulu-bulu halus disekitarnya. Buahnya berbentuk oblong dengan panjang 1,25 cm berwarna hijau ketika muda dan berubah menjadi kuning kemerah merahan ketika sudah masak (Indonesian Botanic Garden (1998). Tumbuhan Pasak Bumi menurut Paduan *et al.* (1999) berbunga dan menghasilkan buah sepanjang tahun, bunga-bunga bermekaran di awal bulan Juni hingga akhir Bulan Juli sementara pada bulan September buahnya mulai masak. Akarnya tunggang dan tumbuh tegak lurus menusuk ke dalam.

Menurut Wong dan Supadmo (1995) pada kondisi tanah masam, cenderung berpasir, teraerasi dan memiliki drainase tanah yang baik di ketinggian kurang dari 1.200 m dari permukaan laut tumbuhan Pasak Bumi biasa ditemukan.

Penyebaran dan habitat hidupnya umumnya dekat pantai pada hutan primer, hutan sekunder, hutan kerangas maupun sub montana. Setelah melewati masa-masa awal pertumbuhannya Pasak Bumi membutuhkan banyak sinar matahari untuk menunjang perkembangan vegetatif dan sistem reproduksi. Tumbuh dengan subur pada suhu lingkungan rata-rata 25°C dengan kelembaban udara



86% (Nuryamin, 2000).

Tanaman pasak bumi terdiri dari dua tipe tumbuhan yaitu *dioceous* dan *monoceous*. Jenis *dioceous* memiliki keunikan tersendiri yaitu memiliki pohon betina dan juga pohon jantan, yang jantan dapat berbuah namun tidak berkembang lebih jauh karena gugur pada waktu muda, walaupun dapat berkembang menjadi bunga putiknya steril sedangkan pohon betina bisa menghasilkan benih dan memiliki benang sari namun steril. Penyerbukan terjadi karena bantuan serangga dan terjadinya penyerbukan silang (Padua et al., 1999).

Pada tumbuhan Pasak Bumi bunga jantan dapat dengan mudah dibedakan dengan bunga betina melalui pengamatan ukuran benangsari. Benang sari yang besar ciri dari bunga betina sedangkan benang sari yang tipis dan kecil merupakan ciri khas bunga jantan.

Penyerbukan tertutup atau kleistogami yaitu suatu proses penyerbukan dan pembuahan yang terjadi ketika bunga masih belum terbuka pada beberapa kasus dapat terjadi, namun kepala putik yang lebih tinggi dibandingkan letak benang sari yang lebih rendah sulit terjadi penyerbukan. Karena itu penyerbukan hanya terjadi ketika ada vektor yang menggerakkan bunga sehingga putik dengan benang sari dapat bertemu (Hadiah, 2000).

### 2.1.2. Kandungan Kimia Pasak Bumi

Tumbuhan Pasak Bumi digunakan untuk keperluan obat-obatan karena sangat banyak memiliki kandungan senyawa kimia. Sebanyak 65 senyawa kimia telah teridentifikasi pada tumbuhan Pasak Bumi (Susilawati, 2010). Menurut

Ginting (2010), hasil kajian dan analisis para ahli yang berasal dari Jepang, Thailand, Malaysia dan Indonesia kandungan kimia yang terdapat pada bagian akar tumbuhan Pasak Bumi adalah (1) aervin, (2) kampesterol, (3) kantin-6-on,9-hidroksi, (4) kantin-6-on,9-hidroksi,n-oksida (5) kantin-6-on,9-metoksi, (6) kantin-



6-on, 9-metoksi, n-oksida (7) karbolina,  $\beta$ -1-asid propionik, (8) karbolina,  $\beta$ -7-metoksi, 1-asid propionik (9) eurikomalakton, (10) eurikomanol, (11) eurikomanol, 13- $\beta$ -18-dihidro, (12) eurikomanol, -2- $\beta$ -D-glokosida, (13) eurikomanon, (14) eurikomanona, 13-21-dihidro, (15) eurikomanona, 13-beta-21-dihidrosi, (16) klaineanon, 14-15-beta-dihidrosi, (17) klaineanon, 14-15 dihidrosi, (18) longilaston, (19)  $\beta$ -sitosterol, (20) stigmasterol.

Jiwajinda *et al.* (2001), melaporkan bahwa tumbuhan Pasak Bumi mengandung senyawa kimia kelompok triterpenoid jenis quassinoid, squalen dan tirucallane dengan berbagai bioaktivitas. Abdulelah dan Abidin (2007), telah menemukan empat senyawa quassinoid dari tumbuhan Pasak Bumi yaitu eurycomanone, 13, 12-hydroeurycomanone, 13d (21)-epoxyeurycomanone, eurycomalactone dan satu jenis senyawa alkaloid yaitu 9-methoxyccanthin-6-one. Guo *et al.*, (2005), telah menemukan senyawa tujuh senyawa quassinoid C20 yang diekstraksi dari bagian daunnya.

Hasil studi fitokimia yang lain menggambarkan keanekaragaman macam jenis senyawa yang dimiliki oleh bagian akar tumbuhan Pasak Bumi yang salah satunya dari golongan quassinoid (chan, *et al.*, 1989; Chan *et al.*, 1992; Ang *et al.*, 2000; Ang *et al.*, 2002; Bedir *et al.*, 2003; Chan dan Choo, 2002; Chan *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2004), canthin-6-one alkaloid,  $\beta$ -carboline alkaloid (Chan *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2004), *tirucallane type* triterpen (Kuo *et al.*, 2004), *squalene* derivatif (Morita *et al.*, 1993; Kuo *et al.*, 2004), *squalene-type* triterpenen (Ito *et al.*, 1993; Kuo *et al.*, 2004) dan biphenylneolignan (Kuo *et al.*, 2004).

### 2.1.3. Manfaat dan Kegunaan Tumbuhan Pasak Bumi

Masyarakat tradisional di Indonesia, Thailand, Malaysia dan Vietnam telah banyak memanfaatkan tumbuhan Pasak Bumi untuk berbagai keperluan terutama untuk kesehatan tubuh dan penyembuhan penyakit. Hampir semua bagian



tumbuhan ini dimanfaatkan dan digunakan untuk berbagai keperluan pengobatan.

Selain untuk penambah vitalitas dan obat kuat (afrodisiak) akar tumbuhan Pasak

Bumi berguna dalam menyembuhkan disentri-diare, penyembuh luka di gusi, anti malaria dan penurun panas saat demam. Bagian kulit dan batang bermanfaat sebagai bahan campuran tonik pada ibu yang habis melahirkan, mengobati sakit nyeri tulang dan gangguan cacing perut. Penyakit gatal-gatal pada tubuh diobati dengan menggunakan bagian daun tumbuhan Pasak Bumi sedangkan bunga dan buah digunakan untuk mengobati sakit perut, sakit kepala dan nyeri tulang (Hadad dan Taryono, 1998; Satayavivad *et al.*, 1998).

Pengalaman empiris di tengah masyarakat menunjukkan tumbuhan pasak bumi lebih dikenal sebagai afrodisiaka (Padua *et al.*, 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Ang *et al.* (2003) selama 12 minggu dengan dosis 500 mg/kg BB akar tumbuhan Pasak Bumi dalam fraksi kloroform, fraksi metanol, fraksi air memperlihatkan peningkatan kualitas seksual, menurunkan keraguan Tikus jantan *middle-aged* untuk melaksanakan aktivitas seksual serta membangkitkan dan meningkatkan gairah seksual (libido) pada Tikus Jantan melalui pemberian sediaan sebesar 800/kg BB (Ang *et al.*, 2002). Menurut Nainggolan dan Simanjuntak (2005) dalam darah Mencit jantan dari *Strain* DDY terjadi peningkatan konsentrasi hormon testosteron setelah diberikan ekstrak Pasak Bumi dengan dosis 28 mg/kg BB. Selanjutnya Rosida (2003) melaporkan pemberian ekstrak metanol dan ekstrak kloroform akar Pasak Bumi meningkatkan jumlah dan volume sel spermatogenik, sel sertoli maupun sel leydig pada mencit dewasa (*sexual mature*).

Hasil penelitian Panjaitan (2008), pemberian fraksi metanol akar tumbuhan Pasak Bumi sebesar 1.000 mg/kg BB memperlihatkan aktivitas hepatoprotektor terhadap karbon tetraklorida yaitu tidak terjadinya perubahan patologis di membran sel, inti sel membran maupun pada mitokondria dan reticulum

endoplasma yang menunjukkan fraksi metanol tersebut mampu melindungi sel-sel hati dengan baik berdasarkan pengamatan gambaran ultra struktur

Sejauh ini efek samping yang ditimbulkan oleh konsumsi Pasak Bumi adalah sulit tidur. Namun, dosis yang tepat hingga efek ini terjadi belum diketahui.

Konsumsi Pasak Bumi dalam jumlah besar dapat meningkatkan suhu tubuh dan gelisah ([Http://www.physicianformula.com](http://www.physicianformula.com), 7 Oktober 2014).

Beberapa penelitian farmakologis yang telah dilakukan untuk mengetahui manfaat Pasak Bumi disajikan pada Tabel 2.1 berikut:

Tabel 2.1. Penelitian farmakologis manfaat dan kegunaan tumbuhan Pasak Bumi

No.	Manfaat	Sumber
1.	Afrodisiak	Ang <i>et al.</i> , 1999; Padua <i>et al.</i> , 1999); Nainggolan dan Simanjuntak, 2005; Rosida 2003
2.	Disfungsi seks	Ang dan Lee, 2002; Ang dan Lee, 2003; Ang <i>et al.</i> , 2003
3.	Antihyperglycaemic	Husen <i>et al.</i> , 2004
4.	Anti malaria	Ang <i>et al.</i> , 1995; Satayavivas <i>et al.</i> , 1998; Chan <i>et al.</i> , 2004, Kuo <i>et al.</i> , 2004 dan Ridzuan <i>et al.</i> , 2005
5.	Anti kanker	Nurhanan <i>et al.</i> , 2005
6.	Anti HIV, anti leukemia	Sindelar <i>et al.</i> , 2005
7.	Anti proliferative	Ueda J <i>et al.</i> , 2002

## 2.2. Hormon Steroid dan Sterol

Turner dan Baghara (1976), menyatakan hormon adalah suatu zat kimia berupa kelenjar yang dihasilkan dan diproduksi oleh bagian tubuh tertentu dan berdifusi langsung ke dalam peredaran darah menuju organ target. Defenisi lain menurut Schunack *et al.* (1990), hormon adalah senyawa aktif biologis, yang



dihasilkan dalam suatu jaringan atau organ tertentu dari organisme hewan atau manusia kemudian diedarkan melalui aliran darah untuk mencapai target organ sasaran melalui mekanisme kerja spesifik dengan konsentrasi yang sangat kecil.

Steroid terdapat pada manusia, hewan dan tumbuhan. Kemunculan steroid yang paling umum dikenal adalah kolesterol lemak makanan, hormon seks, kortikosteroid yang disekresikan oleh kelenjar adrenal, obat-obatan seperti deksametason, predisolone. Hormon yang berasal dari steroid dikenal dengan sebutan hormon steroid seperti hormon seks, yang mengontrol pematangan seksual, karakteristik seksual sekunder, ovulasi, pemeliharaan keadaan hamil, hormon yang mengendalikan tingkat air dan ion tubuh, atau mineralokortikoid dan hormon mengendalikan ritme bio, dan tingkat energi tubuh atau glukokortikoid. Juga, dalam kategori steroid adalah steroid anabolik yang terkenal, yang berkontribusi dalam membangun massa otot.

Steroid merupakan senyawa yang memiliki kerangka dasar triterpena asiklik. Ciri umum steroid ialah sistem empat cincin yang tergabung. Cincin A, B, dan C beranggotakan enam atom karbon dan cincin D beranggotakan lima.

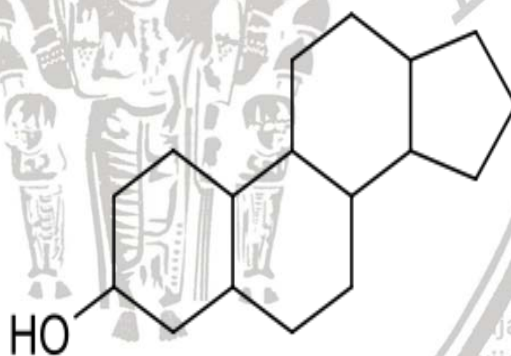
Steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasilkan dari reaksi penurunan dari terpena atau skualena. Steroid merupakan kelompok senyawa yang penting dengan struktur dasar sterana jenuh (bahasa Inggris: *saturated tetracyclic hydrocarbon: 1,2-cyclopentanoperhydrophenanthrene*) dengan 17 atom karbon dan 4 cincin. Senyawa yang termasuk turunan steroid, misalnya kolesterol, ergosterol, progesteron, dan estrogen. Pada umumnya steroid berfungsi sebagai hormon. Perbedaan jenis steroid yang satu dengan steroid yang lain terletak pada gugus fungsional yang diikat oleh ke-empat cincin ini dan tahap oksidasi tiap-tiap cincin (Montgomery, 1993).

Kolesterol merupakan senyawa penting (senyawa antara) dalam pembentukan hormon steroid, salah satunya adalah hormon kelamin jantan yaitu



testosteron dan androstedion. Pengenalan hormon steroid (hormon kelamin) estrogen dan androgen pada tahap awal dilakukan dengan melihat C17 dimana hanya mempunyai gugus hidroksil atau keto. Selanjutnya terlihat estradiol (estrogen) pada cincin A merupakan fenolik sedangkan androgen (testosteron dan progesteron) hanya mempunyai satu ikatan rangkap, dengan demikian akan terdeteksi dengan jelas perbedaan testosteron dan estrogen (Montgomery, 1993).

Selanjutnya Montgomery (1993) menjelaskan sterol adalah subkelompok steroid dan bentuk penting dari molekul bio. Mereka hadir dalam semua jenis bentuk kehidupan, dari tanaman, ke hewan sampai jamur. Sterol merupakan kelompok steroid yang mengandung gugus hidroksil pada C3 dan rantai alifatik tersusun paling sedikit 8 atom C terempel pada C17. Sterol utama pada bahan hewani adalah kolesterol, sedangkan sterol utama pada bahan nabati adalah fitosterol (terdapat 10 atom C pada C17).



Gambar 2.2. Struktur Kimia Sterol: 1,2-siklopentanoperhidrofenantren.

Lemak sterol merupakan kelompok penting di dalam steroid. Lemak sterol juga dikenal sebagai alkohol steroid, sebuah subkelompok steroid dengan gugus hidroksil pada posisi ketiga dari cincin-A. Lemak sterol bersifat amfipatik yang terbentuk dari acetyl-coenzyme A melalui jalur HMG-CoA reductase. Biosintesis sterol selalu dianggap sebagai proses eukariotik karena kekerapannya terjadi pada bakteri. Hanya diperlukan dua enzim, squalene monooxygenase dan



oxidosqualene cyclase untuk menghasilkan sterol dari skualena. Sekresi sterol dilakukan oleh astrosit dalam bentuk partikel lipoprotein berjenis kolesterol, desmosterol dan latosterol.

Lemak sterol nabati disebut fitosterol dan yang hewani disebut zoosterol.

Jenis zoosterol yang penting antara lain adalah kolesterol dan hormon steroid.

Sedangkan pada fitosterol dikenal kampesterol, sitosterol dan stigmasterol.

Ergosterol adalah lemak sterol yang ditemukan pada membran sel fungi yang berfungsi layaknya kolesterol pada hewan. Sterol dapat dijumpai sebagai sterol bebas, ester sterol (terasilasi), eter alkil steril (teralkilasi), sterol sulfat, dan steril glikosida yang kemudiannya dapat terasilasi menjadi glikosida sterol berasil.

Biosintesis sterol hampir selalu ditemukan pada makhluk eukariota dan hampir tidak ditemukan pada makhluk prokariota.

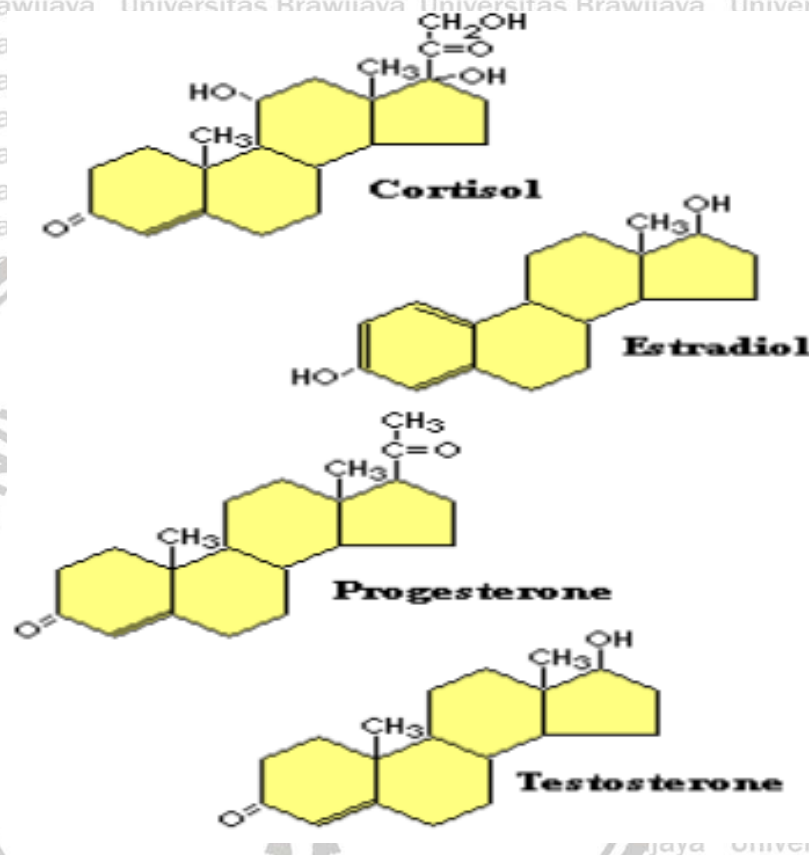
### 2.2.1. Testosteron

Testosteron adalah hormon steroid C-19 dari kelompok androgen.

Penghasil utama testosteron adalah testis pada jantan dan indung telur (ovari) pada betina, walaupun sejumlah kecil hormon ini juga dihasilkan oleh zona retikularis korteks kelenjar adrenal. Hormon ini merupakan hormon seks jantan (androgenic) dan merupakan steroid anabolik. Kerja androgenik adalah memelihara ciri-ciri kelamin pria sekunder yakni pembentukan organ kelamin pria, penegakan fungsi kelamin bantu, pematangan sperma dan pemeliharaan libido. Sedangkan kerja anabolik adalah massa otot pria yang besar, kekar, pematangan tulang dan pertumbuhan tinggi serta pengaruh psike (Schunack, 1990).

Baik pada jantan maupun betina, testoren memegang peranan penting bagi kesehatan. Fungsinya antara lain adalah meningkatkan libido, energi, fungsi imun, dan perlindungan ada terhadap osteoporosis. Secara rata-rata, jantan

dewasa menghasilkan testosteron sekitar dua puluh kali lebih banyak daripada betina dewasa. Hormon ini juga berperan dalam bertambahnya hormon adrenalin yang menyebabkan ketertarikan atau kekaguman terhadap lawan jenis. Testosteron merupakan hormon androgen terpenting, Rumus bangun testosteron dilihat pada Gambar 2.2.

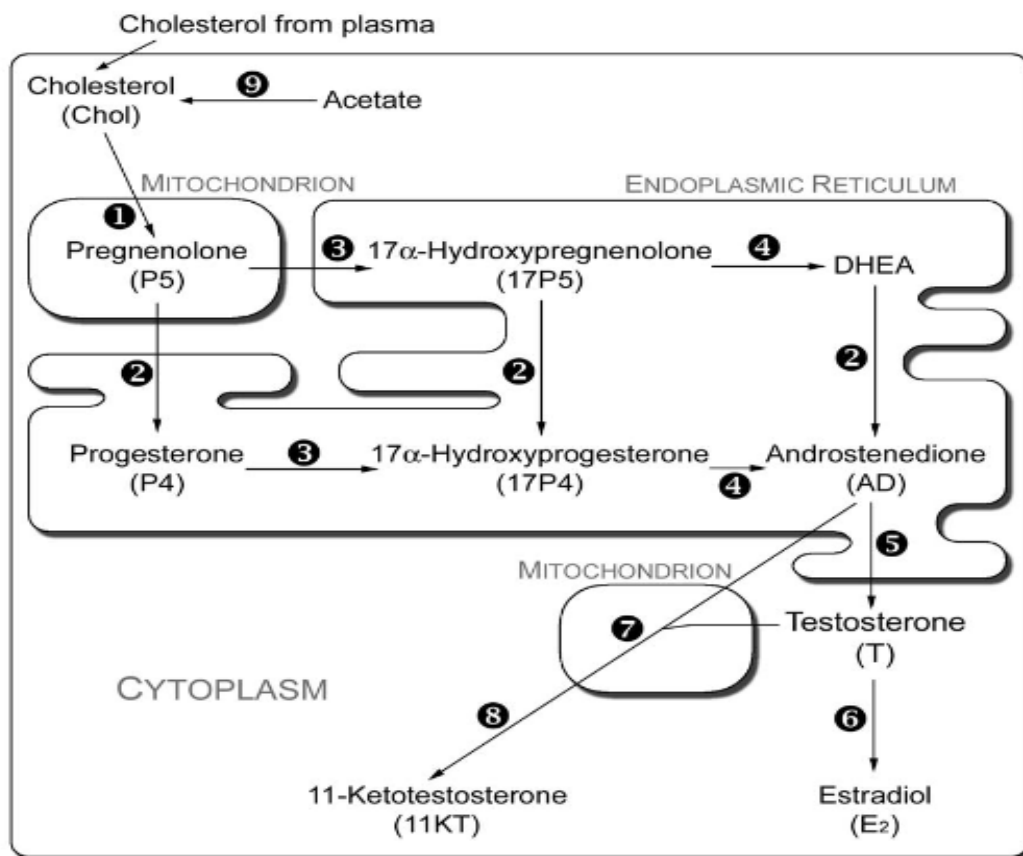


Gambar 2.3. Rumus bangun steroid testosteron (Schunack, 1990)

Hormon testosteron diproduksi oleh testis yang dikonversi dari kolesterol (Gambar 2.3). Testis, ovarium dan adrenal merupakan tempat perubahan kolesterol menjadi pregnenolon. Kemudian secara berurutan pregnenolon diubah menjadi progesteron, 17 $\alpha$ -hidroksi progesteron, androstenedion, dan akhirnya diubah menjadi testosteron (Murray, 2006). Kemudian testosteron diubah menjadi estradiol dengan bantuan enzim P450 aromatase.



Pada ikan mekanisme biosintesis steroid terjadi melalui jalur prenegnolon (P5) (Leusch, 2001). (1) cytochrome P450 side-chain cleavage - P450<sub>scc</sub>; (2)  $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase -  $\beta$ HSD; (3) P450<sub>c17</sub> (17 $\alpha$ -hydroxylase); (4) P450<sub>c17</sub> (C17,20-lyase); (5) 17 $\beta$ -HSD; (6) cytochrome P450 aromatase; (7) 11 $\beta$ -hydroxylase; (8) 11 $\beta$ -HSD; (9) HMG-CoA reductase (Leusch, 2001).



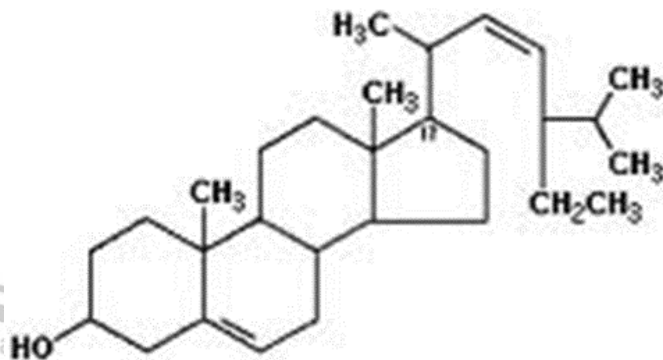
Gambar 2.4. Biosintesis hormon steroid (Leusch, 2001).

### 2.2.2. Stigmasterol

Stigmasterol merupakan sebuah senyawa yang termasuk ke dalam golongan steroid. Lebih spesifiknya, senyawa ini masuk ke dalam golongan fitosterol sebagai bagian dari sterol. Jadi bisa dikatakan bahwa stigmasterol merupakan senyawa turunan dari fitosterol. Stigmasterol adalah senyawa kimia yang banyak ditemukan dalam lemak tumbuhan. Selain pada tanaman, ditemukan

juga pada banyak hewan yang menyerapnya melalui makanan mereka, dan dalam produk-produk hewani seperti susu. Pada tanaman stigmasterol berperan dalam fungsi pengaturan yang mengontrol fluiditas dan permeabilitas membran. Tanaman jenis Kacang-kacangan dan biji-bijian seperti kacang buncis, kedelai, biji kakao, ada umumnya memiliki stigmasterol konsentrasi tinggi. Senyawa ini juga dapat ditemukan di banyak tanaman lain. Ini adalah bagian dari kelompok bahan kimia yang dikenal sebagai Fitosterol. Alkohol steroid ini biasanya tidak larut dalam air, dan secara kimiawi mirip dengan kolesterol, suatu senyawa yang ditemukan pada hewan.

Struktur kimia stigmasterol identik dengan struktur kimia kolesterol, namun berbeda pada rantai cabangnya. Stigmasterol mempunyai rantai cabang dengan ikatan rangkap antara C22 dan C23 pada atom C24 terikat radikal Eter Stigma sterol terdapat hampir pada semua tumbuhan. Biasanya stigmasterol, dijumpai berupa campuran dengan  $\beta$ -sitosterol dan kampresterol (Sumardjo,2009).



Gambar 2.5. Struktur Kimia Stigmasterol dengan rumus molekul:  $C_{29}H_{48}O$  dan berat molekul: 412.70.

Penelitian telah menunjukkan bahwa stigmasterol mungkin berguna dalam pencegahan kanker tertentu, termasuk ovarium, prostat, payudara, dan kanker usus besar. Studi juga menunjukkan bahwa diet tinggi phytoesterols dapat menghambat penyerapan kolesterol dan menurunkan kadar kolesterol serum



dengan bersaing untuk penyerapan usus. Studi dengan hewan laboratorium menggunakan stigmasterol menemukan bahwa kedua kolesterol dan penyerapan sitosterol menurun 23% dan 30%, masing-masing, selama periode 6-minggu. Ini menunjukkan bahwa menghambat mediator beberapa degradasi pro-inflamasi dan matriks biasanya terlibat dalam osteoarthritis diinduksi tulang rawan degradasi. Senyawa ini juga memiliki antioksidan yang kuat, hipoglikemik dan bersifat menghambat kelenjar tiroid (Gabay, 2009).

### 2.2.3. Ekstraksi Steroid

Ekstraksi adalah pemisahan suatu komponen dengan menggunakan pelarut (Austin 1986 dalam Heryani 2002) sedangkan menurut Ansel (1989), ekstraksi adalah proses penyarian senyawa aktif (penarikan sari) dari simplisia untuk memperoleh keseluruhan senyawa-senyawa yang terkandung pada simplisia bersangkutan (ekstraksi total) ataupun golongan senyawa tertentu saja. Ekstraksi dari sudut pandang kimia adalah memisahkan satu atau beberapa bahan padat atau nahan cair melawati bantuan pelarut dan pemisahannya terjadi atas dasar kemampuan larut yang berbeda dari komponen-komponen dalam campuran (Culson dan Richarson, 1999).

Selanjutnya Culson dan Richarson (1999), menyatakan bahwa faktor penting yang mempengaruhi proses ekstraksi ada empat yaitu ukuran partikel, pelarut yang digunakan, suhu dan pengadukan. Ukuran partikel berpengaruh terhadap luas permukaan yang menentukan kontak bahan dan pelarut, pelarut berpengaruh terhadap kelarutan komponen yang akan diekstrak, suhu dan pengadukan berpengaruh terhadap kelarutan komponen yang akan diekstrak.

Metode yang digunakan untuk proses ekstraksi Proses adalah metode maserasi, refluks, soxhlet dan perkolasi. Metode ekstraksi secara maserasi melalui perendaman simplisia dalam cairan penyari (*solvent*) yang sesuai disertai



pengadukan atau penggojogan sehingga senyawa aktif tersari sempurna (Ansel, 1989). Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan (Departemen Kesehatan RI, 1986).

Metode ekstraksi reflux adalah dengan mereflux simplisia bersama dengan pelarut pada tempat yang sama, menggunakan pemanasan dan kondensor balik sehingga pelarut akan masuk kembali dalam tempat proses ekstraksi berlangsung (Garcia-Ayuso *et al.*, 1998), dalam metode refluks bahan dilarutkan dengan pelarut, menggunakan suhu tinggi yang lebih tinggi dari suhu kamar. Metode ekstraksi soxhlet dengan menggunakan peralatan soxhlet, pelarut dan simplisia berada pada tempat terpisah, penyarian terjadi secara berulang akibat pergerakan pelarut melalui proses pemanasan dan kondensasi (Ruiz-Jimenez, 2004). Sedangkan metode ekstraksi perkolasi senyawa aktif dari simplisia menggunakan penambahan cairan penyari (pelarut) secara berkesinambungan (*continuous extraction process*) sehingga senyawa aktif tersari sempurna (Ansel, 1989).

Pelarut yang digunakan pada ekstraksi tergantung dari sifat komponen yang akan diisolasi. Salah satu sifat yang penting dalam pemilihan pelarut adalah sifat polaritas bahan. Polaritas bahan harus sama dengan polaritas pelarut agar bahan dapat larut pada pelarut yang digunakan. Ada tiga jenis pelarut yaitu pelarut polar (metanol, etanol dan air), pelarut semi polar (kloroform, dietil eter dan etil asetat) dan pelarut non polar (heksan, sikloheksan dan toluen) (Houghton dan Raman, 1998).

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang



sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang telah ditetapkan (Anonim, 1995).

Beberapa penelitian telah berhasil mengekstraksi senyawa steroid dari senyawa alam baik dari hewan maupun tumbuhan dengan metode yang berbeda. Riris (1994), menggunakan metode yang digunakan Touchstone dan Kasparov (1970), berhasil mengekstraksi steroid dari Kerang Hijau dengan pelarut aseton dengan cara maserasi. Ekstraksi steroid Lintah Laut *Discodoris* sp. (Ibrahim, 2001), dan ekstraksi steroid Lintah Laut *Eunice siciliensis* (Alwir, 2001), ekstraksi Teripang Pasir (*Holothuria scaba*) (Kustiariyah, 2006). Ekstraksi steroid dari tumbuhan dilakukan oleh Bahti *et al.* (1983), dengan mengekstraksi steroid dari daun Kamboja (*Plumiera acutifolia* Poir) menggunakan pelarut metanol melalui metode soxhlet dan juga telah berhasil diterapkan mengekstraksi steroid dari tumbuhan Tabat Barito (*Ficus deltoidea* Jack) dengan beberapa modifikasi (Heryani, 2002). Ekstraksi steroid dari akar tumbuhan Cendana (*Santalum album* Linn) secara maserasi menggunakan pelarut etanol (Saleh, 2008).

### 2.3. Diferensi Kelamin

Proses diferensiasi kelamin merupakan proses perkembangan gonad ikan menjadi suatu jaringan yang definitif. Fenotip atau perwujudan kelamin bergantung pada dua proses, yaitu faktor genetik dan oleh faktor lingkungan. Kedua proses tersebut secara bersamaan bertanggungjawab pada timbulnya morfologi, fungsional, maupun tingkah laku pada individu jantan atau individu betina. Secara genetik, jenis kelamin sudah ditentukan saat pembuahan, namun pada saat embrio, gonad atau organ kelamin primer masih berada dalam keadaan indifferen, yaitu keadaan dimana bakat-bakat untuk menjadi jantan atau betina dalam bentuk rudimeter dimana semua kelengkapan struktur-struktur jantan dan betina sudah ada, hanya menunggu perintah diferensiasi dan penekanan ke arah aspek-aspek



jantan atau betina (Fujaya, 2002).

Fujaya (2002), menyatakan mekanisme diferensiasi kelamin berawal dari adanya sintesa hormon yang terjadi bila ada perubahan lingkungan (tidak sesuai dengan kondisi normal atau adanya ketidakseimbangan antara kondisi dalam dan luar tubuh). Perubahan lingkungan yang terjadi akan diterima oleh indra, lalu disampaikan ke sistem syaraf pusat, setelah itu dikirim ke hipotalamus, kemudian memerintahkan kelenjar hipofisa untuk mengeluarkan atau melepaskan hormon gonadatropin. Hormon gonadotropin ini masuk ke dalam darah dan dibawa ke gonad sebagai suatu petunjuk untuk memulai pembentukan gonad.

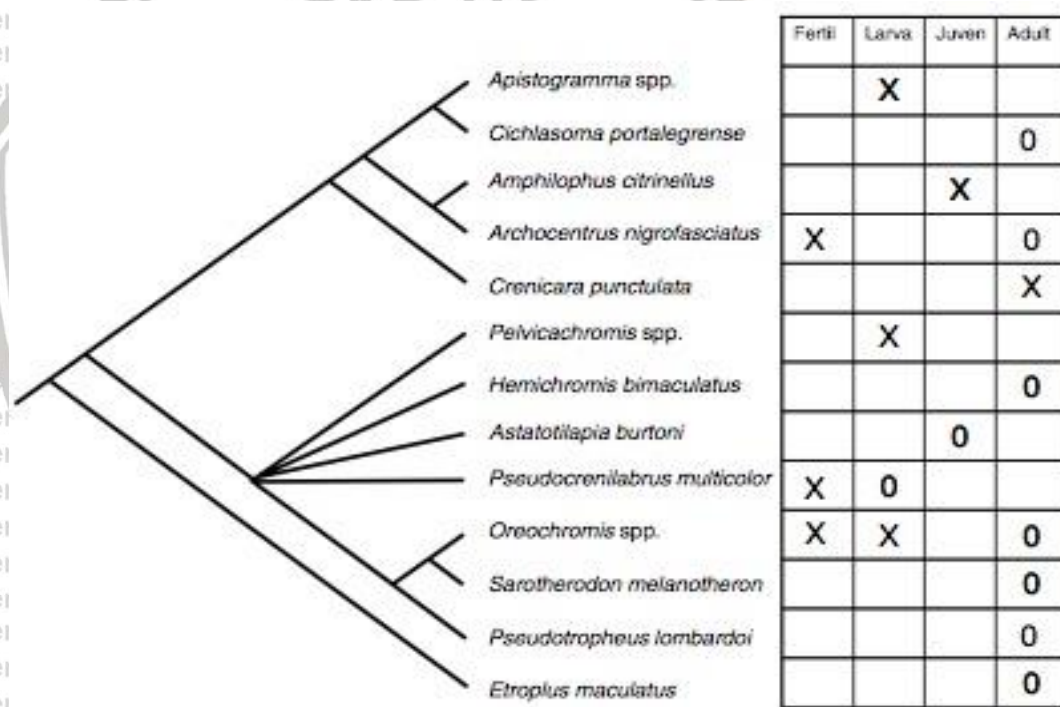
Pada ikan teleost diferensiasi kelamin umumnya terjadi pada awal setelah penetasan. Proses diferensiasi kelamin pada teleost berlangsung-angsur dan labil (Pandian, 1999). Proses diferensiasi kelamin adalah suatu proses perkembangan gonad ikan menjadi suatu jaringan yang definitif (sudah pasti). Menurut Zairin (2002), dalam kondisi normal tanpa ada gangguan, perkembangan gonad akan berlangsung secara normal dimana individu dengan genotof XX akan berkembang menjadi betina yang memiliki ovari, sedangkan individu dengan genotof XY akan berkembang menjadi jantan yang memiliki testis. Namun demikian, bila diintervensi dengan bahan-bahan tertentu seperti hormon perkembangan gonad dapat berlangsung berlawanan dengan seharusnya.

Menurut Baroiller *et al.* (2009), terbentuknya kelamin (*sex determination*) pada ikan dipengaruhi tiga faktor yaitu genetik mayor, genetik minor dan lingkungan. Selanjutnya Devlin dan Nagahama (2002), menegaskan diferensiasi seks pada ikan dikendalikan oleh aksi berbagai proses biokimia dalam tubuh termasuk berbagai protein berbeda seperti faktor transkripsi, enzim steroidogenesis, reseptor dan *messenger system*.

Masa diferensiasi seks ikan sangat bergantung kepada spesies ikan. Diferensiasi seks golongan *Ochrids* dan *Cyprinodontids* berlangsung antara 10 –



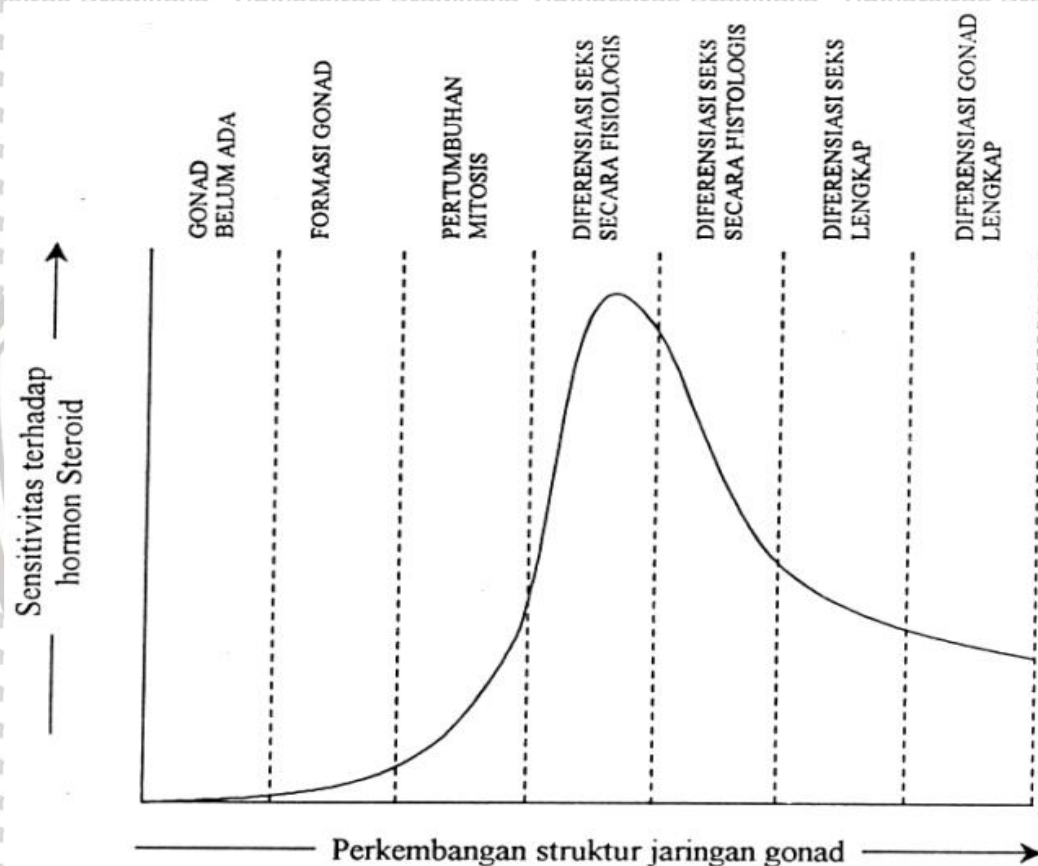
30 hari setelah penetasan, sedangkan pada golongan *Anabomids* berlangsung antara 3 – 40 hari (Pandian dan Sheela, 1995). Selanjutnya Nagy *et al.* (1981), menjelaskan bahwa diferensiasi pada ikan Mas (*Cyprinus carpio*, L.) terjadi pada 8 - 98 hari setelah penetasan. Pandian dan Sheela (1995), juga menerangkan bahwa pada beberapa spesies ikan diferensiasi seks dapat dimulai dari embrio, setelah penetasan (larva), juvenil, bahkan dewasa. Oldfield *et al.* (2005), menjelaskan kelompok ikan Cichlids memiliki variabilitas yang besar dalam waktu diferensiasi seksual, dan labilitas yang berbeda dari waktu ke waktu pada masing-masing spesies seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Seksual lability jenis cichlid (Oldfield *et al.*, 2005). Keterangan: X = ada diferensiasi seks, O = tidak ada

Menurut Piferrer (2001), sensitivitas hormon steroid eksogenus terhadap diferensiasi kelamin tergantung pada fase perkembangan gonad. Saat gonad belum terbentuk, sensitivitas belum kelihatan, begitu terbentuk gonad maka sensitivitas hormon mulai ada selanjutnya terus meningkat hingga mencapai

puncak pada fase diferensiasi kelamin secara fisiologis. Gambar 2.7 menunjukkan grafik sensitivitas gonad terhadap pemberian hormon steroid, dimana sensitivitas tertinggi terjadi saat sebelum diferensiasi kelamin secara fisiologis dan secara histologis. Berdasar hal tersebut, maka perlakuan hormon akan memberikan efek pengubahan kelamin tertinggi jika diberikan tepat sebelum tahap diferensiasi kelamin secara fisiologis.

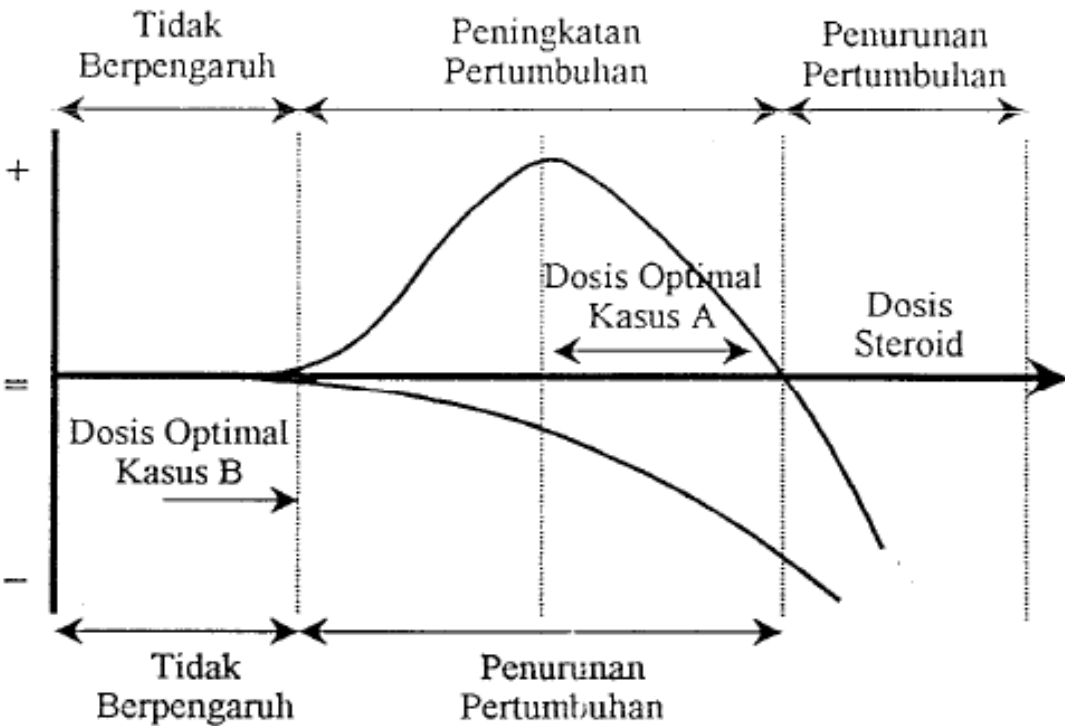


Gambar 2.7. Sensitivitas tahapan diferensiasi kelamin terhadap hormon steroid Pada teleostei (Pifferrer, 2001)

Selanjutnya Pifferrer (2001), menyatakan bahwa perlakuan hormon steroid selain berpengaruh terhadap diferensiasi seks juga dapat menimbulkan efek terhadap pertumbuhan. Pada kasus tertentu perlakuan hormon dapat meningkatkan pertumbuhan, sedangkan pada kasus lain justru dapat menurunkan pertumbuhan (Gambar 2.8).



Hunter dan Donaldson (1983), mengatakan bahwa waktu pemberian hormon yang terlalu lama akan memberikan hasil yang sama seperti pada penggunaan dosis yang tinggi, yaitu terganggunya proses pembentukan gonad dan gamet. Menurut Pandian dan Sheela (1995), munculnya ikan hermaphrodit umumnya disebabkan oleh penggunaan dosis hormon yang rendah (suboptimum).



Gambar 2.8. Diagram pengaruh perlakuan hormon steroid terhadap pertumbuhan ikan teleostei (Piferrer, 2001).

#### 2.4. Aromatase dan Aromatase Inhibitor

Proses deferensiasi kelamin pada ikan dipengaruhi oleh Aromatase P450 (P450arom, CYP19) adalah produk dari gen aromatase dan merupakan enzim yang terlibat dalam biosintesis estrogen yang mengkatalisis pembentukan estrogen dari androgen. Estrogen sangat penting untuk perkembangan gonad dan beragam proses fisiologis lainnya, mulai dari pertumbuhan sampai dengan perilaku reproduksi (Chang et al. 2005).

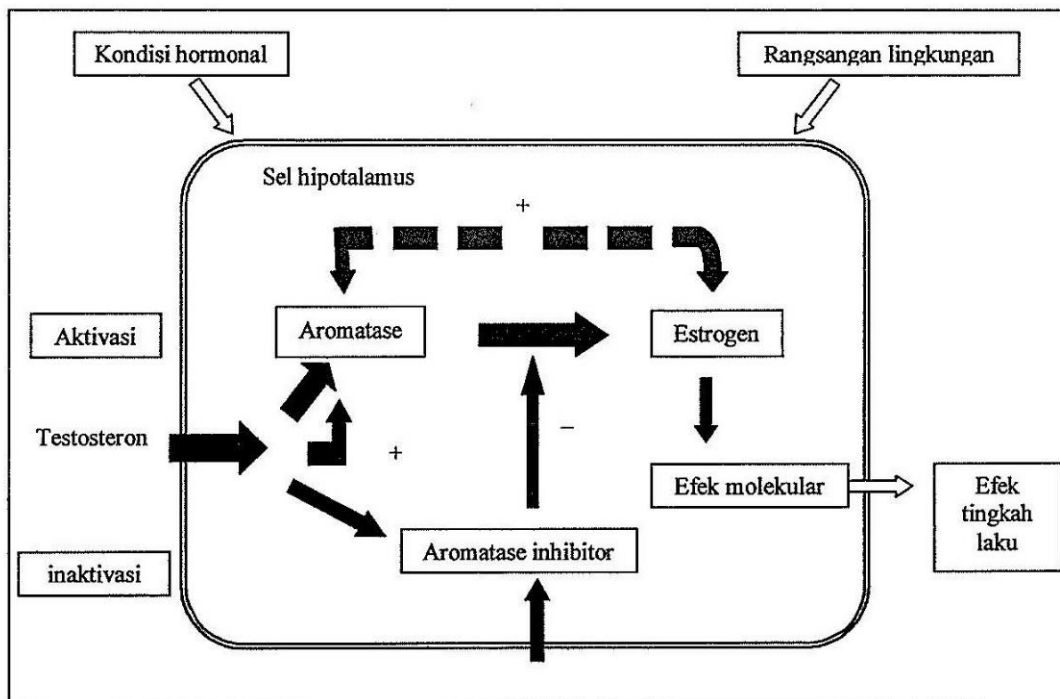
Pada ikan teleost ada dua isoform dari gen aromatase, Cyp19a/cyp19a1a/tipe ovarium dan Cyp19b/cyp19a1b/tipe otak, yang mengkodekan dua struktural protein yang berbeda yaitu P450aromA dan P450aromB (Piferrer dan Bla'zquez 2006). Tipe ovarium berperan dalam memulai, menjaga atau mempercepat diferensiasi ovarium (Kwon et al. 2001) sedangkan tipe otak sebagai pengendalian tingkah laku dan neuroestrogen di otak (Silverin et al. 2000). Aktivitas enzim aromatase berkorelasi dengan struktur gonad, yakni pada larva dengan ekspresi gen aromatase rendah mengarah pada terbentuknya testis, sedangkan ekspresi gen dengan aktivitas aromatase tinggi akan mengarah pada terbentuknya ovarium (Sever et al., 1999).

Aromatase memegang peranan penting dalam produksi ekstrogen sehingga menimbulkan efek feminisasi. Aktivitas aromatase yang tinggi pada embrio ikan Aligator yang diinkubasi pada suhu 30°C menghasilkan 100% betina. Peningkatan aktivitas aromatase dan sintesis estrogen selama perkembangan betina berkorelasi dengan waktu diferensiasi dari ovarium. Suhu baik secara langsung maupun tidak langsung (Smith et al., 1994).

Berbeda dengan hormon 17 $\alpha$ -MT yang memaskulinisasi ikan dengan menambahkan level estrogen dalam tubuh, aromatase inhibitor bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim aromatase. Penghambatan ini mengakibatkan terjadinya penurunan konsentrasi estrogen yang mengarah pada tidak aktifnya transkripsi dari gen aromatase sebagai feedbacknya. Secara umum aromatase inhibitor menghambat aromatase melalui dua cara yaitu dengan menghambat proses transkripsi dari gen-gen aromatase sehingga mRNA tidak terbentuk dan sebagai konsekuensinya enzim aromatase tidak ada atau melalui cara bersaing dengan substrat alami (testosteron) sehingga aromatase tidak berjalan (Sever et al., 1999). Penurunan rasio estrogen terhadap androgen mengakibatkan terjadinya perubahan penampakan hormonal dari betina



menyerupai jantan, dengan kata lain terjadi maskulinisasi karakter seksual sekunder (Davis et al., 1999).



Gambar 2.9. Mekanisme pengaruh aromatase dan penghambatan aromatase oleh aromatase inhibitor terhadap efek tingkah laku (Hutchison, 1993) pada tingkat sel, aktivitas aromatase diatur oleh kontrol genomik dari sintesis enzim yang melibatkan testosteron (+) dan oleh kerja penghambatan secara langsung (-).

Menurut Wozniak et al. (1992) terdapat dua jenis aromatase yaitu inhibitor aromatase inhibitor steroid dan aromatase inhibitor non steroid. Contoh dari aromatase inhibitor steroid adalah 1,4,6-androstatrien (ATD) dan 4-hydroxy-andstedione (4-OH-A) sedangkan aromatase inhibitor non steroid adalah 1,3-Diaza-2,4-cyclopentadience (Imidazole). Aromatase inhibitor non steroid lebih efektif dalam menghambat aktivitas aromatase dibandingkan aromatase inhibitor steroid.

## 2.5. Sex Reversal (Pengaturan Jenis Kelamin)

Sex reversal merupakan teknologi untuk membalikkan arah perkembangan kelamin menjadi berlawanan. Pada penerapan teknologi ini ikan yang seharusnya berkelamin jantan diarahkan perkembangan gonadnya menjadi betina dan sebaliknya. Hal ini bisa dilakukan karena gonad ikan pada waktu baru menetas belum berdeferensiasi secara jelas menjadi jantan atau betina (Zairin, 2002).

Perubahan kelamin adalah upaya yang dilakukan untuk mengubah status kelamin baik jantan menjadi betina ataupun sebaliknya. Menurut Yamazaki (1983), pendekatan hormonal biasanya dilakukan dengan cara pemberian hormon steroid (kelompok androgen dan estrogen) sebelum diferensiasi terjadi sedangkan pendekatan genetik dilakukan melalui persilangan antar spesies/genus tertentu, jenis kelamin ikan memiliki arti penting dalam perkembangbiakannya, karena antara jantan dan betina terdapat perbedaan laju pertumbuhan, pola tingkah laku dan ukuran maksimum individu.

Secara genetik, jenis kelamin suatu individu sudah ditetapkan pada saat pembuahan akan tetapi pada masa embrio, jaringan bakal gonad masih berada dalam masa indeferent. Pada suatu jaringan bakal jantan atau betina sebenarnya sudah ada dan tinggal menunggu proses diferensiasi dan penekanan ke arah aspek-aspek jantan dan betina (Matty, 1985). Menurut Carman *et al.* (1998), pada saat awal pertumbuhan zigot hingga larva, pembentukan jenis kelaminnya masih labil. Hal ini diduga karena fungsi kromosom kelamin dalam menentukan jenis kelamin masih belum aktif. Yamazaki (1983), menyatakan secara fisiologis jenis kelamin suatu individu dapat diubah dengan menggunakan hormon steroid.

Hormon tersebut pertama kali akan merangsang fenomena reproduksi yaitu merangsang diferensiasi gonad, gametogenesis, ovulasi, spermatogenesis, pemijahan dan tingkah laku kawinnya. Kemudian hormon akan merangsang ciri-ciri kelamin eksternal, perubahan morfologi dan fisiologi saat memijah dan produksi



feromon.

Jenis kelamin suatu individu ditentukan oleh faktor genetik dan lingkungan.

Kedua faktor tersebut akan bekerja secara sinergis untuk menentukan ekspresi fenotipe suatu karakter. Faktor genetik yang menentukan jenis kelamin yaitu kromosom seks atau gonosom yang mengandung faktor gen-gen jantan dan betina. Sedangkan yang tidak menentukan jenis kelamin disebut kromosom biasa atau autosom (Kirpichnikov, 1981; Yatim, 1986).

Menurut Yatim (1986), perubahan jenis kelamin dapat terjadi secara alami dan buatan. Sedangkan perubahan kelamin buatan merupakan usaha manusia untuk mengarahkan perkembangan organ reproduksi dengan pemberian bahan yang dapat merangsang perubahan tersebut. Selanjutnya menurut Chan dan Yeung (1983), perubahan kelamin buatan untuk menghasilkan individu dengan fenotipe kelamin yang tidak sama dengan kelamin genotipenya.

Perubahan jenis kelamin secara buatan dimungkinkan karena pada fase pertumbuhan gonad belum terjadi diferensiasi kelamin dan belum ada pembentukan steroid sehingga pembentukan gonad dapat diarahkan dengan menggunakan hormon steroid sintetis (Yamazaki 1983; Hunter dan Donaldson 1983). Selanjutnya Yamazaki (1983) menyatakan bahwa hormon steroid tersebut dapat mengatur beberapa fenomena reproduksi misalnya proses diferensiasi gonad, pembentukan gamet, ovulasi, spermiasi, pemijahan atau tingkah laku kawin, ciri-ciri seks sekunder, perubahan morfologis atau fisiologis musim pemijahan atau produksi feromon. Diantara fenomena tersebut diferensiasi gonad terjadi lebih dahulu kemudian diikuti oleh fenomena lain.

Zairin (2002) menjelaskan bahwa teknik sex reversal memiliki beberapa tujuan yaitu untuk meningkatkan pertumbuhan, mencegah pemijahan liar, mendapatkan penampilan yang baik serta untuk menunjang genetika ikan. Pada dasarnya ada dua metode sex reversal yaitu maskulinisasi, dimana ikan yang



seharusnya berjenis kelamin betina dibalikan arah menjadi kelamin jantan dan feminisasi dimana ikan yang seharusnya jenis kelamin jantan menjadi kelamin betina. Hormon untuk maskulinisasi adalah androgen sedangkan pada feminisasi menggunakan hormon estrogen.

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan sex reversal adalah ukuran ikan, lingkungan, spesies ikan, genetik, tipe hormon, dosis hormon, waktu pemberian hormon, lama pemberian hormon, dosis hormon, cara pemberian hormon (Nagy *et al.*, 1981; Hunter dan Donalson, 1983; Phelps dan Popma, 2000; Dunham, 2004).

## 2.6. Mekanisme Maskulinisasi

Teknik yang dapat diaplikasikan untuk meningkatkan persentase ikan jantan adalah manual sexing, sterilisasi, hibridisasi, gynogenesis, androgenesis, poliploidi, seks reversal yang dikombinasikan dengan breeding (Dunham, 2004), hibridisasi interspesifik dan produksi YY supermale (Biswas *et al.*, 2005).

Hormon yang digunakan untuk mengarahkan ikan berkelamin jantan adalah hormon androgen (Nakamura *et al.*, 1998; Dunham, 2004; Pandian, 1999).

Menurut Phelps dan Popma (2000), hormon androgen mempunyai dua aktivitas fisiologi yaitu *androgenic activity* dan *anabolic activity*. Berkembangnya karakteristik kelamin jantan terkait dengan *androgenic activity*. Hormon androgen yang umum digunakan adalah hormon sintetik 17 $\alpha$ -methyltestosteron (Macintosh dan Little, 1995; Phelps dan Popma, 2000).

Hormon androgen bekerja secara umpan balik dalam mengontrol pelepasan gonadotropin pituitari, dan berperan penting dalam diferensiasi serta pembentukan kelamin jantan beserta sifat kelamin sekundernya. Androgen masuk ke dalam sel sitoplasma, selanjutnya diikat oleh reseptor khusus. Reseptor ditemukan dalam sitosol yang keberadaannya dipengaruhi oleh androgen. Steroid reseptor kompleks (ligan) ini kemudian menuju nukleus dan berikatan dengan



akseptor pada genom. Hal tersebut memungkinkan transkripsi spesies baru mRNA yang memberi kode untuk sintesis protein tertentu di dalam sitoplasma. RNA bertambah secara nyata terutama di dalam fraksi mikrosom, hal ini akan menstimulasi terjadinya spermatogenesis. Menurut Donough (1999), hormon steroid akan mempengaruhi target sel seperti gonad dan saluran otak. Diduga pada saat fertilisasi sudah terbentuk sel kromosom, apabila diberi hormon testosteron dari luar, maka hormon ini akan merangsang hormon endogen mensintesis steroid untuk pertumbuhan dan perkembangan gonad secara fungsional. Demikian juga otak juga dipengaruhi oleh hormon eksogen ini, yang memberi perintah kepada poros aksis hipotalo-hipofisa-gonad.

Aplikasi maskulinisasi sudah banyak dilakukan pada jenis-jenis ikan hias sehubungan dengan penampilan jantan yang lebih baik seperti pada ikan Guppy (Emilda, 2008) sedangkan untuk peningkatan pertumbuhan pada udang Galah (Hadi et al, 2001; Arisandi, 2007; Triajie, 2008), ikan Nila (Macintosh dan Little, 1995; Phelps dan Popma, 2000; Kwon *et al.*, 2000; Zairin, 2002; Dunham, 2004; Manosroi *et al.*, 2004; Arsenia *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2008).

## 2.7. Biologi Ikan Nila

Klasifikasi ikan Nila termasuk Filum Chordata, Sub Filum Vertebrata, Kelas Osteichthyes, Sub Kelas Aconthotherigii, Ordo Percomorphii, Sub ordo Percoidea, Famili Cichlidae dan Genus *Oreochromis*. Ikan Nila adalah ikan endemic Afrika, tetapi sudah tersebar keseluruh dunia (Popma, 1999; Biswas *et al.*, 2005).

Ikan Nila bersifat omnivora, pemakan alga, tumbuhan air, invertebrata kecil, detritus dan beberapa organisme jasad renik lainnya, organisme dasar (benthos) seperti cacing, larva serangga air (Fitzsinmons, 1997). Dalam wadah budidaya ikan ini sangat reponsif terhadap pakan buatan (pelet) baik pellet tenggelam maupun terapung (Cholik *et al.*, 2005). Pertumbuhan ikan Nila jantan lebih cepat



daripada betina (Popma dan Masser, 1999; Phelps dan Popma, 2000; Monosroi *et al.*, 2004; Shalaby *et al.*, 2006).



Gambar 2.10. Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Reproduksi ikan Nila bersifat prolific (beranak pinak). Kedewasaan pertama tercapai pada umur 4-6 bulan dengan berat 100 – 200 gram. Ikan ini dapat memijah 6 – 7 kali/tahun (Cholik *et al.*, 2005). Ikan Nila termasuk kelompok *mouth brooders* (mengerami telur di dalam mulut), telur dibuahi pada substrat yang kemudian segera diambil oleh induk betina untuk inkubasi hingga beberapa hari setelah menetas di dalam mulut (*buccal cavity*) (Popma dan Masser, 1999).

Ikan Nila tergolong ikan *euryhaline*. Ikan ini dapat dibudidayakan di perairan tawar, payau dan laut. Namun demikian, pada perairan dengan kadar garam tinggi (> 29 ppt) ikan ini masih dapat tumbuh baik, namun tidak dapat berkembang biak.

Ikan ini tumbuh dengan baik pada lingkungan perairan bersuhu 27 – 33°C, kadar oksigen terlarut > 3 ppm, pH 7 – 8,3, Alkalinitas 90 – 190 ppm, kesadahan 62 - 79 mg CaCO<sub>3</sub> (Cholik *et al.*, 2005). Menurut SNI 6141-2009, kualitas air untuk

memproduksi benih nila : Suhu 25 – 30°C, kadar oksigen terlarut > 5 mg/l, pH 6,8 – 8,5. Suhu air sangat berpengaruh terhadap pengarahannya jenis kelamin ikan Nila (Smith *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1998; Phelps dan Popma, 2000).



### BAB III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

#### 3.1. Kerangka Konsep

Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) adalah salah satu ikan konsumsi utama di Indonesia yang memiliki sifat biologis yang menguntungkan, karena mampu mengkonsumsi berbagai jenis pakan alami, mampu tumbuh dengan baik di segala tipe perairan serta sangat toleran pada kualitas perairan dan lingkungan yang rendah. Namun usaha budidaya ikan Nila ini terganggu oleh keadaan matang gonad yang terlalu cepat, yang dapat menyebabkan terjadinya reproduksi yang tidak dikehendaki (pemijahan liar) yang berakibat pada lambatnya pertumbuhan. Untuk mengatasi pemijahan liar diupayakan pembudidayaan ikan Nila berkelamin tunggal (*monosex culture*) dalam hal ini adalah ikan jantan, karena jenis ikan Nila jantan memiliki kecepatan pertumbuhan hampir dua kali lebih cepat dari pada ikan Nila betina.

Desfrez et al. (2006) menyatakan bahwa populasi jantan monosex umumnya bertujuan untuk mengoptimalkan sistem produksi (jantan tumbuh lebih cepat daripada betina, mengurangi jumlah reproduksi, mengurangi jenis kelamin "*reduction of sexual/ territorial behaviour*", peningkatan rata-rata tingkat pertumbuhan), yang secara umum dihasilkan dalam skala besar melalui pengalihan jenis kelamin.

Cara yang banyak digunakan untuk menghasilkan budidaya monosex jantan adalah melalui teknik *sex reversal* secara buatan dengan menggunakan hormon 17 $\alpha$ -Metiltetosteron (17 $\alpha$ -MT). Namun akhir-akhir ini peredaran 17 $\alpha$ -MT mulai dibatasi oleh pemerintah karena diduga residu hormon tersebut menjadi salah satu bahan pencemar lingkungan (*endocrine residu agent*). Bahkan MT yang



merupakan salah satu hormon steroid sintetis diduga menyebabkan kanker atau bersifat kardinogenik pada manusia.

Pada saat ini umumnya konsumen ikan menghendaki agar ikan yang dikonsumsinya diperoleh dari hasil produksi yang terbebas dari bahan-bahan yang berbahaya. Untuk itu langkah alternatif dalam rangka mencari pengganti hormon sintetis dan bahan kimia sintetis lainnya dengan senyawa bahan alami perlu dikaji.

Senyawa bahan alami memiliki kelebihan mudah terurai dalam tubuh dan efek samping yang ditimbulkan sedikit. Selain bertujuan untuk menekan biaya operasional, pemanfaatan senyawa dari bahan alami diharapkan dapat dengan mudah diaplikasikan pada tingkat petani ikan agar lebih efektif dan efisien.

Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) merupakan salah satu tanaman herbal asal hutan yang masih belum banyak dikembangkan padahal tanaman ini memiliki banyak khasiat. Pengalaman empiris di tengah masyarakat menunjukkan tumbuhan pasak bumi lebih dikenal sebagai afrodisiaka (Padua *et al.*, 1999).

Beberapa hasil penelitian menunjukkan akar pasak bumi dapat meningkatkan kualitas seksual dan mengurangi keragu-raguan Tikus jantan *middle-aged* untuk melakukan aktivitas seksual (Ang *et al.*, 2003) dan membuat gairah seksual (libido) pada Tikus Jantan meningkat (Ang *et al.*, 2002). Menurut Nainggolan dan Simanjuntak (2005) dalam darah Mencit jantan dari *Strain* DDY terjadi peningkatan konsentrasi hormon testosteron setelah diberikan ekstrak Pasak Bumi dan pengamatan yang dilakukan Rosida (2003) pada Mencit dewasa yang sudah maturasi seksual terjadi peningkatan jumlah sel-sel spermatogenik, bertambahnya sel sertoli dan meningkatnya sel leydig.

Fitosteroid merupakan jenis senyawa steroid alami yang terdapat ditumbuhan atau dikenal sebagai steroid nabati (Cseke *et al.*, 2006) sering disebut dengan *estrogen like* karena memiliki kemiripan struktur dengan isoflaponoid dengan estrogen serta memiliki kemampuan untuk berikatan pada reseptor



estrogen. Senyawa bioaktif  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol adalah bentuk fitosteroid yang umumnya terdapat di dalam tumbuhan. (Tremblay dan Van Der Kraak, 1998).

Aktivitas senyawa bioaktif atau metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas fisiologi dari tumbuhan pasak bumi ini memiliki peluang yang sangat besar untuk diaplikasikan pada kegiatan budidaya perikanan, terutama dalam kaitannya dengan reproduksi dan diferensiasi seks pada ikan terutama yang bersifat androgenik. Untuk itu dilakukan pengamatan fitokimia pada bagian tumbuhan pasak bumi seperti pada akar, batang, kulit dan daun ranting yang memiliki kandungan steroid tertinggi.

Teknik ekstraksi dalam farmasi umumnya adalah ekstraksi dengan pelarut (maserasi, *Soxlet* dan *reflux*) yang selanjutnya didestilasi. Kondisi ekstraksi konvensional yang tidak tepat dapat menimbulkan kehilangan dan degradasi senyawa target steroid yang diinginkan. Oleh karena itu perlu dikaji faktor-faktor yang berpengaruh, seperti metode ekstraksi (*maserasi, soxlet dan reflux*) jenis pelarut dan bahan pelarut. (Goat *et al.*, 1997). Sudut pandang kimia mendefinisikan ekstraksi sebagai kegiatan memisahkan satu, dua, bahkan lebih lebih banyak dari suatu bahan padat atau bahan cair dengan dibantu oleh pelarut untuk memisahkannya. Pemisahan dapat terjadi karena adanya perbedaan kemampuan larut pada komponen-komponen yang terdapat dalam campuran tersebut.

Metode ekstraksi adalah cara memisahkan yang harus ditempuh atau dijalankan untuk mendapatkan senyawa steroid yang diinginkan. Efektivitas ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa hal, antara lain kondisi alamiah simplisia (jaringan lunak/keras, bahan segar atau dikeringkan), ukuran partikel simplisia yang digunakan, temperatur/suhu selama masa proses, tekanan udara yang



digunakan, jenis dan macam pemakaian pelarut yang terdiri dari polar, non polar dan semi polar, peralatan ekstraksi dan metode yang pergunakan.

Teknik pengalihan jenis kelamin yang seringkali diterapkan diantaranya teknik maskulinisasi untuk menghasilkan populasi ikan jantan (all male) dan feminisasi untuk menghasilkan populasi ikan betina (all female). Perubahan seks pada ikan tersebut dapat dimanipulasi dengan berbagai cara seperti melalui pemberian makanan (Adel et al. 2006), perendaman (Arsenia et al. 2005), penyuntikan (Mirza dan Shelton 1988) dan teknik implantasi (Andre 2006). Phelps dan Popma (2000) menyebutkan bahwa perlakuan alih kelamin yang dilakukan melalui metode pemberian makanan dan metode perendaman biasanya menggunakan hormon sintetik, seperti  $17\alpha$ -metilttestosteron,  $17\alpha$ etinilttestosteron,  $17$  estradiol  $\beta$  (E) dan dietilbesterol (DES), trembolone acetate (TBA). Lebih lanjut disebutkan bahwa maskulinisasi dapat dilakukan dengan menggunakan hormon  $17\alpha$ -metilttestosteron sedangkan feminisasi dilakukan dengan menggunakan hormon  $17$  estradiol  $\beta$  (Hopkins et al. 1979; Kim et al. 2000; Park et al. 2004)),  $17\alpha$ -etinilestradiol, dietilbesterol (Hopkins et al. 1979).

Memurut Zairin (2002) diferensiasi seks adalah proses perkembangan gonad ikan menjadi jaringan yang defintif. Proses ini terdiri dari serangkaian kejadian yang memungkinkan genotipe seks terekspresi menjadi fenotipe seks. Proses diferensiasi sangat dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Pada kondisi normal tanpa adanya gangguan, perkembangan gonad akan terjadi secara normal. Akan tetapi, apabila ada intervensi dari luar dengan bahan tertentu seperti hormon, maka perkembangan gonad dapat berlangsung berlawanan dari yang seharusnya. Pengarahan kelamin menjadi jantan atau betina fungsional dapat dilakukan pada saat gonad belum berkembang atau pada masa indiferen (Matty, 1985).



Pada saat embrio, gonad atau organ kelamin primer masih berada dalam keadaan indifferen, yaitu keadaan dimana bakat-bakat untuk menjadi jantan atau betina dalam bentuk rudimeter dan semua kelengkapan struktur-struktur jantan dan betina sudah ada, hanya menunggu perintah diferensiasi dan penekanan ke arah aspek jantan atau betina. Namun gonad ikan yang baru menetas belum terdiferensiasi menjadi jantan atau betina (Zairin, 2002). Apabila faktor jantan lebih dominan dari faktor betina maka zigot akan berkembang menjadi jantan, demikian sebaliknya). Menurut Pandian dan Sheela (1995) proses determinasi dan diferensiasi seks pada ikan sangat labil dan memungkinkan untuk dimanipulasi menggunakan hormon, kejutan suhu, dan faktor lingkungan lain.

Masa diferensiasi seks ikan sangat beragam tergantung pada spesiesnya. Pada ikan-ikan golongan Ochlids dan Cyprinodontids, fase diferensiasi seks berlangsung antara 10-30 hari setelah penetasan (Pandian dan Sheela 1995). Masa diferensiasi kelamin ikan nila merah berlangsung sampai dengan umur 30 hari setelah menetas (Kwon et al., 2000). Sedangkan masa diferensiasi kelamin pada ikan mas, *Cyprinus carpio*, L. terjadi antara hari ke- 9-98 setelah penetasan. Keragaman masa diferensiasi ini sangat bergantung pada kondisi periode labil masing-masing spesies ikan, karena efektifitas perlakuan hormon steroid, sangat ditentukan oleh kondisi labil dari masing-masing spesies ikan (Piferrer 2001). Selain itu menurut Pandian dan Sheela (1995) pada beberapa spesies ikan, masa diferensiasi seks dapat dimulai dari periode embrio, larva, juvenil dan bahkan ikan dewasa.

Proses pengalihan kelamin pada suatu individu dapat dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan dan dapat terjadi secara alami maupun buatan.

Perubahan kelamin yang disebabkan oleh faktor lingkungan yang tidak disertai adanya perubahan susunan genetik dikategorikan sebagai perubahan kelamin secara alami. Sedangkan perubahan kelamin dengan bantuan manusia untuk



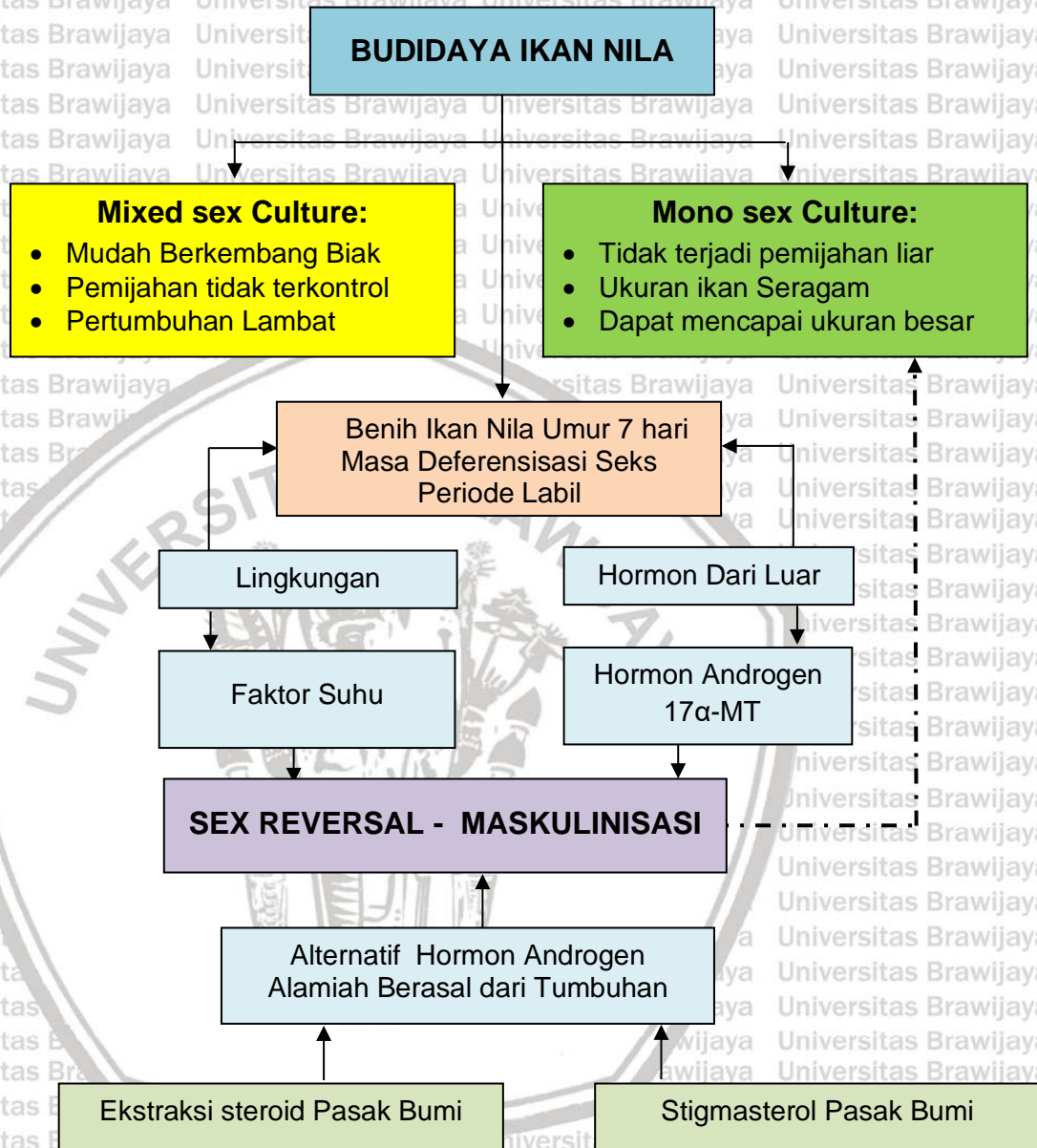
mengarahkan perkembangan organ reproduksi dengan menggunakan bahan-bahan yang dapat mendorong terjadinya perubahan tersebut disebut dengan perubahan kelamin buatan. Perubahan kelamin buatan ditujukan untuk menghasilkan individu dengan fenotipe kelamin yang berbeda dengan kelamin genotipenya (Chan dan Yeung 1983).

Proses deferensiasi kelamin pada ikan dipengaruhi oleh Aromatase P450 (P450arom, CYP19) adalah produk dari gen aromatase dan merupakan enzim yang terlibat dalam biosintesis estrogen yang mengkatalisis pembentukan estrogen dari androgen. Estrogen sangat penting untuk perkembangan gonad dan beragam proses fisiologis lainnya, mulai dari pertumbuhan sampai dengan perilaku reproduksi (Chang et al. 2005). Aktivitas enzim aromatase berkorelasi dengan struktur gonad, yakni pada larva dengan ekspresi gen aromatase rendah mengarah pada terbentuknya testis, sedangkan ekspresi gen dengan aktivitas aromatase tinggi akan mengarah pada terbentuknya ovarium (Sever et al., 1999).

Berbeda dengan hormon  $17\alpha$ -MT yang memaskulinisasi ikan dengan menambahkan level estrogen dalam tubuh, aromatase inhibitor bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim aromatase. Penghambatan ini mengakibatkan terjadinya penurunan konsentrasi estrogen yang mengarah pada tidak aktifnya transkripsi dari gen aromatase sebagai feedbacknya (Server et al., 1999).

Penurunan rasio estrogen terhadap androgen menyebabkan terjadinya perubahan penampakan dari betina menjadi menyerupai jantan, dengan kata lain terjadi maskulinisasi karakteristik seksual sekunder (Davis et al., 1999). Secara umum, aromatase inhibitor, selain menghambat proses transkripsi gen-gen aromatase sehingga mRNA tidak terbentuk dan enzim aromatase tidak ada, juga bersaing dengan substrat alami (testosteron) sehingga aktivitas aromatase tidak berjalan (Brodie, 1991).





Gambar 3.1. Kerangka konsep penelitian

### 3.2. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah:

1. Ekstrak bagian tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) mengandung senyawa aktif steroid yang dapat dimanfaatkan untuk maskulinisasi pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*).
2. Metode dan cara ekstraksi steroid tumbuhan Pasak Bumi berpengaruh terhadap jumlah sediaan steroid.
3. Cara pemberian hormon melalui perendaman dan melalui pakan dengan dosis yang berbeda dari ekstraksi steroid tumbuhan Pasak Bumi mempengaruhi tingginya persentase maskulinisasi, kelangsungan hidup, gambaran histologi jaringan gonad dan profil hormon testosteron pada ikan Nila.





## BAB IV. METODE PENELITIAN

### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Padjajaran Bandung, Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentral Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang, Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang, Laboratorium Farmakologi Biomedik Universitas Brawijaya Malang, Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Angler Biochemlab Surabaya, Laboratorium Jurusan Perikanan Universitas Palangka Raya. Laboratorium Domestikasi dan pemulian Ikan CV. Griya Aquatica - Fish Farming Jalan Krakatau no. 4 Kelurahan Palangka Kecamatan Jekan Raya Kota Palangka Raya Kalimantan Tengah. Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2012 sampai bulan Desember 2017.

### 4.2. Kerangka Operasional

Penelitian ini dilaksanakan dalam tiga tahapan yaitu:

- 1). Tahap I : Identifikasi dan karakterisasi senyawa aktif tumbuhan Pasak Bumi.  
Kegiatan ini meliputi :
  - a. Penyiapan bahan tumbuhan Pasak Bumi hingga berbentuk bahan serbuk halus atau tepung.
  - b. Pengujian fitokimia tumbuhan Pasak Bumi secara kualitatif dengan menganalisis golongan senyawa alkaloid, flavanoid, saponin, terpenoid dan steroid serta polifenol pada bagian akar, batang, kulit dan daun.
  - c. Ekstraksi pada masing-masing bagian tumbuhan Pasak Bumi sehingga diketahui pada bagian mana dari yang memiliki rendemen tertinggi dengan

metode ekstraksi menggunakan cara (a) *maserasi* (b) *soxhlet* dan (c) *reflux* dan pelarut yang terdiri dari metanol, aseton, kloroform dan klorometanol.

d. Analisis kualitatif testosteron dan stigmasterol bagian akar bagian akar, batang, ranting, kulit dan daun tumbuhan Pasak Bumi menggunakan Kromatografi lapis Tipis (KLT)

2). Tahap II : Mengisolasi stigmasterol dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi.

Kegiatan ini meliputi :

- a. Penyiapan serbuk halus atau tepung Pasak Bumi dari bagian tumbuhan yang memiliki kandungan steroid tertinggi.
- b. Ekstraksi serbuk halus tersebut dengan metode dan pelarut yang menghasilkan rendemen steroid tertinggi.
- c. Pemisahan ekstrak menggunakan metode kromatografi kolom untuk mendapatkan kristal stigmasterol.
- d. Analisis kuantitatif stigmasterol dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi.

3). Tahap III : Maskulinisasi ikan Nila menggunakan rendemen ekstrak tertinggi dan stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi.

Kegiatan ini meliputi :

- a. Penyiapan bahan ekstrak dan stigmasterol Pasak Bumi dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi
- b. Analisis proximat serbuk halus atau tepung Pasak Bumi dari bagian tumbuhan yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi.
- c. Pemeliharaan ikan uji yang terdiri dari kegiatan persiapan wadah, penentuan konsentrasi hormon dan lama waktu perendaman, proses

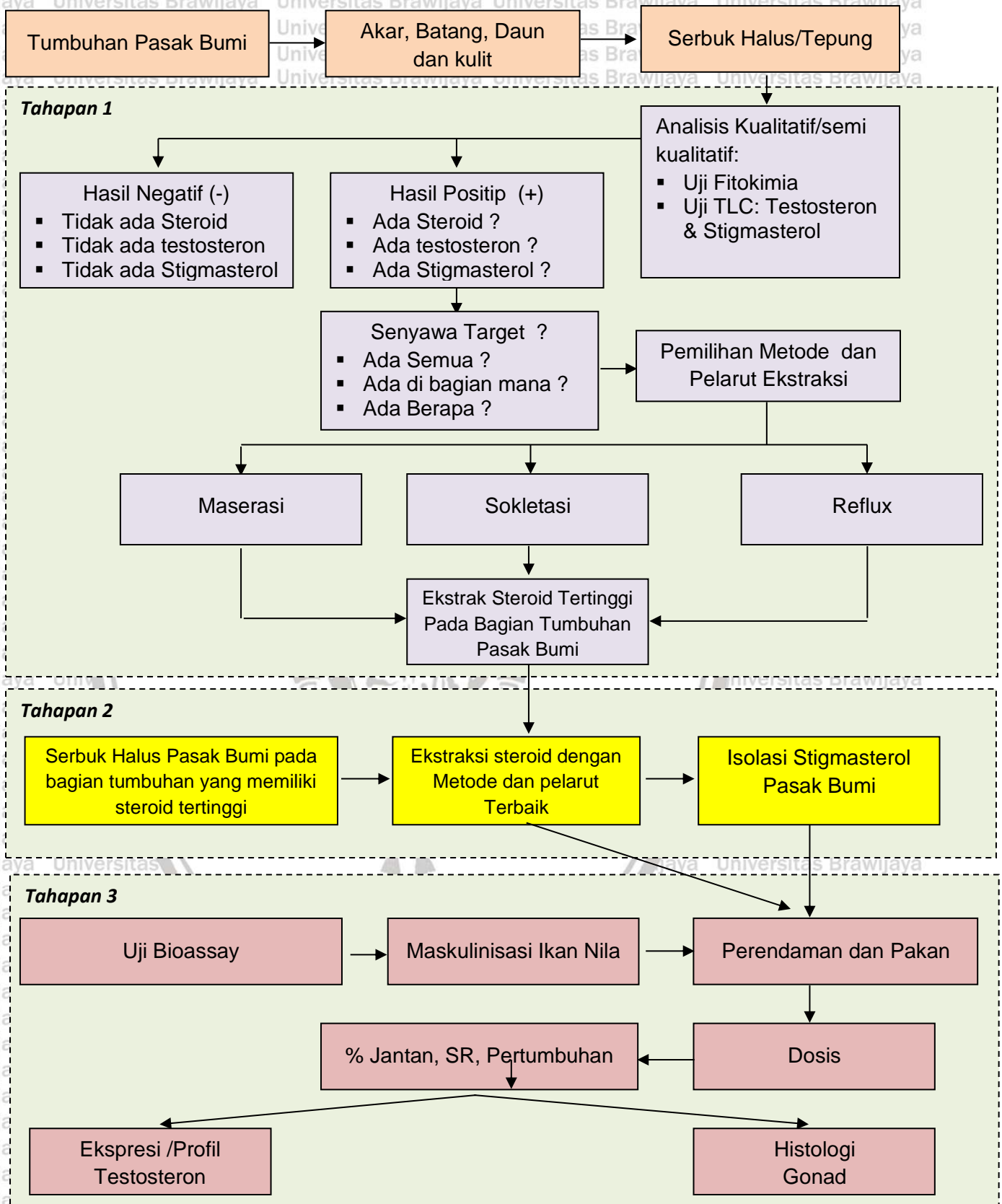


perendaman, penebaran larva, pemberian pakan, pengukuran kualitas air, pemeriksaan gonad ikan uji,

d. pengamatan parameter yang telah ditetapkan seperti perhitungan persentase ikan jantan, persentase ikan betina, persentase ikan interseks, kelangsungan hidup ikan, pertumbuhan ikan uji.

e. Pengamatan pada profil hormon testosteron pada ikan uji.





Gambar 4.1. Kerangka operasional penelitian



### 4.3. Tahapan Penelitian

#### 4.3.1. Penelitian Tahap I: Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif

##### Tumbuhan Pasak Bumi

##### 1). Penyiapan Bahan Baku Tumbuhan Pasak Bumi



Bagian Daun (a)



Bagian batang (b)



Bagian Akar (c)



Bagian Kulit (d)



Bagian Ranting (e)

Gambar 4.2. Proses pengeringan bagian daun (a), bagian batang (b) bagian akar (c), bagian kulit dan Bagian Ranting (d) tumbuhan Pasak Bumi



Bahan baku yang digunakan adalah tumbuhan Pasak Bumi, yang diperoleh dari Kecamatan Rakumpit Kota Palangka Raya wilayah Kalimantan Tengah.

Tanaman Pasak Bumi ini kemudian dibersihkan dari sisa-sisa tanah dengan mencucinya mempergunakan air, kemudian dipisahkan dengan memotong bagian akar, batang, ranting, kulit dan daun. Bagian batang tumbuhan dan akar dipotong kecil-kecil, bagian kulit di serut dari bagian batang tanaman dan bagian daun dilepaskan satu persatu dari tangkai utamanya dan dipisahkan dengan ranting-rantingnya.

Selanjutnya masing-masing bagian ini diletakkan di atas nampan yang beri penutup kain hitam atau plastik hitam untuk menghindari panas matahari langsung dalam proses pengeringannya. Setelah seluruh bagian tumbuhan Pasak Bumi kering dilakukan penepungan dengan menggunakan mesin penggiling dan hasil penepungan di timbang dan dimasukkan pada plastik klip yang telah disediakan.

## **2). Analisis Proximat Tepung Pasak Bumi (TPB)**

Kandungan nutrisi TPB diproximat untuk mengetahui kadar air, kadar lemak, kadar protein dan kadar abu. Prosedur kerja yang dilakukan untuk melakukan uji proximat kandungan nutrisi TPB prosedur kerja AOCAC (1995).

### **a). Kadar Air**

Sampel sebanyak 2 sampai 5 gram ditimbang secara teliti di dalam wadah aluminium kering yang telah diketahui bobotnya, lalu dimasukkan kedalam oven untuk dikeringkan pada suhu 100°C selama 3 sampai 5 jam. Setelah kering cawan beserta isinya didinginkan dalam desikator hingga mencapai suhu kamar, selanjutnya ditimbang. Pengeringan contoh dilakukan sampai tercapai timbangan berat yang konstan.



$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{B1 - B2}{B1} \times 100\%$$

Keterangan :

B1 = Berat (bobot) dari contoh awal (gram)

B2 = Berat (bobot) dari contoh akhir (gram)

### b). Kadar Lemak

Contoh bebas air sebanyak 2 gram diekstraksi dengan pelarut eter dalam sokhlet selama 6 jam. Contoh hasil ekstraksi diupkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian dimasukkan kedalam oven untuk pengeringan pada suhu 100 °C selama 30 menit dan didinginkan dalam desikator sampai bobotnya konstan.

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$$

Keterangan :

B1 = Berat (bobot) dari contoh awal (gram)

B2 = Berat (bobot) dari lemak (gram)

### c). Kadar Protein

Bahan contoh yang telah dihaluskan sebanyak 0,1 gram dimasukkan dalam labu kjedahl 30 ml, ditambahkan 2,5 ml asam sulfat pekat, 1 gram katalis dan batu didih. Selanjutnya dididihkan selama 1 sampai 1,5 jam hingga cairan berubah jernih. Labu didinginkan, kemudian isi yang ada dipindah kedalam alat destilasi yang telah dipersiapkan. Selanjutnya dengan perlahan masukkan 15 ml larutan NaOH 50%, setelah itu dilakukan pembilasan menggunakan air suling. Erlenmeyer berisi 25 ml asam klorida 0,02 N diber 2 sampai 3 tetes indikator nitrogen diatur letaknya pada bagian bawah kondensor. Ujung tabung kondensor terendam dalam larutan klorida, kemudian destilasi dilakukan sampai 25 ml

destilat dalam erlenmeyer. Destilat dititrasi menggunakan NaOH 0,02 N dengan mengamati perubahan warna yang terjadi dari warna hijau hingga berubah menjadi warna ungu. Prosedur yang sama dilakukan untuk penetapan blanko.

$$\text{Protein Kasar (\%)} = \frac{(Y - Z) \times N \times 1,4 \times 6,25}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

Y = ml NaOH titer untuk blanko

B = ml NaOH titer untuk contoh

N = Normalitas NaOH W = berat (bobot) dari contoh (gram)

#### d). Kadar Abu

Contoh bahan sebanyak 2 gram ditempatkan dalam cawan porselen dan di masukkan dalam tanur bersuhu 600°C, proses pengabuan dilaksanakan selama 2 jam, setelah itu contoh bahan dimasukkan kedalam desikator untuk didinginkan dan selanjutnya dilakukan penimbangan.

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$$

Keterangan :

B1 = Berat (bobot) dari contoh awal (gram)

B2 = Berat (bobot) Akhir (gram)

### 3). Pengujian Fitokimia Tumbuhan Pasak Bumi

Uji kandungan fitokimia dilakukan dengan menganalisis golongan senyawa alkaloid, flavanoid, saponin, terpenoid dan steroid serta polifenol. Prosedur analisis masing-masing golongan senyawa tersebut dilakukan dengan cara sebagai berikut:



**a). Prosedur Uji Fenolik**

- Sampel sebanyak 2 gram
- Diekstraksi dengan methanol sebanyak 5 ml
- Disaring dengan kapas
- Dipindahkan ke tabung lain
- Ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  5% sebanyak 2-3 tetes
- Sampel positif (+) mengandung Fenol bila mengalami perubahan warna menjadi biru kehitaman.

**b). Prosedur Uji Tannin**

- Sampel sebanyak 2 gram
- Diekstraksi menggunakan 5 ml air panas
- Disaring dengan kapas
- Dipindahkan ke tabung lain
- Ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  5% sebanyak 2 -3 tetes
- Sampel positif (+) mengandung Tannin bila mengalami perubahan warna menjadi hijau kehitaman.

**c). Prosedur Uji Lieberman Burchard (Uji Terpenoid dan Steroid)**

- Sampel sebanyak 5 gram
- Diekstraksi dengan etanol sebanyak 5 ml
- Disaring dengan kapas
- Dipanaskan sampai kering
- Diekstraksi dengan kloroform dan air dengan perbandingan 1:1
- Ekstrak kloroformnya di teteskan pada plat tetes sebanyak 2 tetes
- Dibiarkan sampai kering
- Ditambahkan asam sulfat pekat 1 tetes

- Ditambahkan asam asetat anhidrat 1 tetes
- Lihat perubahan warnanya
- Sampel positif (+) mengandung terpenoid (Triterpenoid) bila mengalami perubahan warna merah atau coklat namun jika warna berubah menjadi warna biru, ungu atau hijau mengandung steroid.

#### d). Prosedur Uji Saponin

- Sampel sebanyak 2 gram
- Diekstraksi dengan menggunakan 5 ml air panas
- Disaring dengan kapas
- Dipindahkan ke tabung lain
- Kocok kuat dan diamkan selama 2 menit
- Tambahkan HCl 2 N sebanyak 2 tetes
- Kocok dengan kuat kemudian lakukan pengamatan dengan cara membiarkan terlebih dahulu selama 10 menit jika terdapat buih-buih dengan intensitas yang banyak maka sampel positif (+) mengandung saponin.

#### e). Prosedur Uji Flavonoid

Prosedur 1:

- Sampel sebanyak 2 gram
- Diekstraksi dengan methanol sebanyak 5 ml
- Disaring dengan kapas
- Dipindahkan ke tabung lain
- Tambahkan HCl pekat sebanyak 2 tetes
- Kocok dengan kuat
- Tambahkan Mg serbuk dan kocok kuat apakah terbentuk buih



- Sampel positif (+) mengandung Flavonoid bila terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan larutan berubah menjadi jingga.

Prosedur 2:

- Sampel sebanyak 2 gram
- Disekstraksi dengan methanol sebanyak 5 ml
- Disaring dengan kapas
- Dipindahkan ke tabung lain

Tambahkan  $H_2SO_4$  2N sebanyak 2 tetes

Kocok dengan kuat

- Sampel positif (+) apabila terdapat perubahan warna yang begitu mencolok yaitu kuning merah atau coklat yang mengindikasikan kandungan Flavonoid

Prosedur 3:

- Sampel sebanyak 2 gram
- Disekstraksi dengan methanol sebanyak 5 ml
- Disaring dengan kapas
- Dipindahkan ke tabung lain

Tambahkan NaOH 10 % sebanyak 2 tetes

Kocok dengan kuat

- Sampel positif (+) apabila terdapat perubahan warna yang sangat mencolok yaitu warna kuning merah coklat atau hijau yang menandakan kandungan Flavonoid.

**f). Prosedur Uji Alkanoid**

- Sebanyak 4 gram sampel digerus
- Diekstraksi dengan kloroform
- Ditambahkan amonia 5%
- Dikocok dengan kuat
- Terbentuk 2 lapisan fase kloroform dan fase cair.
- Dengan menggunakan pipet yang telah diberi kapas pada ujungnya untuk menyaring, ambil lapisan fase cair
- Ditambahkan HCl 2 N
- Dikocok kuat
- Dimasukan ke 4 tabung A, B, C dan D
- Tabung A ditambahkan pereaksi Dragendorf, tabung B ditambahkan pereaksi Wagner, tabung C ditambahkan pereaksi Mayer dan tabung D ditambahkan pereaksi Hager
- Tabung A positif jika ada endapan kemerahan, Tabung B positif jika ada endapan kecoklatan, tabung C positif jika ada endapan putih dan tabung D positif jika ada endapan kuning.

**g). Prosedur Uji Kuinon**

- Sampel sebanyak 2 gram
- Diekstraksi dengan menggunakan 5 ml air panas
- Disaring dengan kapas
- Dipindahkan ke tabung lain
- Ditambahkan NaOH 1% sebanyak 2 -3 tetes
- Sampel Positif (+) mengandung kuinon bila mengalami perubahan warna menjadi kemerahan.



#### 4). Ekstraksi Pada Bagian Akar, Batang, Ranting, Kulit Dan Daun Tumbuhan Pasak Bumi

Bahan baku yang digunakan adalah serbuk halus atau tepung bagian tumbuhan Pasak Bumi (akar, batang, kulit, daun dan ranting). Bahan pelarut kimia yang digunakan untuk ekstraksi Pasak Bumi adalah metanol, aseton, kloroform, campuran metanol kloroform (1:2 v/v).

Peralatan yang digunakan terdiri dari peralatan preparasi bahan baku, alat penggiling, alat pengering, timbangan digital. Peralatan ekstraksi maserasi, peralatan ekstraksi *soxhlet*, peralatan ekstraksi *reflux*, peralatan sentrifugasi (*high speed refrigerated sentrifuge*/Himac CR 216) dan peralatan evaporasi (*rotary vacuum evaporator*).

Prosedur kerja untuk kegiatan ekstraksi adalah sebagai berikut:

Ekstraksi dengan maserasi dilakukan dengan cara perendaman bahan yang akan diekstrak pada lemari pendingin (suhu  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) menggunakan bahan pelarut selama 24 jam. Serbuk halus dari masing-masing bagian tanaman pasak bumi ditimbang, dimasukkan ke dalam erlemeyer, direndam dalam pelarut dengan berbagai jenis pelarut seluruh tabung erlenmeyer yang telah berisi bahan dengan pelarutnya diletakkan dalam lemari pendingin selama 24 jam.

Ekstraksi menggunakan *soxhlet* dilakukan dengan menimbang serbuk halus dari masing-masing bagian tanaman Pasak Bumi, dibungkus dengan kertas saring kemudian diletakkan pada tempat sampel pada perangkat alat *soxhlet*. Alat pemanas peralatan *soxhlet* dinyalakan pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  selama 3 jam sehingga pelarut akan menguap melalui kondensor dan turun pada kolom tempat sampel. Jika akumulasi pelarut pada kolom sampel telah penuh maka pelarut akan turun ke bagian tempat pelarut yang dipanaskan. Begitu terus berlangsung berulang kembali (merefluks) membuat siklus pelarut selama proses ekstraksi  $\pm 3$  jam.



Ekstraksi *reflux* pada dasarnya adalah melakukan ekstraksi dengan merefluks bahan sampel, pelarut yang digunakan secara bersama-sama melalui proses pemanasan dimana pada bagian atas antara campuran bahan dan pelarut diletakkan kondensor balik. Situasi ini membuat pelarut yang menguap akan terkondensasi kembali (*reflux*) balik kembali kedalam campuran bahan dan pelarut. Panas yang ditimbulkan mempercepat terjadinya kelarutan dan pengadukan meningkatkan terjadinya kontak dengan pelarut, hal inilah yang menyebabkan proses ekstraksi dapat berjalan efektif. Serbuk halus bagian tanaman Pasak Bumi ditimbang, dimasukkan ke dalam tabung erlemeyer dan ditambahkan pelarut yang telah ditentukan kemudian pemanasan dilakukan pada suhu 70°C selama 4 jam.

Setelah ekstraksi selesai dilakukan penyaringan pada sampel yang diekstraksi dengan maserasi dan *reflux* dengan menggunakan kertas saring. Supernatan yang diperoleh dari ekstraksi bahan sampel, dievaporasi menggunakan peralatan *rotary vacuum evaporator* hingga semua bahan pelarut menguap habis. Hasil evaporasi yang didapatkan dalam tahapan ini merupakan hasil ekstrak Pasak Bumi.

##### **5). Analisis Kualitatif Testosteron Dan Stigmasterol Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Analisis kualitatif testosteron dan stigmasterol dilakukan untuk mengetahui keberadaan kedua senyawa tersebut di bagian akar, batang, ranting, kulit dan daun pada hasil ekstrak tanaman Pasak Bumi dengan fraksinasi dengan *Thin Layer Chromatography* atau Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Pemisahan dilakukan dengan teknik KLT. Prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:



▪ Sampel dan beberapa fraksi standar dan lempeng tipis silika gel 60 F254 katalog Art 5554 dengan ukuran panjang 10 cm dan lebar 5 cm disiapkan.

Sampel dan semua fraksi standar diambil sedikit (0,35 g) kemudian dilarutkan kedalam 1,5 ml kloroform.

▪ Eluen yang digunakan adalah etanol dan kloroform dengan perbandingan 1 : 4.

Eluen dimasukkan ke dalam tabung kromatografi hingga 2 cm tingginya dari dasar tabung dan diletakkan bersama kertas saring untuk selanjutnya ditutup dengan rapat supaya jenuh dengan uap eluen.

▪ Pada bagian lempeng silika gel ditetaskan larutan ekstrak sampel menggunakan pipa kapiler. Dengan jarak tidak lebih 1 cm penetasan dilakukan pada salah satu ujung lempeng. Di lain tempat ditetaskan juga beberapa standar steroid yang disediakan.

▪ Ujung lempeng paling dekat dengan tempat penetasan dicelupkan ke dalam tabung kromatograf yang sudah jenuh dengan eluen. Kemudian ditutup rapat dan dibiarkan pelarut naik hingga batas yang ditentukan.

▪ Setelah dielusi hingga batas ditentukan, lempeng yang ada diangkat dan dilakukan pengeringan menggunakan oven selama beberapa menit.

▪ Lempeng langsung dilakukan pendeteksian menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254nm dan 365 nm.

## 6). Rancangan Penelitian

Uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa bioaktif pada bagian akar, batang, kulit dan daun tumbuhan Pasak Bumi merupakan uji yang bersifat kualitatif seperti yang terlihat pada Tabel 4.1. Dibawah ini :

Tabel 4.1. Pengujian kualitatif senyawa bioaktif bagian tumbuhan Pasak Bumi

No.	Kandungan Senyawa Aktif	Bagian tanaman pasak bumi				Metode
		Akar	Batang	Kulit	Daun	
1.	Senyawa Alkaloid	.....	.....	.....	.....	Colvenor-Fitzgerald
2.	Senyawa Flavonoid	.....	.....	.....	.....	Shinoda/ sianidin test
3.	Senyawa Fenolik	.....	.....	.....	.....	Etanol, heksan, heksan-etanol
4.	Senyawa Tanin	.....	.....	.....	.....	Uji Tanin
5.	Senyawa Saponin	.....	.....	.....	.....	Uji busa
6.	Senyawa Terpenoid - Steroid	.....	.....	.....	.....	Liebemen-Burchard

Keterangan : Jumlah tanda (+) menunjukkan intensitas warna, tanda (-) tidak terdapat senyawa bioaktif

Kegiatan ekstraksi bagian tumbuhan Pasak Bumi dengan bahan pelarut dan metode ekstraksi yang berbeda di sajikan seperti pada Tabel 3 dan 4 di bawah ini.

Tabel 4.2. Ekstraksi bagian tumbuhan Pasak Bumi dengan berbagai metode Maserasi, Soxhletasi dan Reflux

Sampel	Pelarut yang digunakan untuk Mengekstrak			
	Metanol	Aseton	Kloroform	Klorometanol
Daun	.....	.....	.....	.....
Ranting	.....	.....	.....	.....
Kulit	.....	.....	.....	.....
Akar	.....	.....	.....	.....
Batang	.....	.....	.....	.....

Tabel 4.3. Perbandingan efektivitas metode pengestraksi pada bagian akar, batang, ranting, kulit dan daun tumbuhan Pasak Bumi

Sampel	Pelarut yang digunakan untuk Mengekstrak			
	Metanol	Aseton	Kloroform	Klorometanol
Maserasi	Sampel : ...	Sampel : ...	Sampel : ...	Sampel : ...
	Ekstrak : ...	Ekstrak : ...	Ekstrak : ...	Ekstrak : ...
	Rendemen : ..	Rendemen : ..	Rendemen : ..	Rendemen : ..
Soxhletasi	Sampel : ..	Sampel : ..	Sampel : ..	Sampel : ..
	Ekstrak : ..	Ekstrak : ..	Ekstrak : ..	Ekstrak : ..
	Rendemen : ...	Rendemen : ...	Rendemen : ..	Rendemen : ..
Reflux	Sampel : ...	Sampel : ...	Sampel : ...	Sampel : ...
	Ekstrak : ...	Ekstrak : ...	Ekstrak : ...	Ekstrak : ...
	Rendemen : ..	Rendemen : ..	Rendemen : ..	Rendemen : ..



Analisis kualitatif testosteron dan stigmasterol dengan fraksinasi dilakukan dengan mempergunakan kromatografi lapis tipis (KLT) sedangkan pengamatan dengan sinar UV pada panjang gelombang 254nm dan 365 nm akan mendapatkan faktor Rf (*Retention factor*). Nilai-nilai Rf faktor tersebut menunjukkan apakah ekstrak bagian akar, batang, ranting, kulit dan daun mengandung testosteron dan stigmasterol. Data yang ada disajikan dalam bentuk gambar.

#### 4.3.2. Penelitian Tahap II : Isolasi Stigmasterol Dari Bagian Tumbuhan

##### Pasak Bumi Yang Memiliki Rendemen Ekstrak Tertinggi

##### 1). Penyiapan Bahan Baku dan Ekstraksi

Bahan baku yang digunakan bagian tumbuhan Pasak Bumi yang berdasarkan penelitian tahap I memiliki rendemen ekstrak tertinggi. Bahan baku tersebut dihaluskan hingga berbentuk serbuk atau tepung kemudian dilakukan diekstraksi menggunakan metode dan pelarut terbaik berdasarkan hasil pengujian yang dilakukan pada penelitian tahap I.

##### 2). Pemisahan Ekstrak Menggunakan Metode Kromatografi Kolom

Bahan yang telah diekstraksi di saring terlebih dahulu baru kemudian di evaporasi untuk pemekatan sampel dan selanjutnya dilakukan proses pemisahan ekstrak menggunakan metode kromatografi kolom agar mendapatkan kristal stigmasterol.

##### 3). Rancangan Penelitian

Isolasi stigmasterol dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi menggunakan metode kromatografi kolom seperti yang terlihat pada Tabel 4.4. dibawah ini :

Tabel 4.4. Isolasi stigmasterol dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi

Kode Sampel	Massa Sampel (g)	M. Ekstrak Total (g)	% M.Ekstrak	m.Ekstrak Kolom (g)	Stigmasterol (mg)	% Stigmasterol
I	.....	.....	.....	.....	.....	.....
II	.....	.....	.....	.....	.....	.....
III	.....	.....	.....	.....	.....	.....
IV	.....	.....	.....	.....	.....	.....

#### 4). Pengamatan Parameter

Parameter yang diamati terdiri dari massa ekstrak total, persentase massa ekstrak, massa ekstrak kolom, jumlah stigmasterol dan persentase stigmasterol.

#### 5). Pengujian Bahan Aktif

Ekstrak yang berasal dari bagian tumbuhan Pasak Bumi yang memiliki rendemen ekstrak tertinggi (EPB) dan ekstrak kolom stigmasterol selanjutnya dianalisis dengan menggunakan peralatan sebagai berikut:

##### 1). Spektroskopi Fourier Transform Infra Red (FTIR)

FT-IR dipergunakan dalam mengidentifikasi rangkaian gugus fungsi dan mengetahui kandungan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak atau suatu bahan sampel. Karakterisasi menggunakan FT-IR akan memberikan informasi gugus fungsi yang terkandung dalam bahan tersebut. Spektroskopi FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*) adalah spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya. Inti spektroskopi FT-IR adalah interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari penstransmian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang



diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang ( $\mu\text{m}$ ) atau bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Marcott, 1986; Anam dan Sirojudin, 2007).

## **2). Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS)**

Penggabungan dua komponen menjadi sebuah bentuk sistem GC-MS memungkinkan pemisahan campuran menjadi komponen tunggal, yang dapat diidentifikasi, dan memberikan informasi kuantitatif dan kualitatif dari jumlah dan struktur kimia setiap komponen. Berat molekul dan fragmentasi spectra merupakan dasar dari penentuan struktur molekul. Gas kromatografi dilengkapi dengan oven untuk mempertahankan dan memanaskan kolom GC. Gas pembawa yang digunakan berupa gas nitrogen, helium, atau hidrogen, yang digunakan untuk membawa sampel yang diinjeksikan ke dalam kolom, tempat terjadinya pemisahan dan selanjutnya masuk ke bagian interface mass spektrometer. Kromatogram yang dihasilkan sama bentuknya dengan kromatogram UV dengan puncak-puncak yang mewakili waktu retensi dari setiap komponen yang ada (McMaster 2007).

## **3). Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS)**

Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC/MS-MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometer massa. Data LC-MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu, Senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel-partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak). Hasil analisis data LC/MS-MS akan didapatkan



kromatogram berupa alur tinggi peak dan akan didapatkan bobot molekul dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak sehingga dapat di ketahui jumlah senyawa yang dikandung setiap sampel. Keuntungan dari LC-MS yaitu dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa termal labil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi, bahkan juga protein (Himawan, 2010).

#### **4). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)**

Instrumen LC-MS/MS merupakan gabungan dari instrumen kromatografi cair dan instrumen spektrometri massa dengan dua penyaring. Instrumen ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Pemisahan senyawa melalui instrumen ini dilakukan berdasarkan perbedaan kepolarannya melalui instrumen kromatografi cair, kemudian senyawa yang telah murni tersebut diidentifikasi berat molekul dan rasio massa per muatannya sebanyak dua kali oleh instrumen spektrometri massa (Kang 2012).

Senyawa yang masuk ke dalam instrumen spektrometri massa diionisasi melalui nebulizer menjadi droplet-droplet ion, kemudian mengalami pengayaan ion di dalam terowongan ion (ion tunnel). Ion tersebut kemudian disaring melalui mass analyzer pertama. Ion target yang telah tersaring mengalami perpecahan dan pertumbukan di dalam collision cell menjadi fragmen-fragmen ion. Selanjutnya fragmen ion tersebut masuk ke dalam mass analyzer kedua dan mengalami penyaringan kembali berdasarkan massanya. Kemudian, fragmen ion target akan dideteksi melalui detektor pada spektrometri massa (Liao et al. 2014).

#### **5). Scanning Electron Microscope (SEM)**

SEM merupakan salah satu tipe mikroskop elektron yang mampu menghasilkan resolusi tinggi dari Gambaran suatu permukaan sampel. Oleh



karena itu gambar yang dihasilkan oleh SEM mempunyai karakteristik secara kualitatif dalam dua dimensi karena menggunakan elektron sebagai pengganti gelombang cahaya serta berguna untuk menentukan struktur permukaan sampel. Material yang dikarakterisasi SEM yaitu berupa lapisan tipis yang memiliki ketebalan 20  $\mu\text{m}$  dari permukaan. Gambar topografi permukaan berupa tonjolan, lekukan dan ketebalan lapisan tipis dari penampang melintangnya (Mulder, 1996).

SEM atau mikroskop elektron ini memfokuskan sinar elektron (electron beam) di permukaan obyek dan mengambil gambar dengan mendeteksi elektron yang muncul pada permukaan obyek. Perbedaan tipe yang berbeda dari SEM memungkinkan penggunaan yang berbeda-beda antara lain untuk studi morfologi, analisis komposisi dengan kecepatan tinggi, kekasaran permukaan, porositas, distribusi ukuran partikel, homogenitas material atau untuk studi lingkungan tentang masalah sensitifitas material (Sitorus, 2009).

#### **4.3.3. Penelitian Tahap III : Maskulinasi Ikan Nila Menggunakan Rendemen Ekstrak Tertinggi dan Stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi.**

##### **a. Maskulinisasi Ikan Nila melalui Perendaman**

##### **1). Penyiapan Ekstrak dan Stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi**

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini ekstrak yang memiliki rendemen tertinggi (EPB) dan ekstrak kolom stigmasterol (SPB) hasil isolasi dari penelitian tahap II.

##### **2). Pemeliharaan Ikan Uji**

Prosedur kerja yang dilakukan dalam memelihara ikan adalah sebagai berikut:

**a). Persiapan Wadah**

Wadah yang digunakan adalah akuarium ukuran 60 x 40 x 30cm sebanyak 15 unit. Akuarium diisi dengan air yang sudah diendapkan dalam tandon air selama seminggu. Pergantian air dilakukan dengan sistem resirkulasi. Dalam tandon dipasang heater untuk menstabilkan suhu pada kisaran 28 - 30°C.

**b). Ikan Uji**

Ikan uji yang digunakan adalah larva ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*) diperoleh dari Unit Pembenuhan Rakyat (UPR) di sekitar wilayah Desa Bincau Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan. Pengambilan larva pada saat larva berumur 1 hari (kuning telur masih ada), selama 5 hari dipelihara dalam akuarium sampai kuning telur habis (umur 7 hari), dengan bobot 0.01 - 0.02 g/larva. Kepadatan larva dalam akuarium sebanyak 50 ekor /akuarium

**c). Konsentrasi Hormon dan Lama waktu Perendaman**

Penelitian menggunakan ekstrak rendemen tertinggi Pasak Bumi (EPB) melalui metode perendaman dengan konsentrasi hormon yang digunakan sebanyak 30 mg/liter, 60mg/liter dan 90mg/liter. Perendaman dilakukan pada hari ke-7 selama 24 jam. Perlakuan untuk ekstrak yang memiliki rendemen tertinggi terdiri dari kontrol positif K (+) dan negatif K (-). K (+) dilakukan perendaman dalam larutan 17 $\alpha$ -metilttestesteron dengan konsentrasi 50 mg/liter selama 24 jam pada hari ke-7, sedangkan pada K (-), larva direndam tanpa menggunakan hormon selama 24 jam pada hari ke-7.

Penelitian menggunakan ekstrak kolom stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi (SPB) melalui metode perendaman dengan konsentrasi yang digunakan sebanyak 25 mg /liter, 50 mg/liter dan 75 mg/liter. Perendaman dilakukan



pada hari ke-7 setelah penetasan. Waktu masing-masing perendaman selama 24 jam. Perlakuan ini terdiri dari kontrol positif K (+) dan negatif K (-).

Kontrol positif (+) dilakukan perendaman dalam larutan stigmasterol sintetik dengan konsentrasi 50 µg/liter selama 24 jam pada hari ke-7 sedangkan pada Kontrol negatif K (-), larva direndam tanpa menggunakan hormon selama 24 jam pada hari ke-7.

#### d). Perendaman Larva

Prosedur kerja perendaman adalah wadah 5 liter diisi air sebanyak 3 liter/wadah. EPB dilarutkan ke dalam air setiap wadah dengan konsentrasi hormon berdasarkan konsentrasi yang telah ditentukan. Pada perlakuan K (+) hormon 17 $\alpha$ -metilttestesteron, stigmasterol sintetik (ST), SPB1, SPB2 dan SPB3 terlebih dahulu dilarutkan dalam 95% ethanol sebelum dicampurkan kedalam wadah perendaman. Masing-masing wadah dilengkapi aerasi untuk suplai oksigen dan sekaligus untuk menghomogenitaskan campuran air dengan hormon. Sebelum larva dimasukkan, wadah perendaman didiamkan selama 30 menit.

#### e). Pemeliharaan Larva dan Pemberian Pakan

Setelah perendaman selesai, larva dipindahkan kedalam akuarium pemeliharaan. Larva diberi pakan *starter* berbentuk tepung untuk benih ikan air tawar merk Hi-Pro-Vite, tipe PS-P yang diproduksi oleh PT. Centra Proteina, Tbk. Komposisi nutrisi: protein minimum 40%, lemak minimum 10%, serat kasar maksimal 8%, dan kadar air 12%. Selama pemeliharaan, ukuran dan jenis pakan disesuaikan dengan tingkat perkembangan larva. Pakan yang diberikan dengan frekuensi pemberian 3 - 4 kali/hari. Larva dipelihara selama 60 hari sehingga dapat diidentifikasi dengan metode asetokarmin untuk membedakan kelamin jantan dan betina.

**f). Pengukuran Kualitas Air**

Pengukuran kualitas air meliputi suhu air, oksigen terlarut, pH dan  $\text{NH}_3$ .

Suhu diukur menggunakan termometer, oksigen terlarut menggunakan DO meter, pH dengan pH meter dan  $\text{NH}_3$  diukur setiap minggu menggunakan spektrofotometer.

**g). Pemeriksaan gonad ikan uji**

Pemeriksaan gonad ikan uji menggunakan metode asetokarmin (Zairin, 2002). Larutan asetokarmin dibuat dengan melarutkan 0,6 g bubuk karmin kedalam 100 ml asam asetat 45%. Larutan dididihkan selama 2 hingga 4 menit kemudian didinginkan dan disaring dengan kertas saring. Selanjutnya dimasukkan dalam botol tertutup dan disimpan pada suhu ruang.

Pemeriksaan gonad dilakukan setelah ikan berumur 60 hari dengan mengambil sampel sebanyak 30% dari ikan uji. Ikan dibedah dan diambil gonadnya secara hati-hati menggunakan pinset. Untuk memudahkan pengambilan gonad, usus dan organ dalam perut dikeluarkan. Sebagian gonad diletakkan di atas gelas objek kemudian dicincang dengan menggunakan pisau skalpel sampai halus. Kemudian cincangan gonad di atas objek gelas diberi larutan asetokarmin sebanyak 2 tetes. Objek gelas ditutup dengan cover gelas. Gonad siap diamati dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 40X (Guerrero, 1974).

Selanjutnya sebagian gonad diambil untuk membuat preparat awet histologis dengan menggunakan metode mikroteknik. Menurut Gunarso (1989) prosedur pengamatan gonad secara histologis adalah sebagai berikut:



- Fiksasi dalam larutan Bouin (campuran asam pikrat, formalin dan asam asetat dengan perbandingan 15:4:1) selama 24 jam.
- Setelah itu dicuci dengan air, difiksasi dalam larutan alkohol 70% sampai warna kuning hilang dan secara bertingkat larutan diganti dengan alkohol 80, 85, 90, 95% masing-masing selama 2 jam dan 100% selama 1 jam sebanyak tiga kali.
- Dilanjutkan dengan proses penjernihan contoh jaringan dalam larutan alkohol dan xylol (1 : 1) selama 45 menit dan dalam larutan xylol selama 45 menit sebanyak 3 kali.
- Proses infiltrasi dilakukan dengan parafin pada titik didih 60°C yang dipanaskan dalam oven dan dicetak di dalam parafin selama 45 menit.
- Pemotongan blok parafin setebal 5 – 7 $\mu$ m yang berisi sel telur dengan menggunakan mikrotom.
- Pita parafin ditempelkan di atas gelas obyek kemudian dilakukan proses deparafinisasi (menghilangkan parafin) dengan perendaman dalam larutan xylol selama 2 menit sebanyak dua kali dan hidrasi dalam alkohol 100% selama 2 menit sebanyak dua kali dilanjutkan dalam alkohol 95, 90, 85, 80, 70% masing-masing 2 menit, kemudian dicuci dengan air sampai berwarna warna putih.
- Pewarnaan dengan hematoksilin dilakukan selama 30 detik, dicuci air selama 5 detik dan selanjutnya diwarnai kembali dengan eosin selama 30 detik kemudian dicuci kembali dengan air selama 5 detik. Preparat yang sudah diwarnai kemudian didehidrasi dalam larutan alkohol 70, 80, 90, 95% masing-masing selama satu menit dilanjutkan dalam alkohol 100% selama satu menit sebanyak dua kali. Selanjutnya preparat dijernihkan dalam larutan xylol selama satu menit sebanyak

dua kali.

- Preparat sel telur pada gelas obyek diberi balsam Kanada kemudian ditutup dengan gelas penutup untuk pengamatan di bawah mikroskop.

Pengamatan dilakukan terhadap lapisan yang mengelilingi sel telur, adanya kuning telur (vitelogenesis) dan inti sel telur. Dengan melihat lapisan-lapisan tersebut dapat ditentukan pencapaian stadium perkembangan sel telur.

#### h). Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan. Penelitian menggunakan ekstrak rendemen tertinggi pasak bumi (EPB) adalah sebagai berikut:

- Perlakuan A, EPB1 konsentrasi 30 mg/liter
- Perlakuan B, EPB2 konsentrasi 60 mg/liter
- Perlakuan C, EPB3 konsentrasi 90 mg/liter
- Perlakuan D,  $17\alpha$ -metilttestesteron konsentrasi 50 mg/liter (kontrol +)
- Perlakuan E, perendaman tanpa EPB dan MT (kontrol (-)).

Sedangkan Penelitian menggunakan ekstrak kolom stigmasterol tumbuhan pasak bumi (SPB)

- Perlakuan A, SPB1 konsentrasi 25 mg/liter
- Perlakuan B, SPB2 konsentrasi 50 mg/liter
- Perlakuan C, SPB3 konsentrasi 75 mg/liter
- Perlakuan D, Stigmasterol sintetik konsentrasi 50 mg/liter (kontrol +)
- Perlakuan E, perendaman tanpa stigmasterol sintetik (kontrol (-)).

Model rancangan penelitian yang digunakan sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$



Keterangan:

$Y_{ijk}$  = Nilai pengamatan perlakuan ke-i, ulangan ke-j

$\mu$  = Rata-rata umum

$\alpha_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\epsilon_{ijk}$  = Pengaruh acak yang menyebar normal

## b. Maskulinisasi Ikan Nila melalui Pakan

### 1). Penyiapan Ekstrak dan Stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini ekstrak yang memiliki rendemen tertinggi (EPB) dan ekstrak kolom stigmasterol (SPB) hasil isolasi dari penelitian tahap II.

### 2). Pemeliharaan Ikan Uji

Prosedur kerja yang dilakukan dalam kegiatan ini pada bagian persiapan wadah, ikan uji, pengukuran kualitas air dan pemeriksaan gonad uji prosedur dan cara kerjanya tidak berbeda dengan kegiatan maskulinisasi ikan nila melalui perendaman. Bagian yang berbeda adalah sebagai berikut:

#### a). Konsentrasi Hormon

Penelitian menggunakan ekstrak rendemen tertinggi Pasak Bumi (EPB) melalui pakan dengan konsentrasi hormon yang digunakan sebanyak 30 mg/kg pakan, 60 mg/kg pakan, 90 mg/kg pakan, kontrol positif K (+) 50 mg  $17\alpha$ -metiltestesteron (MT)/kg pakan dan kontrol negatif K (-). 0 mg/kg pakan.

Sedangkan penelitian menggunakan ekstrak kolom stigmasterol (SPB) tumbuhan Pasak Bumi melalui pakan dengan konsentrasi yang digunakan sebanyak 25 mg/kg pakan, 50 mg/kg pakan, 75 mg/kg pakan, kontrol positif K (+) 50 mg stigmasterol sintetis/kg pakan dan kontrol negatif K (-) 0 mg/kg pakan.

### b). Pembuatan Pakan Perlakuan

Pakan yang digunakan berbentuk tepung untuk benih ikan air tawar merk Hi-Pro-Vite, tipe PS-P yang diproduksi oleh PT. Centra Proteina, Tbk. Komposisi nutrisi: protein minimum 40%, lemak minimum 10%, serat kasar maksimal 8%, dan kadar air 12%.

Pembuatan pakan perlakuan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi (EPB) dengan dosis 30 mg/kg pakan, 60 mg/kg pakan, 90 mg/kg pakan dan kontrol positif MT 50 mg/kg masing-masing dilarutkan ke dalam alkohol 70% sebanyak 300 ml. *Magnetic stirrer* digunakan untuk melarutkan EPB dalam cairan alkohol selama beberapa menit sampai kedua bahan benar-benar homogen. Setelah EPB sudah benar-benar larut dalam alkohol, EPB dimasukkan ke dalam sprayer dan disemprotkan ke pakan yang akan digunakan untuk ikan uji, lalu diaduk hingga rata dan diangin-anginkan hingga kering. Begitu juga dengan pembuatan pakan perlakuan ekstrak kolom stigmasterol pasak bumi (SPB) dengan dosis 25 mg/kg pakan, 50 mg/kg pakan, 75 mg/kg pakan dan kontrol positif Stigmasterol sintetik (ST) 50 mg/kg pakan masing-masing dilarutkan ke dalam alkohol 70% sebanyak 300 ml dan langkag seterusnya sama seperti persiapan pakan mengandung EPB.

### c). Pemberian Pakan

Pakan yang diberikan telah ditambahkan dengan EPB maupun SPB. Sebelum diberikan pakan ditimbang menggunakan timbangan digital sesuai dengan perlakuan. Prosentase pemberian pakan harian 10 – 30%/hari dengan frekuensi pemberian 3-4 kali/hari. Pemberian Pakan EPB maupun SPB setiap hari dilakukan sesuai dosis perlakuan sampai dengan hari ke 30 hari pemeliharaan atau hari 37 setelah kuning telur habis, untuk pemeliharaan selanjutnya dari hari ke-31 hingga hari ke 60 di akhir



percobaan, ikan percobaan diberikan pakan biasa tanpa campuran EPB maupun SPB dengan ukuran dan jenis yang menyesuaikan dengan tingkat perkembangan larva.

d) **Rancangan Penelitian**

Rancangan percobaan digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan. Penelitian menggunakan ekstrak rendemen tertinggi pasak bumi (EPB) adalah sebagai berikut:

- Perlakuan A, EPB1 konsentrasi 30 mg/kg pakan
- Perlakuan B, EPB2 konsentrasi 60 mg/ kg pakan
- Perlakuan C, EPB3 konsentrasi 90 mg/ kg pakan
- Perlakuan D, 17 $\alpha$ -metilttestesteron konsentrasi 50 mg/ kg pakan (kontrol +)
- Perlakuan E, perendaman tanpa EPB dan MT 0 mg/ kg pakan (kontrol (-)).

Sedangkan Penelitian menggunakan ekstrak kolom stigmasterol tumbuhan pasak bumi (SPB)

- Perlakuan A, SPB1 konsentrasi 25 mg/ kg pakan
- Perlakuan B, SPB2 konsentrasi 50 mg/ kg pakan
- Perlakuan C, SPB3 konsentrasi 75 mg/ kg pakan
- Perlakuan D, Stigmasterol sintetik konsentrasi 50 mg/liter/ kg pakan (kontrol +)
- Perlakuan E, perendaman tanpa stigmasterol sintetik 0 mg/ kg pakan (kontrol (-)).

Model rancangan penelitian yang digunakan sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

$Y_{ijk}$  = Nilai pengamatan perlakuan ke-i, ulangan ke-j

$\mu$  = Rata-rata umum

$\alpha_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\epsilon_{ijk}$  = Pengaruh acak yang menyebar normal

### c. Pengamatan Parameter

Parameter yang diamati berupa perhitungan persentase ikan jantan, kelangsungan hidup ikan, persentase ikan nila interseks, pertumbuhan dan pengukuran kualitas air.

#### 1). Persentase Ikan Jantan, Betina, Intersek

Perhitungan persentase ikan jantan, betina dan intersek menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persen (\%)} \text{ Ikan Jantan} = \frac{\sum \text{Ikan Jantan (sampel)}}{\sum \text{Total ikan sampel}} \times 100\%$$

$$\text{Persen (\%)} \text{ Ikan Betina} = \frac{\sum \text{Ikan Betina (sampel)}}{\sum \text{Total ikan sampel}} \times 100\%$$

$$\text{Persen (\%)} \text{ Ikan Intersek} = \frac{\sum \text{Ikan Intersek (sampel)}}{\sum \text{Total ikan sampel}} \times 100\%$$

#### 2). Kelangsungan Hidup Ikan Uji

Untuk mengetahui kelangsungan hidup/*survival rate* ikan, pada akhir perlakuan dihitung jumlah ikan yang hidup. Perhitungan kelangsungan hidup menggunakan rumus :

$$SR_t (\%) = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan:

$SR_t$  = *Survival rate* selama perlakuan pemberian TPB

$N_t$  = Jumlah ikan pada akhir perlakuan (ekor)

$N_0$  = Jumlah ikan pada awal perlakuan (ekor)



### 3). Pertumbuhan Ikan Uji

Pengukuran bobot ikan dilakukan setiap dua minggu untuk perhitungan kebutuhan pakan dan pertumbuhan.

#### ▪ **Specific Growth Rate (SGR) atau Laju Pertumbuhan Harian (LPH)**

Menurut Effendi (1997), Laju pertumbuhan harian adalah perubahan ikan dalam berat, ukuran, maupun volume seiring dengan perubahan waktu.

Perhitungan pertumbuhan (LPH) menggunakan rumus sebagai berikut:

$$LPH = \frac{(W_t - W_o)}{T}$$

Keterangan:

LPH = Laju pertumbuhan

W<sub>t</sub> = Bobot rata-rata benih pada saat akhir  
Pemeliharaan

W<sub>o</sub> = Bobot rata-rata benih saat awal tebar

#### ▪ **Pertumbuhan Mutlak atau Pertambahan Berat**

Pertumbuhan mutlak (GR) adalah pertambahan berat ikan setiap harinya selama pemeliharaan. Pertambahan mutlak ditunjukkan dalam satuan gram/hari. Menurut Effendi (1997), Perhitungan pertumbuhan Mutlak menggunakan rumus sebagai berikut:

$$GR = W_t - W_o$$

Keterangan:

SR = Pertumbuhan mutlak (gram)

W<sub>t</sub> = Berat rata-rata akhir ikan (gram)

W<sub>o</sub> = Berat rata-rata awal benih ikan (gram)

### 4). Profil Hormon Testosteron Ikan Uji

Pengukuran kadar hormon testosteron ikan uji dilakukan pada awal percobaan (0 hari), tengah waktu percobaan (30 Hari) dan di akhir percobaan (60 hari). Kadar hormon testosteron diukur dengan menggunakan metode ELIZA (*Enzym linked immunosobent assay*) yaitu

metode immunoassay yang menggunakan enzim sebagai label.

#### d. Analisis Data

Data persentase ikan jantan, kelangsungan hidup dan pertumbuhan ikan dibuat tabulasi. Data dari tabulasi diolah menggunakan program Microsoft Excel 2007 dan program STATISTICA 8. Data yang sudah diolah dilakukan analisis sidik ragam (ANOVA) dengan uji F bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik.





## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Penelitian Tahap Pertama

#### 5.1.1. Pengujian Proximat Tumbuhan Pasak Bumi

Berdasarkan pengujian proximat pada tepung bagian tumbuhan Pasak Bumi yang terdapat pada Tabel 5.1. dapat dijelaskan bahwa kandungan protein tertinggi terdapat pada daun sebesar 16,81%; kandungan lemak tertinggi terdapat pada daun sebesar 0,99%; kandungan air tertinggi sebesar 9,46% terdapat pada daun; kadar abu tertinggi terdapat di daun yaitu sebesar 6,14% dan kandungan karbohidrat tertinggi sebanyak 89,03 % terdapat di batang tumbuhan Pasak Bumi.

Tabel 5.1. Pengujian proximat tepung bagian tumbuhan Pasak Bumi

No.	Bagian Tumbuhan	Analisa Proximat (%)				
		Protein	Lemak	Air	Abu	Karbohidrat
1.	Tepung Akar	2,36	0,19	9,36	1,00	87,09
2.	Tepung Batang	3,45	0,18	6,19	1,15	<b>89,03</b>
3.	Tepung Daun	<b>16,81</b>	<b>0,99</b>	<b>9,46</b>	<b>6,14</b>	66,60
4.	Tepung Kulit Batang	6,72	0,43	8,83	3,88	80,14
5.	Tepung Ranting	3,78	0,28	7,87	4,21	83,86

Pengujian proksimat secara umum dilakukan untuk mengetahui unsur pokok berupa air, abu, karbohidrat, protein dan lemak. Menurut Winarno (2008) suatu bahan pangan memiliki komposisi kimia yang berbeda. Perbedaan ini bisa berupa bagian bahan, jenis atau spesies dan umur bahan tersebut. Komponen bioaktif yang dihasilkan suatu tanaman biasanya berasal dari metabolit sekunder yang dimiliki oleh tanaman karena itu dilakukan pengujian proksimat untuk memprediksi bagaimana komposisi kimia yang terdapat didalamnya.

Tabel 5.1. menunjukkan bahwa bagian pada daun mengandung kadar air tertinggi yaitu sebesar 9,46% dibandingkan dengan kadar air akar sebesar 9,36%; kulit batang sebesar 8,83%; ranting sebesar 7,87% dan batang sebesar 6,19%. Perbedaan ini diduga terkait dengan fungsi daun dalam menjaga stabilitas tekanan



turgor dan tempat fotosintesis. Habitat dan lingkungan tempat hidup sangat berpengaruh terhadap kadar air suatu bahan pangan, dalam penelitian ini prinsip kerja yang dilakukan menggunakan bantuan panas. Kadar air dianalisis dengan mengukur jumlah berat air bebas yang teruapkan dan tidak terikat kuat dalam jaringan bahan (Jacoeb et al., 2011).

Kadar protein tumbuhan Pasak Bumi dari nilai tertinggi yaitu daun sebesar 16,81%, kulit batang sebesar 6,72%, ranting sebesar 3,78%, batang sebesar 3,45% dan akar sebesar 2,36%. Menurut Megayana et al. (2012) komposisi kimia dari suatu organisme yang hidup disuatu wilayah tertentu dipengaruhi oleh kondisi nutrisi yang terkandung di habitat tersebut dan Nurjanah et al. (2010) menjelaskan bahwa kandungan protein yang dimiliki tanaman lebih rendah jika dibandingkan dengan kandungan protein hewan yang berkisar antara 18,71% - 20,67%.

Kadar lemak daun tumbuhan Pasak Bumi sebesar 0,99%, kulit batang sebesar 0,43%, ranting sebesar 0,28%, akar sebesar 0,19% dan batang sebesar 0,18%. Kadar lemak yang rendah dapat disebabkan oleh kandungan kadar air yang dimiliki cukup tinggi sehingga kadar lemak menurun secara proporsional. Umumnya terdapat hubungan yang berbanding terbalik antara kadar air dengan kadar lemak, semakin tinggi kadar air mengakibatkan kadar lemak yang terkandung dalam suatu bahan menjadi semakin rendah (Yunizal et al., 1998).

Kadar karbohidrat tumbuhan Pasak Bumi tertinggi terdapat pada batang sebesar 89,03%, akar sebesar 87,9%, ranting sebesar 83,88%, kulit batang sebesar 80,14% dan daun sebesar 66,60%. Karbohidrat berperan dalam metabolisme tumbuhan dan hewan. Karbohidrat menghasilkan kalori sebanyak 4.2 kalori setiap gram (Ketaren, 1986).



### 5.1.2. Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Tumbuhan Pasak Bumi

Pengujian kuantitatif senyawa bioaktif pada bagian tumbuhan Pasak Bumi dapat dilihat pada Lampiran 1 dan Tabel 5.2. Uji fitokimia dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang terkandung dalam suatu bahan. Pengujian fitokimia penelitian ini meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, fenol hidrokuinon, saponin, steroid dan triterpenoid.

Tabel 5.2. Pengujian kualitatif senyawa bioaktif bagian tumbuhan Pasak Bumi

No.	Kandungan Senyawa Aktif	Bagian tanaman pasak bumi					Metode
		Akar	Batang	Daun	Kulit	Ranting	
1.	Senyawa Alkaloid	-	-	-	-	-	Colvenor-Fitzgerald
2.	Senyawa Flavonoid	-	-	++++	-	++++	Shinoda/sianidin test
3.	Senyawa Fenolik	-	-	++++	-	++++	Etanol, heksan, heksan-etanol
4.	Senyawa Tanin	-	-	++++	-	++++	
5.	Senyawa Saponin	++++	+	-	++++	+++	Uji busa
6.	Senyawa Terpenoid - Steroid	++	++	++++	++	++++	Liebemen-Burchard

Keterangan : Jumlah tanda (+) menunjukkan intensitas warna, tanda (-) tidak terdapat senyawa bioaktif

Saponin ditemukan pada akar, batang, kulit dan ranting yang menggunakan pelarut etanol dan etil asetat dan tidak terdeteksi pada ekstrak kasar yang menggunakan pelarut n-heksana. Penggunaan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran berbeda dapat menjadi salah satu faktor tidak terdeteksinya saponin pada ekstrak yang menggunakan pelarut nonpolar, misalnya n-heksana. Sumarto et al. (2011) menyatakan bahwa saponin termasuk dalam golongan glikosida yang umumnya banyak ditemukan pada tumbuhan, memiliki karakteristik berupa buih, mudah larut dalam pelarut polar dan tidak larut dalam pelarut non polar. Senyawa saponin bersifat antioksidan dan *radical scavenger* dengan membentuk hidrogen peroksida sebagai senyawa antara dan dapat menyumbangkan hidrogen pada



senyawa radikal DPPH (1,1- difenil-2-pikrihidazil ) sehingga mengakhiri reaksi rantai radikal (Xiong et al. 2010).

Kandungan steroid terdeteksi pada ekstrak etanol, etil asetat dan n-heksana daun serta pada n-heksana kulit batang. Senyawa steroid pada mulanya hanya dipertimbangkan terdapat pada hewan saja, tetapi akhir-akhir ini juga ditemukan pada tumbuhan. Ekstraksi dengan pelarut etanol dapat memisahkan senyawa fenolik, steroid, terpenoid, alkaloid dan glikosida (Houghton dan Raman 1998).

Schmidt dan Steinhart (2001) menyatakan bahwa kandungan steroid pada ekstrak polar dan non-polar tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Bangham dan Home (2006) menyatakan bahwa steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat impermeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun, morfologi membran sel berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel rapuh dan lisis.

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C-30 asiklik, yaitu squalene, senyawa ini tidak berwarna, berbentuk kristal, bertitik leleh tinggi, dan bersifat optis aktif (Harborne 2006). Sesuai dengan hasil pengujian, kandungan triterpenoid secara umum banyak terdapat pada ekstrak etanol kulit batang dan akar. Terdeteksinya senyawa tritepenoid diduga disebabkan oleh kemampuan pelarut etanol dalam mengekstrak senyawa yang bersifat polar.

Senyawa kimia aktif yang terdapat pada tanaman merupakan unsur pokok dalam tanaman disebut dengan fitokimia. Fitokimia terdiri dari senyawa metabolit primer dan sekunder. Metabolit sekunder merupakan komponen bioaktif misalnya fenol, flavonoid, saponin, terpenoid, steroid, tannin, dan alkaloid. Sampel yang digunakan untuk pengujian komponen bioaktif secara kuantitatif dipilih berdasarkan nilai rendemen yang paling tinggi (Sudirman et al. 2014).



### 5.1.3. Efektivitas Metode Pengekstraksi

Berdasarkan evaluasi yang dilakukan pada data rendemen pada masing-masing bagian tumbuhan pasak bumi yang terdapat di Lampiran 2 Tabel 5.3. adalah sebagai berikut: Akar yang dimaserasi dengan kloroform (rendemen 9,53%), akar yang direflux dengan metanol (rendemen 9,22%), ranting yang disoklet dengan metanol (rendemen 6,09%), Batang yang direflux dengan metanol (rendemen 4,30%), Daun yang direflux dengan methanol (rendemen 3,87%) dan Kulit yang disoklet dengan pelarut metanol (rendemen 3,37%).

Tabel 5.3. Perbandingan efektivitas metode pengekstraksi pada bagian tumbuhan Pasak Bumi

No.	Bagian Tumbuhan	Metode	Pelarut dan Rendemen yang dihasilkan (%)			
			Metanol	Aseton	Kloroform	Klo-Met
1.	Akar	Masserasi	2,15	0,54	9,53	4,74
		Soxhletasi	4,52	3,31	0,43	1,66
		Reflux	9,22	0,50	0,53	4,16
2.	Batang	Masserasi	1,32	3,27	0,20	2,23
		Soxhletasi	3,45	2,41	0,10	2,83
		Reflux	4,30	1,53	2,55	1,77
3.	Daun	Masserasi	1,67	2,26	1,87	1,99
		Soxhletasi	3,26	1,48	3,25	1,89
		Reflux	3,87	3,28	3,13	1,82
4.	Kulit	Masserasi	1,32	2,49	0,26	1,71
		Soxhletasi	3,37	0,89	0,66	2,57
		Reflux	3,08	1,12	0,85	2,80
5.	Ranting	Masserasi	3,12	0,76	0,28	1,29
		Soxhletasi	6,09	0,96	0,61	0,55
		Reflux	4,22	1,98	0,44	4,24

Pemilihan metode dalam memisahkan suatu senyawa sangat penting untuk diperhatikan dalam proses pemisahan senyawa bioaktif karena sangat menentukan berapa besar rendemen yang akan dihasilkan. Ekstraksi atau pemisahan senyawa kimia dari sumber tanaman merupakan awal proses isolasi senyawa bioaktif yang berada pada tumbuhan, baik pada daun, biji, akar ataupun batang (Sidik, 1997).



Proses pemanasan pada sampel akar tumbuhan pasak bumi secara kuantitatif dapat menyebabkan senyawa terlarut lebih banyak terekstrak dari pada tanpa proses pemanasan. Hal ini disebabkan karena adanya efek panas pada metode refluks yang menyebabkan naiknya energi kinetika pelarut dan komponen-komponen dalam tumbuhan dengan terjadinya peningkatan frekuensi tumbukan diantara keduanya. Tumbukan-tumbukan ini sangat diperlukan untuk mempercepat proses destruksi dinding sel, meningkatkan difusi pelarut kedalam dinding sel dan meningkatkan pelarutan senyawa-senyawa tumbuhan dalam pelarut yang digunakan (Hidayat, 2004). Terdapat perbedaan antara metode refluks dan maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Metode refluks dari segi waktu memiliki efisiensi ekstraksi yang lebih singkat dibandingkan dengan metode maserasi. Proses ekstraksi dengan refluks memerlukan waktu 4 x 2 jam, sedangkan dengan maserasi memerlukan waktu hampir 3 x 24 jam. Kemudian dari segi pelarut yang digunakan, metode maserasi relatif menggunakan pelarut lebih banyak dibandingkan dengan metode refluks.

Pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam (Susanti et al., 2012). Menurut Astarina (2013) metanol merupakan pelarut universal yang memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH<sub>3</sub>) sehingga dapat menarik senyawa - senyawa yang bersifat polar dan nonpolar.

Perbedaan jumlah dan komposisi dari senyawa metabolit sekunder tergantung kepada tipe ekstraksi, waktu ekstraksi, suhu, kondisi alami pelarut, konsentrasi pelarut dan polaritas (Tiwari et al., 2011). Pada penelitian ini dapat dilihat perbedaan polaritas dari pelarut menghasilkan perbedaan jumlah dan jenis senyawa metabolit sekunder yang didapat. Selain itu kandungan senyawa dalam tumbuhan menurut Farnsworth dalam Sari (2013) dapat dipengaruhi beberapa faktor seperti perbedaan iklim, habitat, kondisi nutrisi tanah, dan waktu pemanenan



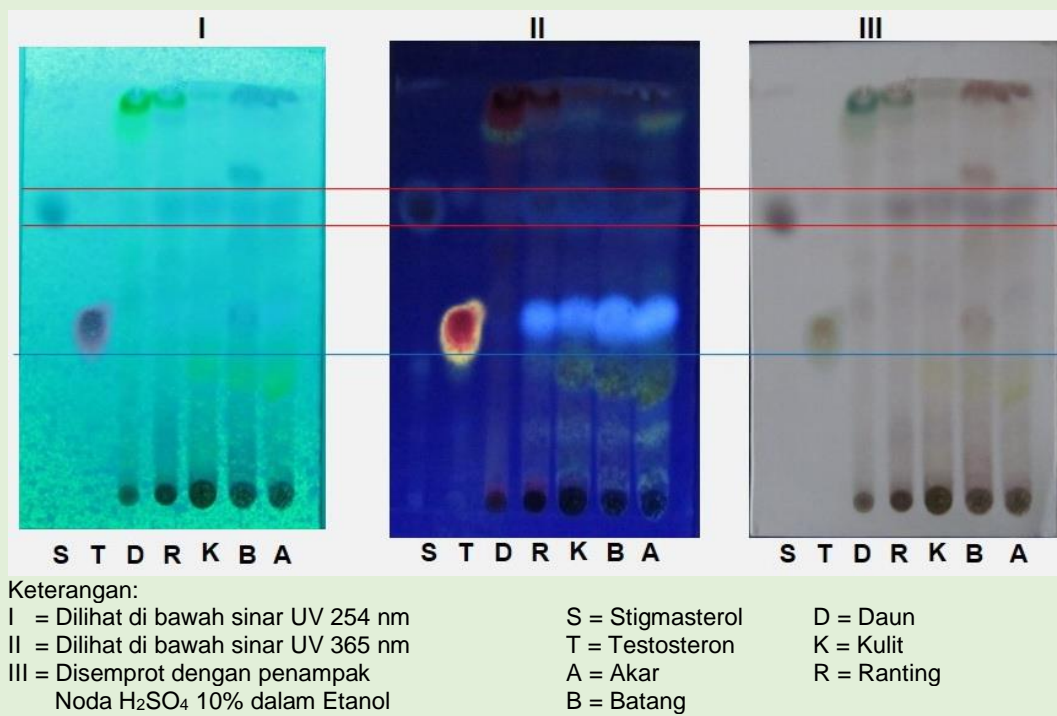
dari tanaman. Kemudian, pemilihan pelarut pada proses ekstraksi dan kondisi pada saat preparasi ekstrak dapat mempengaruhi senyawa yang terkandung dalam ekstrak yang akan diuji.

Proses ekstraksi sampel dilakukan dengan metoda maserasi yaitu tepung akar yang direflux dengan metanol. Pemilihan metoda maserasi ini bertujuan untuk menghindari terjadinya penguraian zat aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan. Hasil maserasi dipisahkan dengan rotary evaporator, ekstrak kental yang diperoleh berwarna hijau pekat dan berbau khas.

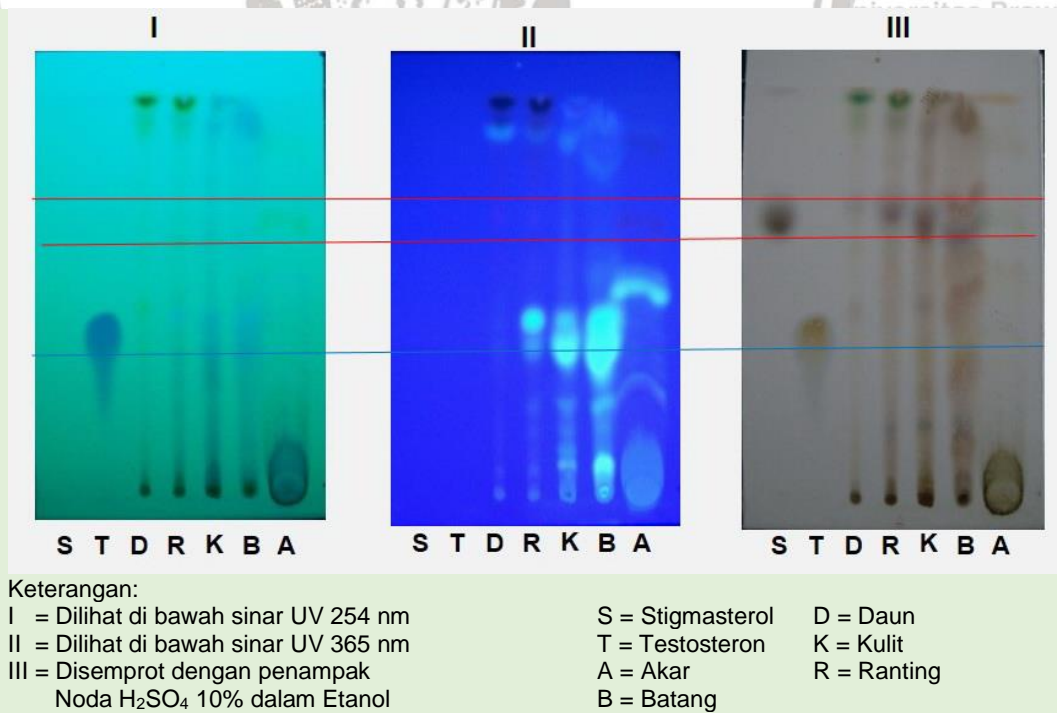
#### **5.1.4. Analisis Kualitatif Testosteron dan Stigmaterol dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Komponen-komponen senyawa kimia yang terkandung didalamnya dipisahkan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Pengamatan dilakukan dibawah lampu UV 254 nm dan UV 366 nm. Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk menganalisis secara kuantitatif keberadaan testosteron dan stigmaterol seperti yang ditunjukkan gambar berikut ini:



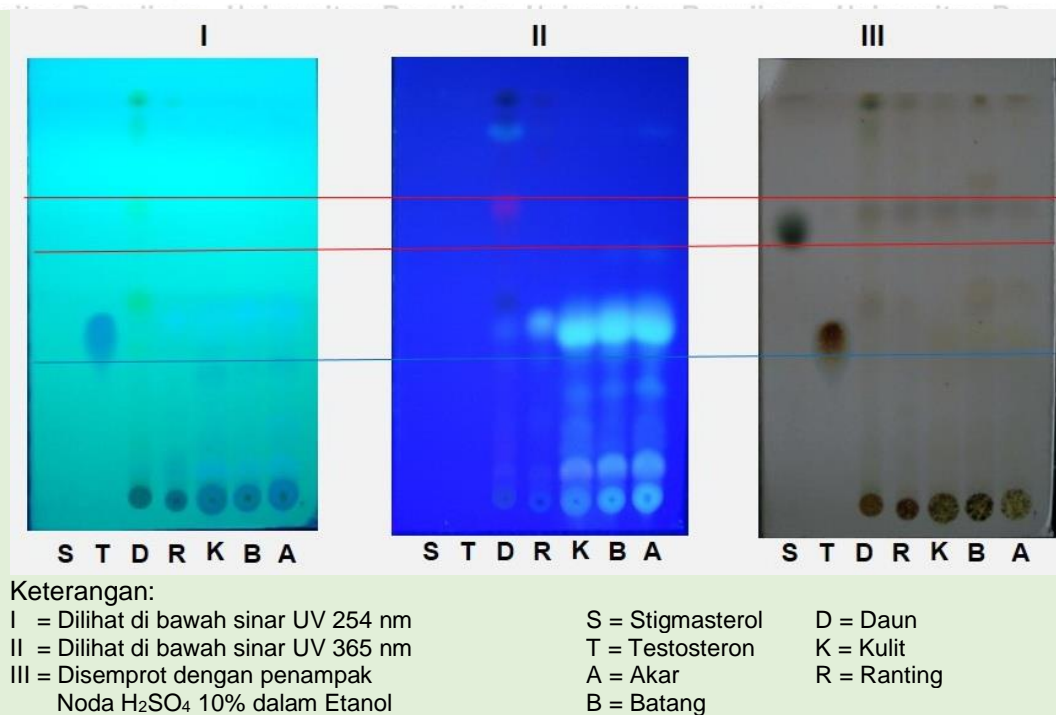


Gambar 5.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak aseton dengan pelarut EtoAC-kloroform (1 : 4) pada konsentrasi 10.000 ppm



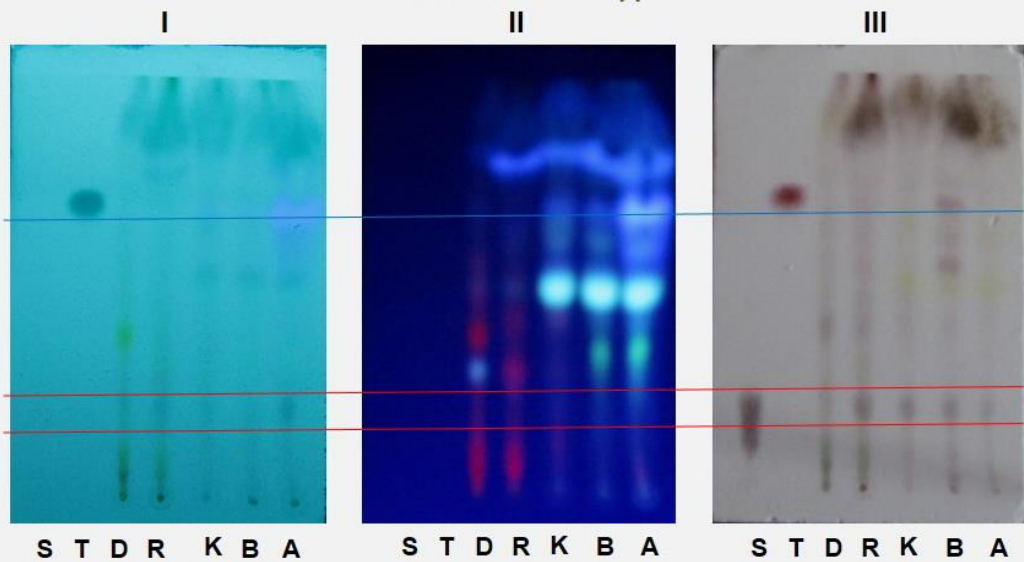
Gambar 5.2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak kloroform dengan pelarut EtoAC-kloroform (1 : 4) pada konsentrasi 10.000 ppm





Gambar 5.3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak metanol dengan pelarut EtoAC-kloroform (1 : 4) pada konsentrasi 10.000 ppm

Berdasarkan hasil analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dari ketiga kromatogram di atas (Gambar 5.1.; Gambar 5.2.; Gambar 5.3. dan Gambar 5.4.) terlihat ada noda yang sejajar antara stigmasterol dengan noda yang terdapat pada bagian ranting, kulit, batang dan akar yang diekstrak dengan menggunakan pelarut metanol, kloroform maupun aseton. Namun, untuk testosteron, tidak terlihat ada noda yang sejajar dengan noda testosteron. Oleh karena itu, dilakukan KLT fasa terbalik dengan menggunakan fasa diam okta desil silan (ODS) untuk memperjelas ada tidaknya noda yang sejajar dengan testosteron. Garis merah: noda yang terlihat memiliki Rf yang sama dengan stigmasterol, Garis biru: noda yang terlihat mendekati Rf yang sama dengan testosteron.



Keterangan:

I = Dilihat di bawah sinar UV 254 nm

II = Dilihat di bawah sinar UV 365 nm

III = Disemprot dengan penampak

Noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% dalam Etanol

S = Stigmasterol

T = Testosteron

A = Akar

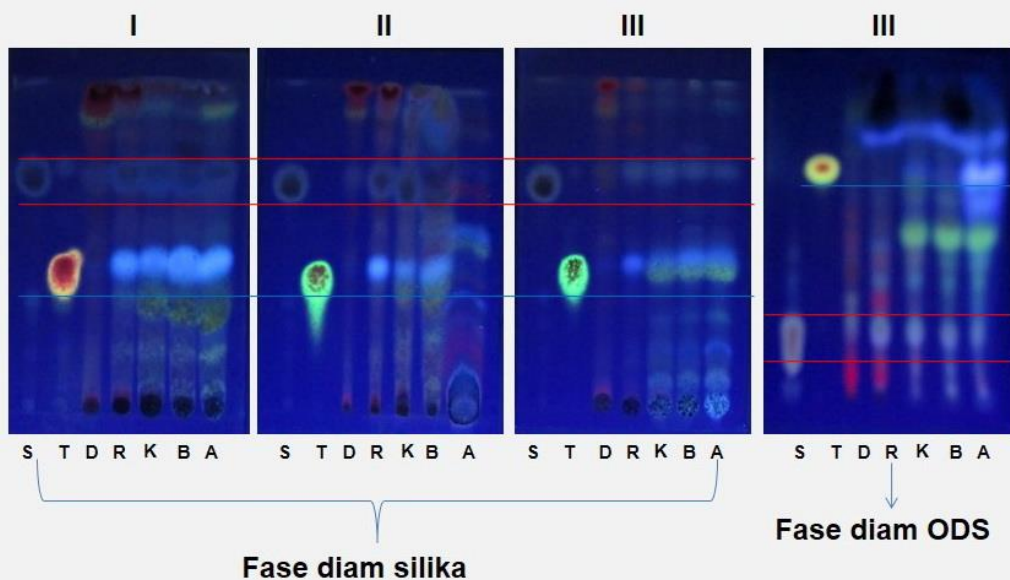
B = Batang

D = Daun

K = Kulit

R = Ranting

Gambar 5.4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak metanol dengan pelarut metanol 100% dengan fase diam ODS pada konsentrasi 10.000 ppm



Keterangan:

I = Pelarut pengekstrak aseton

II = Pelarut pengekstrak kloroform

III = Pelarut pengekstrak metanol

S = Stigmasterol

T = Testosteron

A = Akar

B = Batang

D = Daun

K = Kulit

R = Ranting

Gambar 5.5. Perbandingan kromatogram



Berdasarkan analisis kromatogram ekstrak metanol, kloroform dan aseton dari daun, ranting, kulit, batang dan akar tumbuhan pasak bumi yang dibandingkan terhadap kedua senyawa standar (stigmasterol dan testosteron) dan analisis data ekstrak yang dihasilkan dengan variasi metode ekstraksi (maserasi, sokletasi dan reflux) dan variasi pelarut (metanol, aseton, kloroform, kloroform-metanol (1:1)) (Gambar 5.5.) dapat dijelaskan bahwa:

- a. Dari kedua senyawa target (stigmasterol dan testosteron), hanya stigmasterol yang teridentifikasi, sedangkan testosteron tidak teridentifikasi pada kelima bagian tumbuhan pasak bumi.
- b. Senyawa stigmasterol terdapat pada bagian daun, ranting, kulit, batang dan akar.

## 5.2. Hasil Penelitian Tahap 2.

### 5.2.1. Isolasi Ekstrak Kolom Stigmasterol dari akar tumbuhan Pasak Bumi

Tabel 5.4. isolasi stigmasterol dari akar tumbuhan Pasak Bumi

Kode Sampel	Massa Sampel (g)	m. Ekstrak total (g)	% m.Ekstrak k	m.Ekstra k kolom (g)	Stigmastero I (mg)	% Stigmastero I
I	273	14,0288	5,14	14,0288	86,3	1,34
II	270	13,5789	5,03	13,5789	144,6	1,06
III	290	14,6922	5,07	15,6922	211,3	1,5
IV	262	12,6756	4,46	12,6759	147,9	1,5
<b>Total</b>	<b>1.095</b>	<b>54,98</b>	<b>19,70</b>	<b>55,98</b>	<b>590,10</b>	<b>5,40</b>
<b>Rerata</b>	<b>273,75</b>	<b>13,74</b>	<b>4,93</b>	<b>13,99</b>	<b>147,53</b>	<b>1,35</b>

Lampiran 3. Mengilustrasikan proses pemisahan ekstrak metanol dengan metode kromatografi kolom dan Tabel 5.4. memperlihatkan dari 1.095 gram total sampel tepung akar pasak bumi dihasilkan ekstrak metanol sebanyak 54,98 gram dengan persentase massa ekstrak rata-rata sebesar 4,93 % tepung akar pasak

bumi. Stigmasterol sebanyak 590,1 mg dengan persentase stigmasterol total dalam ekstrak metanol sebesar 5,40 % dan rata-rata persentase stigmasterol dalam akar tumbuhan pasak bumi adalah 1,35 %.

Kromatografi adalah proses pemisahan yang tergantung pada perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Fase diam dapat berupa pembentukan kolom dimana fase gerak dibiarkan untuk mengalir (kromatografi kolom) atau berupa pembentukan lapis tipis dimana fase gerak dibiarkan untuk naik berdasarkan kapilaritas (kromatografi lapis tipis). Hal yang perlu mendapat perhatian senyawa yang berbeda memiliki koefisien partisi yang berbeda antara fase gerak dan diam. Senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui sistem kromatografi. Senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat (Christian, 1994; Skoog, 1993).

Penentuan fase diam dan eluen dengan menggunakan KLT akan diperoleh data berupa spot-spot hasil pemisahan untuk tiap perbandingan eluen petroleum eter dan dietil eter dan penambahan  $MnO_2$  dalam fasa diam, yang selanjutnya hasil pemisahan yang baik akan digunakan dalam pemisahan kromatografi kolom. Pemisahan dengan menggunakan kolom kromatografi akan dihasilkan eluat. Tiap eluat diuji dengan KLT dan menghasilkan nilai  $R_f$  yang kemudian dibandingkan dengan nilai  $R_f$  awal. Fraksi yang sama dikumpulkan dan kemudian dilakukan identifikasi.

Berdasarkan analisis kromatogram ekstrak metanol, kloroform dan aseton dari daun, ranting, kulit, batang dan akar tumbuhan pasak bumi yang dibandingkan terhadap kedua senyawa standar (stigmasterol dan testosteron) dan analisis data ekstrak yang dihasilkan dengan variasi metode ekstraksi (maserasi, sokletasi dan reflux) dan variasi pelarut (metanol, aseton, kloroform, kloroform-metanol (1:1)) dapat dijelaskan bahwa dari kedua senyawa target (stigmasterol dan testosteron),





- b. Muncul puncak pada angka gelombang  $675-995\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-H alkena yang biasanya muncul pada angka gelombang  $3010-3095$  &  $675-995\text{ cm}^{-1}$ .
- c. Muncul puncak pada angka gelombang  $690-900\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-H cincin aromatik yang biasanya muncul pada angka gelombang  $3010-3100$  &  $690-900\text{ cm}^{-1}$ .
- d. Muncul puncak pada angka gelombang  $1050-1300\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-O alcohol/eter/ asam karboksilat/ ester yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- e. Muncul puncak pada angka gelombang  $3200-3600\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus O-H alcohol ikatan hydrogen/ fenol yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- f. Muncul puncak pada angka gelombang  $1500-1600\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C=C cincin aromatik yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- g. Muncul puncak pada angka gelombang  $2100-2260\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C=C alkuna yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- h. Muncul puncak pada angka gelombang  $3300-3500\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus N-H amina/ amida yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- i. Muncul puncak pada angka gelombang  $1300-1370\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus  $\text{NO}_2$  senyawa-senyawa nitro yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.

Interpretasi spektrum inframerah (FTIR) dari stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi (warna merah) pada Lampiran 4 dan Gambar 5.6. dapat dijelaskan sebagai berikut :



- a. Muncul puncak pada angka gelombang 2850-2970 dan 1340-1470  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-H alkana yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- b. Muncul puncak pada angka gelombang 675-995  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-H alkena yang biasanya muncul pada angka gelombang 3010-3095 & 675-995  $\text{cm}^{-1}$ .
- c. Muncul puncak pada angka gelombang 690-900  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-H cincin aromatik yang biasanya muncul pada angka gelombang 3010-3100 & 690-900  $\text{cm}^{-1}$ .
- d. Muncul puncak pada angka gelombang 1050-1300  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-O alcohol/eter/ asam karboksilat/ ester yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- e. Muncul puncak pada angka gelombang 1180-1360  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-N amina/ amida yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- f. Muncul puncak pada angka gelombang 2500-2700  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus O-H asam karboksilat dengan ikatan hydrogen yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- g. Muncul puncak pada angka gelombang 2100-2260  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C=C alkuna yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- h. Muncul puncak pada angka gelombang 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus N-H amina/ amida yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
- i. Muncul puncak pada angka gelombang 1610-1680  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C=C alkena yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.





j. Muncul puncak pada angka gelombang 1690-1760  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C=O alcohol/eter/ asam karboksilat/ ester yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.

Spektroskopi inframerah tertransformasi fourier (*Fourier Transformed Infrared*, FTIR) dapat mengukur secara cepat gugus fungsi tanpa merusak dan mampu menganalisis beberapa komponen secara serentak. Pada dasarnya Spektroskopi FTIR adalah sama dengan spektroskopi IR dispersi, yang membedakannya adalah pengembangan pada sistem optiknya sebelum berkas sinar infra-merah melewati sampel (Rohaeti, 2011).

Fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom dikarakterisasi dengan spektroskopi FTIR. Interpretasi gugus fungsi dapat dilihat dari regangan gugus pada bilangan gelombang tertentu. Penentuan struktur kimia menggunakan spektrometer FTIR menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa steroid dengan gugus fungsi OH, C=C nonkonjugasi, C-O, dan C-H serta memiliki massa molekul  $m/z$  396. Data interpretasi menunjukkan kemiripan dengan senyawa sterol.

### 5.2.3. GC-MS Ekstrak Metanol dan Stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi

Tabel 5.5. Hasil GC-MS Ekstrak metanol Akar tumbuhan Pasak Bumi

Peak	R.time	Corr mak (%)	Total (%)	Faktor Kesesuaian (%)	Nama
1.	16.71	55,88	5,80	53	3-(2-pentenil)-1,2,4-siklopentanetron
2.	20.44	15,65	1,63	98	Metil ester asam palmitat
3.	21.18	100	10,39	99	Asam palmitat
4.	21.82	21,44	2,23	60	4-etoksi-2,5dimetoksibenzaldehida
5.	23.57	14,93	1,55	96	Isofraksidin/6,8-dimetoksi-7-hidroksikumarin
6.	23.68	13,90	1,44	99	Metil ester asam oleat
7.	24.30	12,77	1,33	96	Asam linoleat
8.	24.42	46,04	4,78	99	Asam oleat
9.	24.82	11,21	1,16	97	Asam oktadekanoat
10.	26.32	76,59	7,95	58	4-(5-propil-2-piridinil)-benzonitril
11.	26.45	40,50	4,21	94	Canthine-6-on(3,4-diazafluoranthen-2(3H)-on



Peak	R.time	Corr mak (%)	Total (%)	Faktor Kesesuaian (%)	Nama
12.	29.91	84,77	8,80	64	m-kresol / m-toluol / 3-metilfenol
13.	30.62	18,39	1,91	91	Diisooktilftalat
14.	30.72	67,16	6,98	90	4-fenil-8-oxo-4,5,6,7-tetrahidrosiklopenta (b)-1,2,3-triazolo (4,5-e) piridin
15.	31.05	38,01	3,95	91	2-metil-4,4-difenil-2-imidazolin-5-on
16.	32.60	45,55	4,73	49	Metil ester 1',2-dimetil-asam ferosenkarboksilat
17.	32.81	23,85	2,48	46	Metil ester 4,5-dihidroksi-4-(3-metil-2-butenil) asam benzoate
18.	33.98	8,94	0,93	25	Tidak diketahui
19.	34.12	10,81	1,12	87	3-[(trimetilsilil)oksi]-asetat (17.beta)-estra-1,3,5,(10)-trienn-17-ol
20.	34.42	10,78	1,12	80	5-heptadekatri-9(Z),11 (Z), 14 (Z)-enilresorsinol
21.	36.01	10,79	1,12	99	Piperin
22.	36.16	11,60	1,21	49	Salisilaldehid / beta resorsinaldehid
23.	37.95	11,80	1,23	41	Metilenetanshinkuion
24.	39.56	10,55	1,10	10	Tidak diketahui
25.	40.62	57,52	5,97	64	Stigmasta-5,23-dien-3.beta.-ol
26.	41.41	27,43	2,85	15	Tidak diketahui
27.	41.96	14,70	1,53	18	Tidak diketahui
28.	42.12	11,25	1,17	15	Tidak diketahui
29.	42.48	44,48	4,62	53	Spinasteron
30.	43.45	31,03	3,22	92	Sitostenon / delta.4-sitosterol-3-on
31.	43.88	14,61	1,52	46	aurantiamid

Pengujian melalui GC-MS Ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi pada Lampiran 5 Tabel 5.5. ditemukan 31 jenis senyawa. Persentase kandungan senyawa berkisar antara 0,93% sampai dengan 10,39% dan terdapat 5 jenis senyawa yang tidak diketahui namanya. Kandungan senyawa stigmasterol dalam ekstrak metanol yang di uji sebanyak 5,97%. Jenis steroid lainnya berupa sitosterol sebanyak 3,22%; senyawa spinasteron sebanyak 4,62% dan sebanyak 1,12% senyawa estratriennol.

GC-MS merupakan metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu kromatografi gas (GC) untuk menganalisis jumlah senyawa secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) untuk menganalisis struktur molekul senyawa analit (Fowles, 1998). Gas kromatografi merupakan salah satu teknik spektroskopi yang menggunakan



prinsip pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi komponen-komponen penyusunnya. Gas kromatografi biasa digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa yang terdapat pada campuran gas dan juga menentukan konsentrasi suatu senyawa dalam fase gas (Fowlis, 1998).

Tabel 5.6. Hasil GC-MS Ekstrak Kolom Stigmasterol metanol Akar tumbuhan Pasak Bumi

Peak	R.time	Corr mak (%)	Total (%)	Faktor Kesesuaian (%)	Nama
1.	12.54	5,63	1,85	97	Ohracin / 3,4-dihidro-8-3-metil iso kumarin
2.	20.44	8,23	2,70	99	Metil ester asam palmitat
3.	21.37	26,20	8,60	99	Asam palmitat
4.	23.58	2,33	0,77	99	Metil ester asam 10,13-oktadekadienoat
5.	23.71	9,25	3,04	99	Metil ester asam 9-oktadekenoat
6.	24.17	3,31	1,09	99	Metil ester asam stearat
7.	24.60	20,45	6,71	99	Asam oleat
8.	31.06	2,09	0,69	86	Bisoflex / di (etilheksil) ftalat
9.	39.59	2,72	0,90	22	Tidak diketahui
10.	40.24	40,24	13,21	99	Kampesterol
11.	40.73	100	32,82	99	Stigmasterol
12.	41.51	71,34	23,41	93	Beta sitosterol
13.	42.51	6,14	2,10	99	Spinasteron
14.	43.48	3,87	1,27	95	Sitostenon [ 4 –stigmasten – 3 – on]
15.	45.36	2,91	0,96	86	4-metil-, (4,alfa.)-stimast-22-en-3-on

Berdasarkan data yang disajikan pada Lampiran 5 dan Tabel 5.6. pengujian melalui GC-MS Ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi memperlihatkan ekstrak kolom yang dihasilkan masih belum sepenuhnya senyawa stigmasterol. Sebanyak 15 jenis senyawa yang teridentifikasi. Persentase senyawa Stigmasterol hanya sebesar 32,82%. Senyawa lain yang tergolong tinggi dari jenis steroid adalah Beta sitosterol 23,41% dan Kampesterol sebanyak 13,21%. Jenis steroid lainnya yang teridentifikasi adalah Spinasteron sebesar 2,1%; Sitostenon sebesar 1,27%; Stimasteron sebanyak 0,96% dan terdapat satu senyawa yang tidak teridentifikasi sebesar 0,9%.



Data propiling dari dari hasil pengujian GC-MS ekstrak metanol maupun ekstrak kolom Stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi dapat dilihat pada Lampiran 5.

#### 5.2.4. LC-MS Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi

Tahapan pengujian LC-MS ekstrak metanol dan ekstrak kolom Stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi di sajikan pada Lampiran 6 dan Tabel 5.7. Terdapat masing-masing dua sampel yang dijadikan perhitungannya akhir. Sehingga dari Tabel data nomor 1 dapat dijelaskan bahwa dari sebesar 0,1154 gram ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui faktor pengenceran, perkalian konstanta dari 38,81 ug berat terukur teridentifikasi kadar atau kandungan stigmasterol sebesar 336,27 ug/gram. Demikian juga pada data nomor 2 dapat dijelaskan dari 0,1154 gram ekstrak metanol dari 37,66 ug berat terukur diketahui kadar stigmasterol sebesar 326,39 ug/gram.

Pada data urut nomor 3 dapat dijelaskan dari 0,0349 gram sampel ekstrak kolom Stigmasterol dari 6.318,73 ug berat terukur sambil digunakan teridentifikasi kadar stigmasterol sebesar 181.052,37 ug/gram. Demikian juga seterusnya untuk data urut ke 4.

Tabel 5.7. Perhitungan standar stigmastrol

No.	Nama Sampel	Berat Sampel (g)	AM (Area)	KONS. TKR ( $\mu\text{g/ml}$ )	KONS. THT ( $\mu\text{g/ml}$ )	F. P (ml)	Berat ( $\mu\text{g}$ )	Kadar ( $\mu\text{g/g}$ )
1.	Ekstrak Pasak Bumi	0,1154	54.089,00	0,16	0,16	250,00	38,81	336,27
2.	Ekstrak Pasak Bumi	0,1154	53.573,00	0,15	0,15	250,00	37,66	326,39
3.	Stigmasterol Pasak Bumi	0,0349	322.376,00	2,53	2,53	2.500,00	6.318,73	181.052,37
4.	Stigmasterol Pasak Bumi	0,0349	322.483,00	2,53	2,53	2.500,00	6.321,09	181.120,14

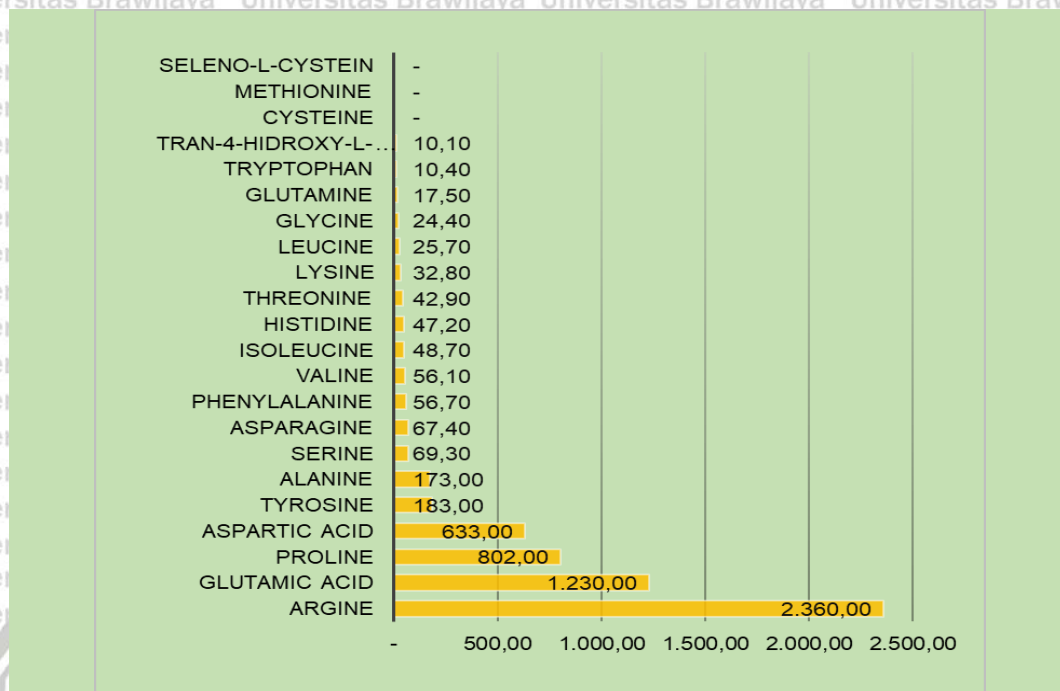
Keterangan : TKR = Terukur; THT = Terhitung, FP = Faktor Pengenceran

Kromatografi cair-spektrometri massa (*Liquid chromatography-mass spectrometry* atau LC-MS) adalah teknik kimia analisis yang merupakan penggabungan dari pemisahan fisik menggunakan kromatografi cair dan deteksi massa molekul dengan spektrometri massa. Keunggulan dari teknik ini adalah spesifisitas dan sensitivitas pengukuran yang dihasilkan sangat tinggi dibandingkan teknik kimia analisis lainnya. LC-MS merupakan teknik untuk menganalisis metabolit sekunder yang memiliki sensitivitas yang lebih tinggi. LC-MS mampu mendeteksi dan mengkarakterisasi suatu molekul yang terkandung dalam suatu sampel. LC-MS didasarkan pada teknik analisis kimia yang mampu menganalisis bobot molekul sampel dan memiliki kekayaan informasi struktural dari senyawa yang terdeteksi (Patel 2011).

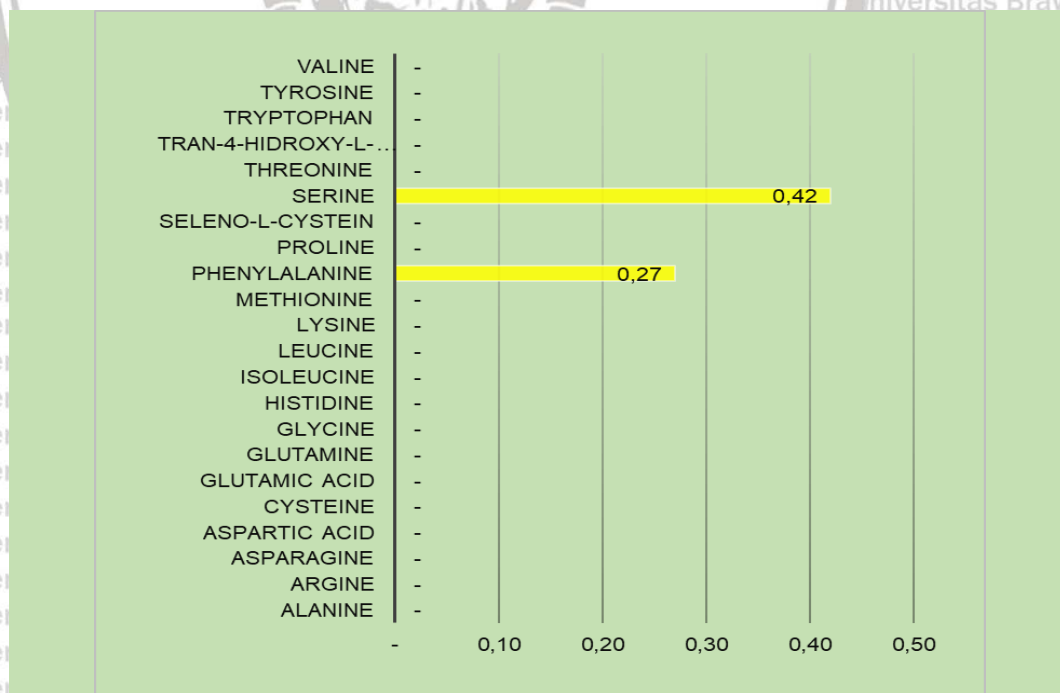
Menurut Theodoridis et al. (2008) LC-MS sering digunakan dalam bidang bionalisis serta dapat menentukan profil metabolit sekunder karena mampu memisahkan senyawa dengan resolusi yang tinggi.



### 5.2.5. LC-MS/MS Asam Amino Bebas Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi



Gambar 5.7. Hasil LC-MS/MS Kandungan Asam Amino Bebas Ekstrak Metanol Akar Tumbuhan Pasak Bumi



Gambar 5.8. Hasil LC-MS/MS Kandungan Asam Amino Bebas Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi

Gambar 5.7. dan Lampiran 7 memperlihatkan bahwa hasil pengujian LC-MS/MS dari 22 jenis asam amino yang di analisis hanya teridentifikasi sebanyak 19 jenis asam amino pada ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi. Jumlah Arginin sebesar 2.360 mg/kg, Asam glutamat sebesar 1.230 mg/kg, Prolin sebesar 802 mg/kg, Asam aspartat 633 mg/kg dan lainnya sementara pada ekstrak kolom Stigmaterol (Gambar 5.8 dan Lampiran 7) hanya teridentifikasi 2 jenis asam amino yaitu Serin sebesar 0,42 mg/kg dan Fenil alanin sebesar 0,27 mg/kg.

Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC/MS-MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometer massa. Data LC-MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu. Senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel-partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak) (Himawan, 2010).

Keuntungan dari LC-MS yaitu dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa termal labil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi, bahkan juga protein. Komponen elusi dari kolom kromatografi kemudian diteruskan ke spektrometer massa melalui antarmuka khusus. Prinsipnya adalah pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya, alatnya terdiri atas kolom (sebagai fasa diam) dan larutan tertentu sebagai fasa geraknya tekanan tinggi digunakan untuk mendorong fasa gerak. Campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolarannya dan kecepatannya untuk sampai ke detektor (waktu retensinya) akan berbeda, hal ini akan teramati pada spektrum yang puncak-puncaknya terpisah (Himawan 2010).

Bantuan pompa fasa gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom



terjadi pemisahan komponen-komponen campuran, karena perbedaan kekuatan interaksi antara larutan terhadap fasa diam. Larutan yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih dulu. Sebaliknya, larutan yang kuat berinteraksi dengan fasa diam maka larutan tersebut akan keluar kolom, kemudian dideteksi oleh detektor dan direkam dalam bentuk kromatogram (Isnawati 2013)

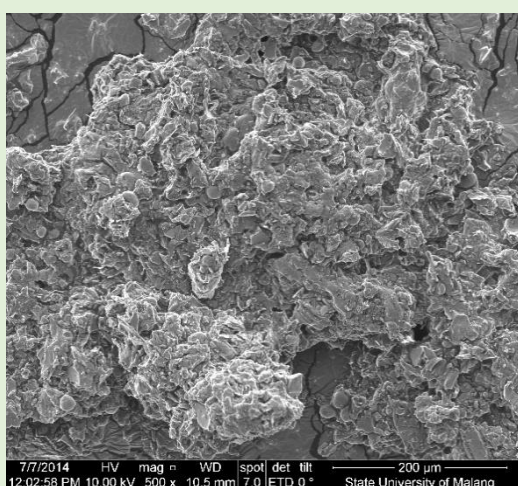
### 5.2.6. Karakterisasi dan Analisa Struktur Nano Menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM) Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi

Analisis SEM digunakan untuk mengidentifikasi morfologi permukaan nanopartikel pada sampel ekstrak yang digunakan yang terlihat melalui sebuah gambar. Gambar yang dihasilkan terbentuk dan ditampilkan dengan menggunakan elektron. Kolom SEM terdiri dari penembak elektron yang menghasilkan elektron dan lensa elektromagnetik yang terhubung dengan sistem kondenser. Tetapi, lensa-lensa ini dioperasikan sedemikian rupa untuk memproduksi berkas elektron yang amat tajam, yang difokuskan pada permukaan sampel.

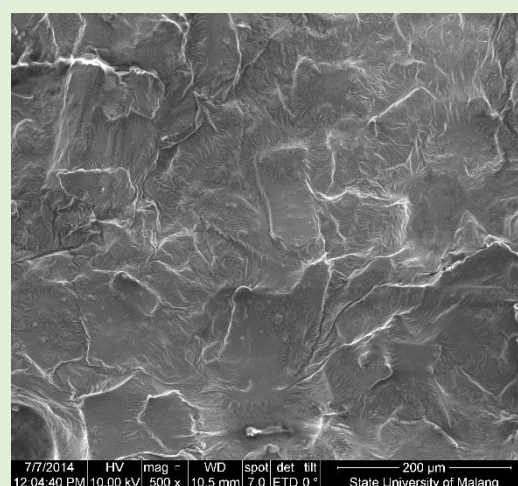
Gambar 5.9. memperlihatkan pembesaran 500 x pada bahan yang digunakan yaitu ekstrak metanol (a) dan ekstrak kolom Stigmasterol Pasak Bumi (b) Stigmasterol Sintetik (c) dan  $17\alpha$ -Metiltestesteron (d). Pada gambar tersebut terlihat partikel-partikel ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi membentuk gumpalan-gumpalan (cluster) dengan struktur polimorf (tidak homogen) dan belum memberikan informasi tentang bentuk dan ukuran partikelnya, bulat – bulat mengumpul dan sebagian terpisah dalam bentuk gumpalan lain (a) ekstrak stigmasterol menyatu dalam satu gumpalan yang sama (b). Partikel  $17\alpha$ -metil testesteron terlihat tersebar merata dengan bentuk dan ukuran partikel yang berada dalam rentang mikron, kurang homogen, ada yang memiliki bentuk



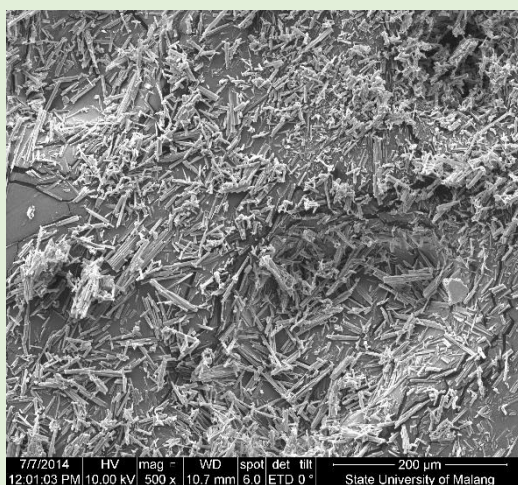
memanjang dan ada yang membentuk struktur kubus (d) sedangkan partikel Stigmasterol sintetik terlihat lebih halus dengan bentuk menyerupai stik-stik panjang (c).



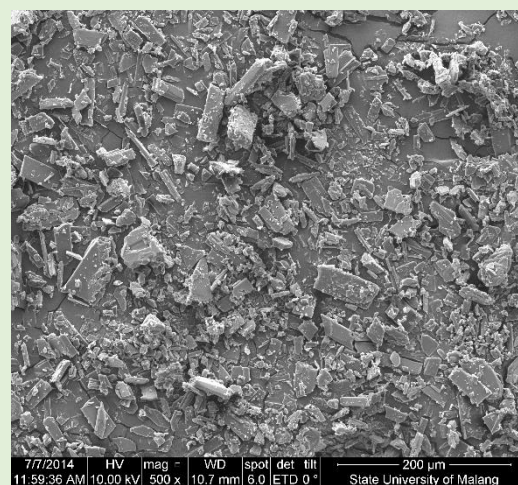
Ekstrak metanol Pasak Bumi (a)



Stigmasterol Pasak Bumi (b)



Stigmasterol  
Produk Sigma S2424-1G (c)



17 $\alpha$ -metilttestesteron  
Produk Aldrich 69240-5G (d)

Gambar 5.9. Karakterisasi dan analisa struktur nano dengan menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) pada Pembesaran 500 X dari bahan larutan yang digunakan untuk maskulinisasi ikan nila

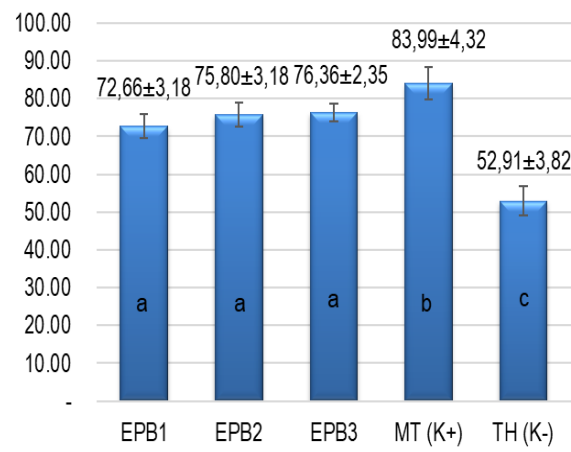


### 5.3. Hasil Penelitian Tahap 3.

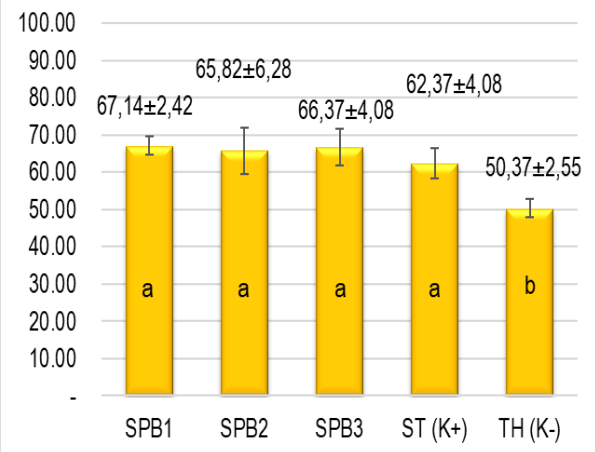
#### 5.3.1. Maskulinisasi Ikan Nila Melalui Perendaman dan Melalui Pakan

##### 5.3.1.1. Nisbah Kelamin

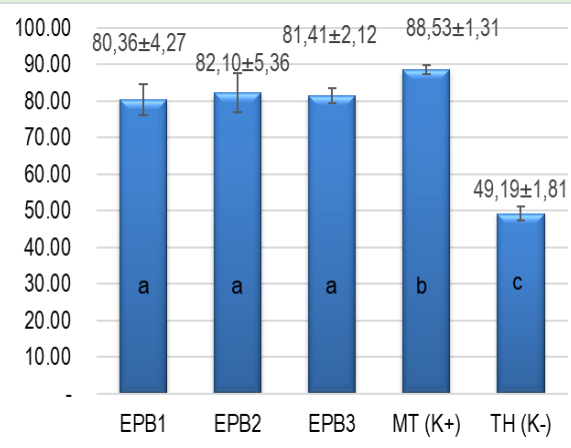
##### a. Persentase (%) Ikan Nila Jantan



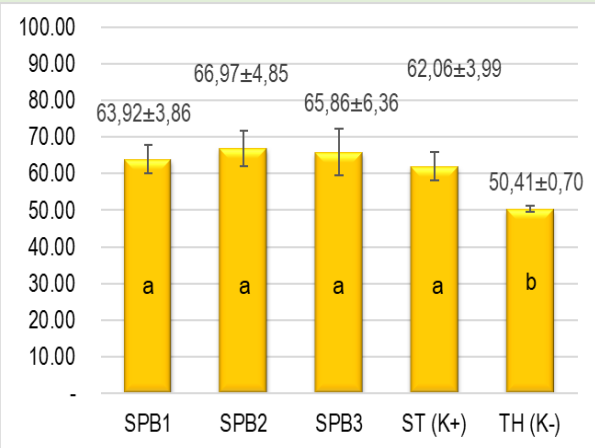
Presentase (%) jantan rata-rata ikan Nila melalui perendaman ekstrak metanol Pasak Bumi (a)



Presentase (%) jantan rata-rata ikan Nila melalui perendaman stigmasterol Pasak Bumi (b)



Presentase (%) Jantan rata-rata Ikan Nila melalui pakan dengan penambahan ekstrak metanol Pasak Bumi (c)



Presentase (%) jantan rata-rata ikan Nila melalui pakan dengan penambahan stigmasterol Pasak Bumi (d)

Gambar 5.10. Persentase (%) Jantan rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Stigmasterol Pasak Bumi

Maskulinisasi ikan nila melalui perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi (EPB) menghasilkan persentase jantan tertinggi pada Kontrol MT(K+) sebesar  $83,99 \pm 3,18\%$ . Kemudian pada EPB3(90mg/l) sebesar  $76,36 \pm 2,35\%$ ; EPB2(60 mg/l) sebesar  $75,80 \pm 3,18\%$ ; EPB1(30 mg/l) sebesar  $72,66 \pm 3,18\%$  dan kontrol TH (K-)  $0 \text{ mg/l}$  sebesar  $52,91 \pm 0,00\%$ . Hasil analisis ANOVA (Lampiran 8) memperlihatkan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui perendaman dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil pengaruh sangat nyata ( $p < 0.05$ ) terhadap persentase (%) Jantan ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan EPB1, EPB2 dan EPB3 masing-masing tidak berbeda nyata tetapi ketiganya berbeda nyata dengan MT (K+) dan tanpa di beri hormon (K-) (Gambar 5.10. a dan Lampiran 8).

Maskulinisasi ikan nila melalui pakan ekstrak metnol pasak bumi (EPB) menghasilkan persentase jantan tertinggi pada Kontrol MT(K+) sebesar  $88,53 \pm 1,31\%$ . Kemudian pada EPB2(60 mg/kg) sebesar  $82,10 \pm 5,36\%$ ; EPB3 (90mg/kg) sebesar  $81,41 \pm 2,12\%$ ; EPB1(30 mg/l) sebesar  $80,36 \pm 4,73\%$  dan kontrol TH (K-) sebesar  $49,19 \pm 1,81\%$ . Hasil analisis ANOVA memperlihatkan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi yang diberikan melalui pakan dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil berpengaruh sangat nyata ( $p < 0.01$ ) terhadap persentase (%) Jantan ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan EPB1, EPB2 dan EPB3 masing-masing tidak berbeda nyata tetapi ketiganya berbeda nyata dengan MT (K+) dan tanpa di beri hormon (K-) (Gambar 5.10.c dan Lampiran 10).

Pemberian ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui perendaman menunjukkan persentasa ikan jantan tertinggi pada SPB1(25mg/l) sebesar  $67,14 \pm 2,42\%$ ; SPB3 (75 mg/l) sebesar  $66,67 \pm 4,96\%$ ; SPB2(50 mg/l) sebesar  $65,82 \pm 6,28\%$ ; Kontrol Positip ST (K+)  $50 \text{ mg/l}$  sebesar  $62,37 \pm 4,08\%$  dan kontrol TH (K-)  $0 \text{ mg/l}$  sebesar  $50,37 \pm 2,55\%$ . Hasil analisis Ragam (ANOVA)



persentase (%) Jantan ikan nila dengan perlakuan melalui perendaman ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil berpengaruh sangat nyata pada taraf 1% terhadap persentase (%) Jantan ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan bahwa persentase (%) ikan jantan memiliki perbedaan yang nyata SPB 1, SPB 2, SPB 3, ST (K+) satu sama lainnya tidak berbeda nyata tetapi keempat perlakuan tersebut berbeda nyata dengan TH (K-). (Gambar 5.10.b dan Lampiran 12).

Ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi yang diberikan melalui pakan menunjukkan hasil persentase ikan jantan tertinggi pada SPB2 (50 mg/l) sebesar  $66,97 \pm 4,85\%$ ; SPB3(75mg/l) sebesar  $65,86 \pm 6,36\%$ ; SPB1(25 mg/l) sebesar  $63,92 \pm 3,86\%$ ; Kontrol Positif ST (K+) 50mg/l sebesar  $62,06 \pm 3,99\%$  dan kontrol TH (K-) 0 mg/l sebesar  $50,41 \pm 0,70\%$ . Hasil analisis Ragam (ANOVA) persentase (%) Jantan ikan nila dengan perlakuan melalui pakan pemberian ekstrak kolom stigmasterol pasak bumi dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil berpengaruh sangat nyata pada taraf 1% terhadap persentase (%) Jantan ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan: Persentase (%) ikan jantan SPB2, SPB3, SPB1, ST(+) masing-masing satu sama lain tidak berbeda nyata namun keempatnya berbeda sangat nyata dengan TH (k-) kontrol negatif. (Gambar 5.10.d dan Lampiran 14).

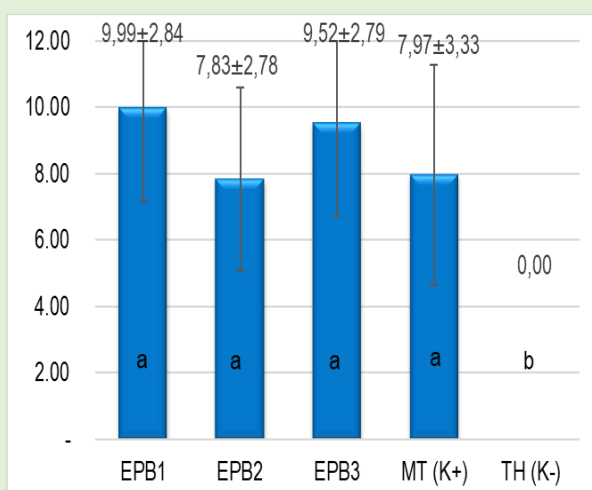
Berdasarkan gambar 5.10. secara keseluruhan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan menghasilkan persentase jantan yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi. Ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi baik rendam maupun lewat pakan menghasilkan angka persentase Jantan yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian ekstra kolom stigmasterol secara rendam maupun melalui pakan. Pemberian MT untuk jantanisasi masih lebih tinggi keberhasilan

persentase jantannya dibandingkan dengan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi maupun ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi.

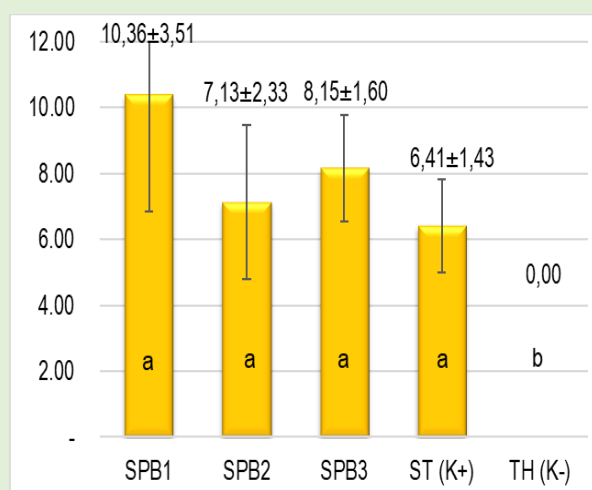
Kenaikan persentase ikan jantan pada perlakuan yang ada diduga dipengaruhi oleh bahan aktif yang terdapat dalam ekstrak akar tumbuhan pasak bumi. Hal ini diduga karena di dalam tanaman pasak bumi terdapat senyawa fitoandrogen berupa stigmasterol. Berdasarkan pada Tabel 5.5. hasil pengukuran GC-MS pada ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi terdapat 31 senyawa kimia, kandungan senyawa stigmasterol sebesar 5,97%. Stigmasterol bekerja merangsang pertumbuhan hormon androgen dalam tubuh. Selain itu, pemeriksaan fitokimia dari ekstrak akar tumbuhan pasak bumi mengandung senyawa saponin, fitosterol, alkaloid, dan oligosakarida. Senyawa saponin steroid merupakan bahan dasar industri pada produksi hormon seks. Berdasarkan senyawa yang terdapat dalam akar tanaman pasak bumi, senyawa stigmasterol dan saponin steroid diduga dapat meningkatkan kualitas dan tingkah laku seksual jantan setelah mengkonsumsinya (Taufiqurrachman 1999).



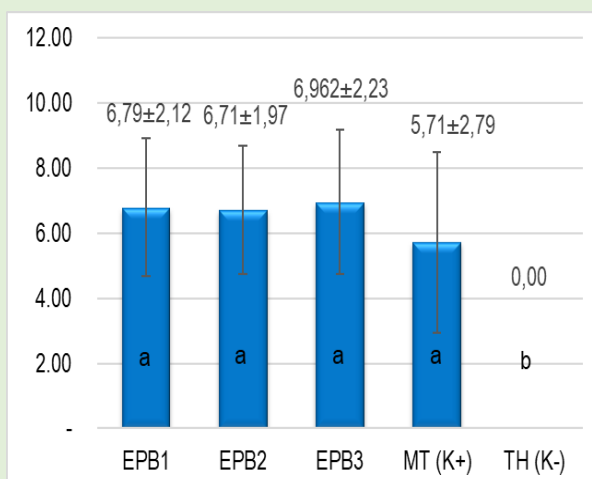
### b. Persentase (%) Ikan Nila Interseks



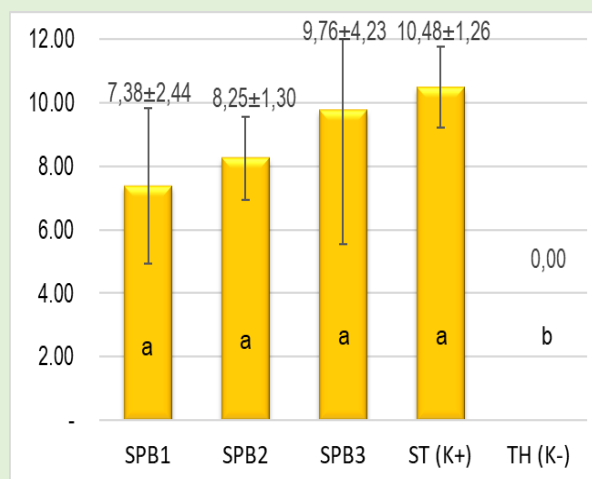
Presentase (%) rata-rata Ikan Nila intersex melalui perendaman ekstrak metanol Pasak Bumi (a)



Presentase (%) rata-rata Ikan Nila intersex melalui perendaman stigmasterol Pasak Bumi (b)



Presentase (%) rata-rata ikan Nila Intersex melalui pakan dengan penambahan ekstrak metanol Pasak Bumi (c)



Presentase (%) rata-rata ikan Nila intersex melalui pakan dengan penambahan stigmasterol Pasak Bumi (d)

Gambar 5.11. Persentase (%) Intersex rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Stigmasterol Pasak Bumi

Ikan Nila interseks tertinggi terdapat pada EPB1 sebesar 9,99±2,84% selanjutnya EPB3 sebesar 9,52±2,78%; kontrol positif MT sebesar 7,97±3,33%; EPB2 sebesar 7,83±2,78% dan kontrol negatif tidak ditemukan ikan yang interseks. Hasil analisis Ragam (ANOVA) terhadap ikan yang interseks (%) dengan

perlakuan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui perendaman dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil berpengaruh nyata pada taraf ( $P < 0,05$ ) terhadap interseks (%) ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan EPB1 (30mg/l) tidak berbeda nyata dengan dengan EPB2 (60mg/l), EPB3 (90mg/l) dan dengan MT(K+) (50 mg/l MT) tetapi keempat perlakuan tersebut berbeda nyata dengan kontrol negatif (K-) (Gambar 5.11.a dan Lampiran 8).

Hasil analisis pemberian ekstrak pasak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan maka Ikan Nila intersex tertinggi terdapat pada EPB3 sebesar  $6,96 \pm 2,23\%$  selanjutnya EPB1 sebesar  $6,79 \pm 2,12\%$ ; EPB2 sebesar  $6,71 \pm 1,97\%$ ; kontrol positif MT sebesar  $5,71 \pm 2,79\%$  dan kontrol negatif tidak ditemukan ikan yang intersex. Hasil analisis Ragam (ANOVA) terhadap ikan yang intersex (%) dengan perlakuan pemberian ekstrak pasak bumi melalui pakan dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil berpengaruh nyata pada taraf ( $P < 0,01$ ) terhadap intersex (%) ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan EPB1 tidak berbeda nyata dengan dengan EPB2, EPB3 dan dengan ST (K+) tetapi keempat perlakuan tersebut berbeda sangat nyata dengan kontrol negatif (K-) (Gambar 5.11.c dan Lampiran 8)

Pemberian ekstrak kolom stigmasterol melalui perendaman menunjukkan persentase intersex tertinggi pada SPB1 sebesar  $10,36 \pm 3,51\%$ ; SPB3 sebesar  $8,15 \pm 1,60\%$ ; SPB2 sebesar  $7,13 \pm 2,33\%$  dan ST (K+) sebesar  $6,41 \pm 1,43\%$  sedangkan pada perlakuan kontrol negatif tidak ditemukan ikan intersex. Hasil analisis Ragam (ANOVA) persentase (%) intersex ikan nila dengan perlakuan melalui perendaman Stigmasterol Pasak Bumi dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil berpengaruh sangat nyata pada taraf 1% terhadap persentase (%) intersex ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan persentase (%) ikan intersex menunjukkan tidak terdapat



perbedaan yang nyata antara SPB1(25mg/l), SPB2(50mg/l), SPB3(75mg/l), dan Stigmasterol Sintetik 50 mg/l (K+) tetapi semuanya berbeda sangat nyata dengan tanpa di beri hormon kontrol negatif (K-) (Gambar 5.11.b dan Lampiran 12)

Ekstrak kolom stigmasterol yang diberikan melalui pakan menunjukkan persentase intersex tertinggi terdapat pada ST (K+) sebesar  $10,48 \pm 1,26\%$ ; SPB3 sebesar  $9,76 \pm 4,23\%$ ; SPB2 sebesar  $8,25 \pm 1,30\%$ ; SPB1 sebesar  $7,38 \pm 2,44\%$  sedangkan pada perlakuan kontrol negatif tidak ditemukan ikan intersex. Hasil analisis Ragam (ANOVA) persentase (%) intersex ikan nila dengan pemberian ekstrak stigmasterol Pasak Bumi melalui pakan dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil berpengaruh sangat nyata pada taraf 1% terhadap persentase (%) intersex ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan persentase (%) ikan intersex menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata antara SPB1(25mg/kg), SPB2(50mg/kg), SPB3(75mg/kg), dan Stigmasterol Sintetik 50mg/kg (K+) tetapi semuanya berbeda sangat nyata dengan tanpa di beri hormon kontrol negatif (K-) (Gambar 20 d dan Lampiran 14).

Gambar 5.11. juga memperlihatkan persentase intersex hampir merata terjadi pada ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi dan ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi baik dengan cara perendaman maupun yang diberikan melalui pakan namun satu yang sama seluruh kontrol negatif tidak menunjukkan fenomena intersex. Kisaran intersex yang terendah terdapat pada pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi melalui pakan sedangkan kisaran tertinggi ikan intersex terjadi pada pemberian ekstrak kolom stigmasterol melalui pakan.

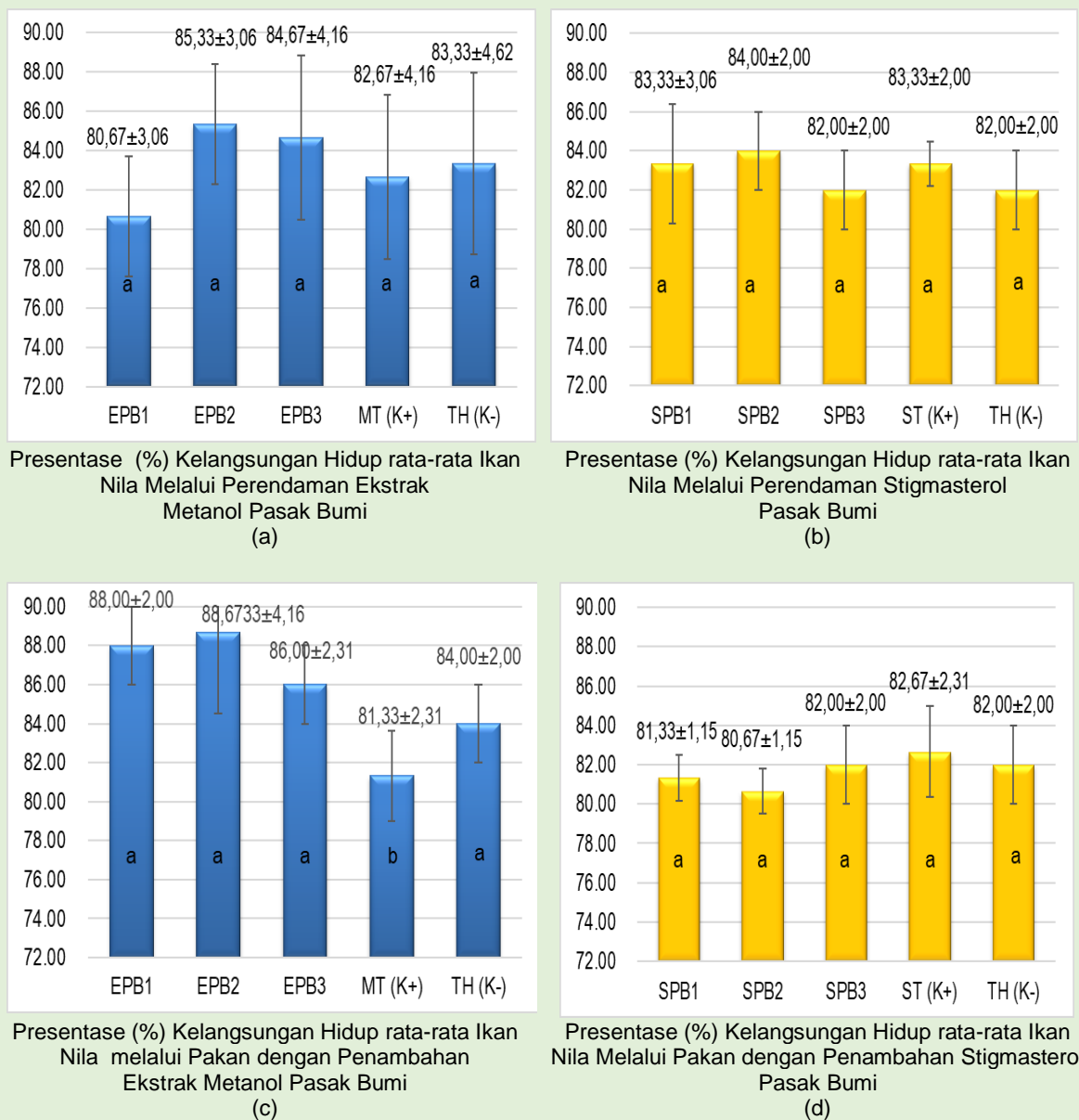
Ikan intersex merupakan individu ikan yang gonadnya mengandung bakal sel jantan (sperma) dan bakal sel telur (ovum). Pada gonad ikan intersex dapat dilihat adanya sel telur dan sel sperma yang umumnya kedua sel tersebut terletak dalam suatu kelompok yang terpisah seperti terlihat pada Gambar 5.15.c. Jika pemberian

dosis terlalu rendah menyebabkan proses sex reversal berlangsung kurang sempurna, namun dosis yang tinggi juga menyebabkan terjadinya intersex (Yamazaki, 1983). Nasrun (1994) melaporkan bahwa, selain menurunkan persentase ikan jantan, penggunaan dosis tinggi testosteron menyebabkan terbentuknya ikan Intersex sebesar 2,3%. Nasrun (1994) menjelaskan bahwa penyimpangan ini mungkin akibat konversi testosteron menjadi estrogen akibat tingginya dosis androgen yang diterima ikan.





### 5.3.1.2. Kelangsungan Hidup (%) Ikan Nila



Gambar 5.12. Persentase (%) Kelangsungan Hidup rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Stigmasterol Pasak Bumi

Kelangsungan hidup ikan Nila di akhir percobaan yang telah melalui proses perendaman dengan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi menunjukkan kelangsungan hidup tertinggi pada EPB2(60mg/l) sebesar 85,33±3,05% dan selanjutnya pada EPB3(90mg/l) sebesar 84,67±4,16%; kontrol negatif 0 mg/l

TH(K-) sebesar  $83,33 \pm 4,62\%$ ; kontrol positif 50 mg/l MT(K+) sebesar  $82,67 \pm 4,16\%$  dan EPB1(30 mg/l) sebesar  $80,67 \pm 3,06\%$ . Hasil analisis Ragam (ANOVA) terhadap kelangsungan hidup ikan nila dengan perlakuan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui perendaman dengan dosis yang berbeda menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap kelangsungan hidup ikan Nila. Kelangsungan hidup ikan Nila di akhir percobaan (Gambar 5.12.a dan lampiran 9).

Ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi yang diberikan melewati pakan menunjukkan kelangsungan hidup tertinggi pada EPB2(60mg/kg) sebesar  $88,67 \pm 4,16\%$  dan selanjutnya pada EPB1(30mg/kg) sebesar  $88,00 \pm 2,00\%$ ; EPB3(90mg/kg) sebesar  $86,00 \pm 2,00\%$ ; kontrol negatif 0 mg/kg TH(K-) sebesar  $84,00 \pm 2,00\%$  dan kontrol positif 50 MT mg/kg (K+) sebesar  $81,33 \pm 2,31\%$ . Hasil analisis Ragam (ANOVA) terhadap kelangsungan hidup ikan nila dengan perlakuan pemberian ekstrak pasak bumi melalui pakan dengan dosis yang berbeda menunjukkan hasil berpengaruh nyata pada taraf ( $P < 0,05$ ) terhadap kelangsungan hidup ikan nila. Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan EPB1(30mg/kg) tidak berbeda nyata dengan EPB2(60mg/kg), EPB3(90mg/kg) dan dengan kontrol negatif 0 mg/kg TH(K-) tetapi keempat perlakuan tersebut berbeda sangat nyata dengan kontrol positif 50 MT(k+) (Gambar 5.12.c Lampiran 11).

Pemberian ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi dengan perendaman menunjukkan kelangsungan hidup tertinggi pada SPB2(50mg/l) sebesar  $88,67 \pm 4,16\%$  dan selanjutnya pada SPB1(25mg/l) sebesar  $88,00 \pm 2,00\%$ ; SPB3(75mg/l) sebesar  $86,00 \pm 2,00\%$ ; kontrol negatif 0 mg/l TH(K-) sebesar  $84,00 \pm 2,00\%$  dan kontrol positif 50 mg/l ST(K+) sebesar  $81,33 \pm 2,31\%$ . Hasil analisis Ragam (ANOVA) terhadap kelangsungan hidup ikan nila dengan perlakuan pemberian ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui



perendaman dengan dosis yang berbeda menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) terhadap kelangsungan hidup ikan Nila. di akhir percobaan (Gambar 5.12.b dan lampiran 13).

Ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi yang diberikan melalui pakan menunjukkan kelangsungan hidup tertinggi justru terjadi pada kontrol positif 50 mg/kg ST(K+) sebesar  $82,67\pm 2,31\%$  selanjutnya pada kontrol negatif 0 mg/kg TH(K-) sebesar  $82,00\pm 2,00\%$  dan SPB3(75mg/kg) sebesar  $82,00\pm 2,00\%$ ; SPB1 (25mg/kg) sebesar  $81,33\pm 1,15\%$  dan yang terakhir SPB2 (50mg/kg) sebesar  $80,67\pm 1,15\%$ . Hasil analisis ragam (ANOVA) terhadap kelangsungan hidup ikan nila dengan perlakuan pemberian ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan dengan dosis yang berbeda menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) terhadap kelangsungan hidup ikan Nila. di akhir percobaan (Gambar 5.12.d Lampiran 15).

Berdasarkan gambar 5.12.d. secara keseluruhan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi baik melalui perendaman maupun lewat pakan menunjukkan kisaran nilai kelangsungan hidup yang lebih tinggi dibandingkan pemberian ekstrak kolom stigmasterol yang diberikan lewat perendaman maupun melalui percampuran dengan pakan.

Hal ini sesuai dengan hasil pengukuran LC-MS/MS pada Gambar 5.7 yang memperlihatkan, berbagai macam asam amino yaitu: alanin, argin, asparagin, aspartic acid, glutamic acid, glutamin, glycin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, fenilalanin, proline, serin, threoni, tran-4-proline, triptopan, tyrosine dan valin. Asam amino arginin, histidin, leusin, glutamat, glisin, prolin, serin dan tirosin sangat berguna dalam pembentukan hormon androgen yaitu testosteron yang berperan dalam peningkatan libido maupun pembentukan spermatozoa.

Menurut Hafez et al. (2000), asam amino sebagai salah satu suplemen yang menstimulasi pembentukan hormon steroid diantaranya testosteron dan

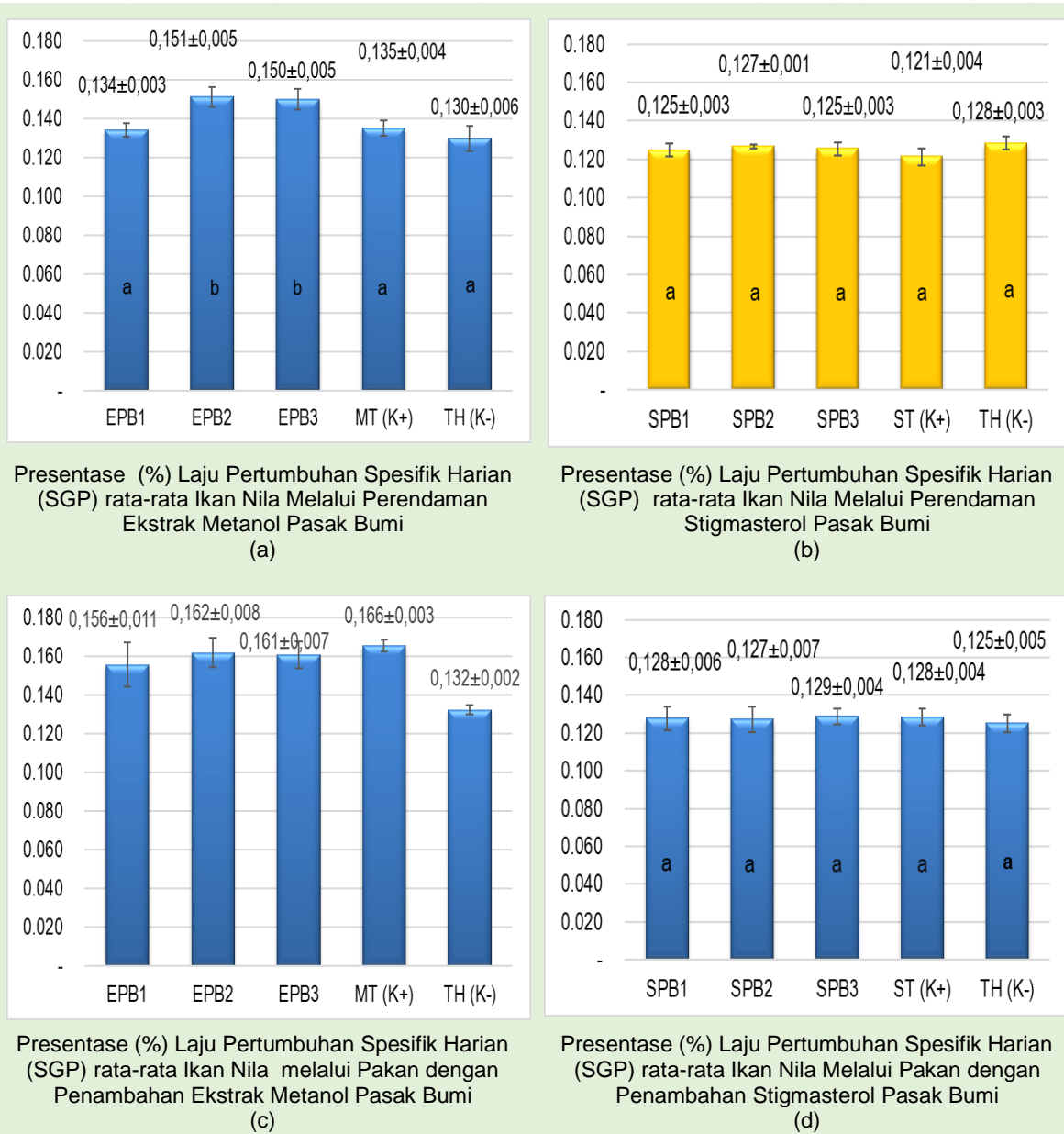
menstimulasi spermatogenesis. Fullerton (1980) menjelaskan bahwa, selain mempunyai sifat androgenik, testosteron ternyata mempunyai sifat anabolik, yaitu dapat memacu pertumbuhan otot. Perlakuan 60 mg/L dan 90 mg/L memperlihatkan keragaan pertumbuhan yang lebih baik dan lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini sejalan dengan Phelps & Popma (2000) yang menyatakan bahwa hormon androgen mempunyai dua aksi fisiologis yaitu bersifat androgenik, yang mendorong karakter jantan, dan bersifat yang anabolik yaitu hormon androgen menstimulasi biosintesis protein di dalam tubuh ikan.





### 5.3.1.3. Pertumbuhan Ikan Nila

#### a. Pertumbuhan Spesifik Harian



Gambar 5.13. Persentase (%) Laju Pertumbuhan Spesifik rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Pasak Bumi

Pertumbuhan spesifik harian pada ikan nila yang mengalami perendaman menggunakan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi memperlihatkan laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada EPB2(60mg/l) sebesar  $0,151\pm 0,005\%$ /hari, EPB3(90mg/l) sebesar  $0,150\pm 0,005\%$ /hari, kontrol positif 50 mg/l MT(K+) sebesar  $0,135\pm 0,004\%$ /hari, EPB1(30 mg/l) sebesar  $0,134\pm 0,01\%$ /hari dan kontrol negatif tanpa hormon TH(K-) sebesar  $0,130\pm 0,006\%$ /hari. Hasil analisis Ragam (ANOVA) menyatakan pengaruh yang nyata ( $P<0,05$ ) baik terhadap pertumbuhan spesifik harian maupun pertumbuhan mutlak rata-rata ikan Nila dan Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan EPB2(60 mg/l) tidak berbeda dengan EPB3(90 mg/l) tetapi keduanya berbeda dengan EPB1(30 mg/l), Kontrol positif 50 mg/l MT(K+) dan kontrol negatif TH (K-) (Gambar 5.13.a dan Lampiran 9).

Pertumbuhan spesifik harian pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan memperlihatkan laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada kontrol positif 50 mg/kg MT (K+) sebesar  $0,17\pm 0,003\%$ /hari disusul EPB1(30mg/kg) sebesar  $0,16\pm 0,011\%$ /hari, EPB2(60mg/kg) sebesar  $0,16\pm 0,008\%$ /hari, EPB3(90mg/kg) sebesar  $0,007\pm 0,01\%$ /hari dan kontrol negatif sebesar  $0,13\pm 0,002\%$ /hari. Hasil analisis Ragam (ANOVA) menyatakan perlakuan yang diberikan berpengaruh sangat nyata ( $P<0,01$ ) terhadap pertumbuhan spesifik harian rata-rata ikan Nila dan hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan 50mg/kg MT(K+), EPB1(30mg/kg), EPB2(60mg/kg), EPB3(90mg/kg) tidak berbeda nyata tetapi keempat perlakuan tersebut berbeda sangat nyata dengan kontrol negatif tanpa hormon (k-) (Gambar 5.13.c dan Lampiran 11).

Perendaman ikan nila dengan mempergunakan ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi terhadap respon laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada kontrol negatif tanpa hormon TH(-) sebesar  $0,128\pm 0,003\%$ /hari, SPB2(50mg/l) sebesar  $0,127\pm 0,001\%$ /hari, SPB3(75mg/l) sebesar



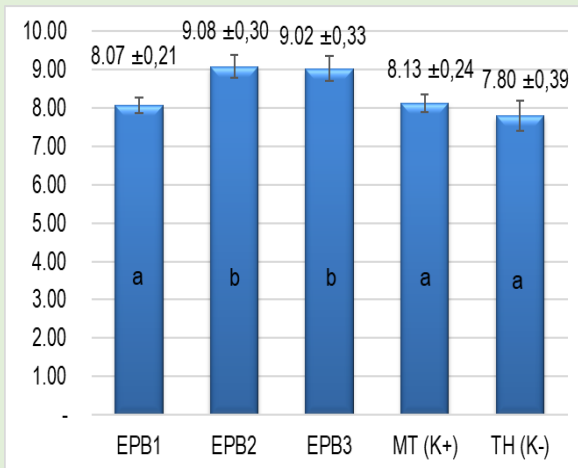
0,125±0,004%/hari, SPB1 (25mg/l) sebesar 0,125±0,003%/hari dan kontrol positif 0mg/kg ST(K+) sebesar 0,121±0,004%/hari. Hasil analisis Ragam (ANOVA) menyatakan pengaruh yang tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) terhadap pertumbuhan spesifik harian (Gambar 5.13.b dan Lampiran 13).

Pertumbuhan spesifik harian pemberian ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan memperlihatkan laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada SPB3 (75mg/kg) sebesar 0,129±0,0004%/hari, kontrol positif 50 mg/kg ST(K+) sebesar 0,128±0,004%/hari, SPB1(25mg/kg) sebesar 0,128±0,006%/hari, SPB2(50mg/kg) sebesar 0,127±0,007%/hari dan kontrol negatif 0 mg/kg ST (K-) sebesar 0,125±0,005%/hari. Hasil analisis Ragam (ANOVA) menunjukkan perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh nyata ( $P>0,05$ ) terhadap pertumbuhan spesifik harian rata-rata ikan Nila (Gambar 5.13.d dan Lampiran 15).

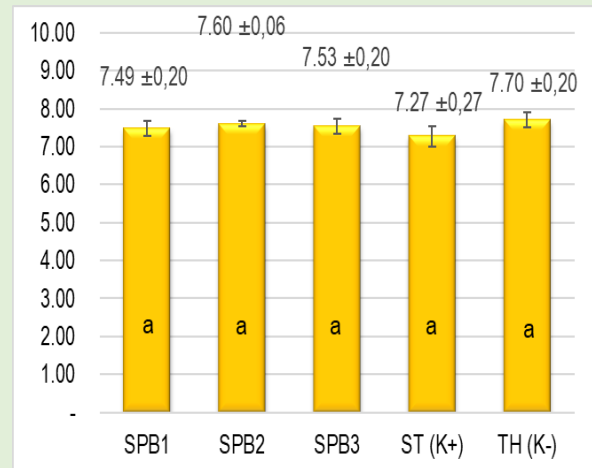
Specific Growth Rate (SGR) atau Laju pertumbuhan harian pertumbuhan (SGP) diartikan sebagai perubahan ikan dalam berat, ukuran, maupun volume seiring dengan perubahan waktu. Pertumbuhan ikan dipengaruhi oleh faktor internal dan eksternal.

Gambar 5.13 memperlihatkan ekstrak metanol akar tumbuhan yang diberikan lewat pakan laju pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan metode perendaman menggunakan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi. Ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi baik diberikan melalui proses perendaman maupun melalui pakan memperlihatkan laju pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak kolom stigmasterol yang diberikan melalui perendaman dan yang melalui pakan.

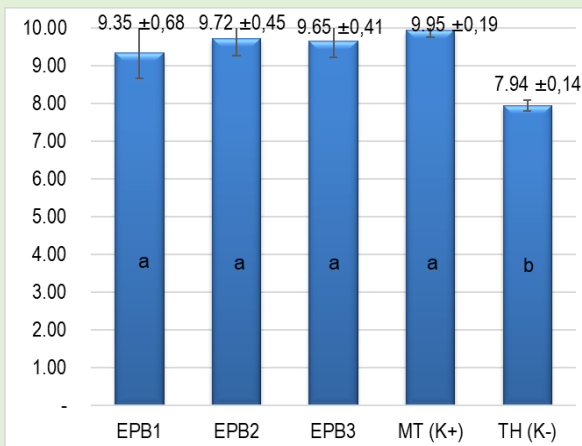
### b. Pertumbuhan Mutlak



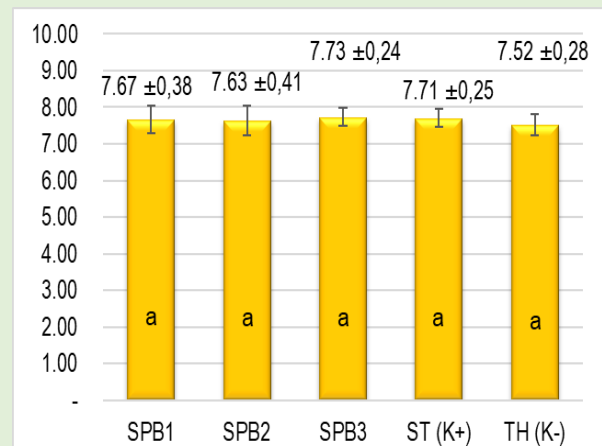
Pertambahan Berat (gram) atau Pertumbuhan Mutlak rata-rata Ikan Nila Melalui Perendaman Ekstrak Metanol Pasak Bumi (a)



Pertambahan Berat (gram) atau Pertumbuhan Mutlak rata-rata Ikan Nila Melalui Perendaman Stigmasterol Pasak Bumi (b)



Pertambahan Berat (gram) atau Pertumbuhan Mutlak rata-rata Ikan Nila melalui Pakan dengan Penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi (c)



Pertambahan Berat (gram) atau Pertumbuhan Mutlak rata-rata Ikan Nila Melalui Pakan dengan Penambahan Stigmasterol Pasak Bumi (d)

Gambar 5.14. Pertambahan Berat (gram) atau Pertumbuhan Mutlak rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi dan Stigmasterol Pasak Bumi



Pertumbuhan mutlak (GR) adalah pertambahan berat ikan setiap harinya selama pemeliharaan. Pertambahan mutlak ditunjukkan dalam satuan gram.

Pengamatan pertumbuhan mutlak pada ikan nila yang diberikan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi memperlihatkan pertambahan berat tertinggi terjadi pada EPB2(60mg/l) sebesar  $9,08 \pm 0,21$  gram, EPB3(90mg/l) sebesar  $9,08 \pm 0,30$  gram, kontrol positif 50 mg/l MT(K+) sebesar  $8,13 \pm 0,24$  gram, EPB1(30 mg/l) sebesar  $8,07 \pm 0,21$  gram dan kontrol negatif tanpa hormon TH(K-) sebesar  $7,80 \pm 0,39$  gram. Hasil analisis Ragam (ANOVA) menyatakan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) baik terhadap pertambahan berat atau pertumbuhan mutlak rata-rata ikan Nila dan Hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan EPB2(60 mg/l) tidak berbeda dengan EPB3(90 mg/l) tetapi keduanya berbeda dengan EPB1(30 mg/l), Kontrol positif 50 mg/l MT(K+) dan kontrol negatif TH(K-) (Gambar 5.14.a dan Lampiran 9).

Pertumbuhan mutlak rata-rata ikan nila yang diberikan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan memperlihatkan laju pertumbuhan tertinggi terjadi pada kontrol positif 50 mg/kg MT (K+) sebesar  $9,95 \pm 0,19$  gram disusul EPB2(60mg/kg) sebesar  $9,72 \pm 0,45$  gram, EPB3(90mg/kg) sebesar  $9,65 \pm 0,008$  gram, EPB1(30mg/kg) sebesar  $9,35 \pm 0,68$  gram dan kontrol negatif sebesar  $7,94 \pm 0,14$  gram. Hasil analisis Ragam (ANOVA) menyatakan perlakuan yang diberikan berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap pertumbuhan mutlak atau pertambahan berat rata-rata ikan Nila dan hasil analisis lanjut menggunakan uji Duncan memperlihatkan 50mg/kg MT(K+), EPB1(30mg/kg), EPB2(60mg/kg), EPB3(90mg/kg) tidak berbeda nyata tetapi keempat perlakuan tersebut berbeda sangat nyata dengan kontrol negatif tanpa hormon (k-) (Gambar 5.14.c dan Lampiran 11).

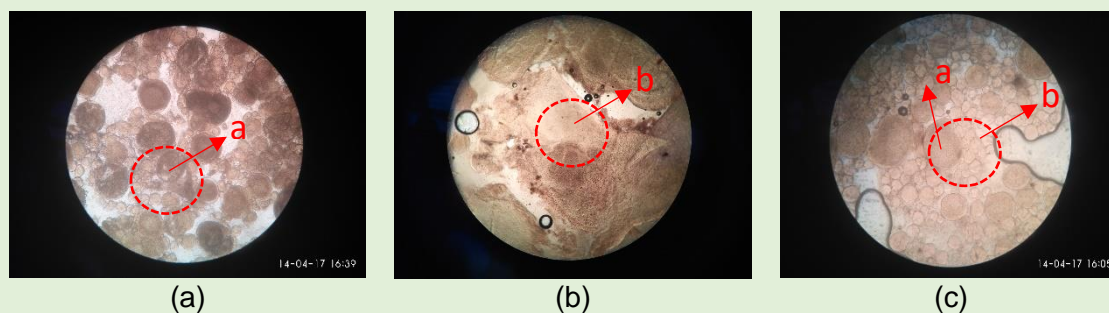
Ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi yang diberikan melalui mekanisme perendaman terhadap pertumbuhan mutlak atau pertambahan

berat terjadi pada kontrol negatif tanpa hormon TH(-) sebesar  $7,70 \pm 0,20\%$ /hari, SPB2(50mg/l) sebesar  $7,60 \pm 0,06$  gram, SPB3(75mg/l) sebesar  $7,53 \pm 0,20$  gram, SPB1(25mg/l) sebesar  $7,49 \pm 0,20$  gram dan kontrol positif ST(K+) sebesar  $7,27 \pm 0,27$  gram. Hasil analisis Ragam (ANOVA) ekstrak kolom stigmasterol yang diberikan melalui proses perendaman ternyata tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap pertumbuhan mutlak atau penambahan berat (Gambar 5.14.b dan Lampiran 13).

Pertumbuhan mutlak atau penambahan berat pemberian ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan memperlihatkan laju penambahan berat tertinggi terjadi pada SPB3 (75mg/kg) sebesar  $7,73 \pm 0,28$  gram, kontrol positif 50 mg/kg ST(K+) sebesar  $7,71 \pm 0,025$  gram, SPB1(25mg/kg) sebesar  $7,67 \pm 0,38$  gram, SPB2(50mg/kg) sebesar  $7,63 \pm 0,41$  gram dan kontrol negatif 0 mg/kg ST (K-) sebesar  $7,52 \pm 0,28$  gram. Hasil analisis Ragam (ANOVA) menunjukkan perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap pertumbuhan spesifik harian rata-rata ikan Nila (Gambar 5.14.d dan Lampiran 15).

### 5.3.2. Gambaran Histologi Gonad Ikan Nila

#### 5.3.2.1. Pewarnaan Asetokarmin



Gambar 5.15. Jaringan gonad ikan nila umur 60 hari dengan pewarnaan asetokarmin; (a) gonad betina dengan sel telur, (b) gonad jantan dengan sel sperma, dan (c) gonad interseks (memiliki sel telur dan sel sperma).

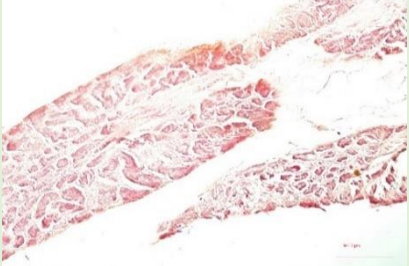
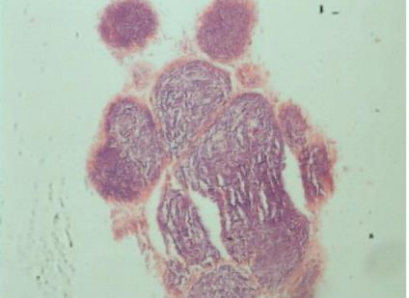
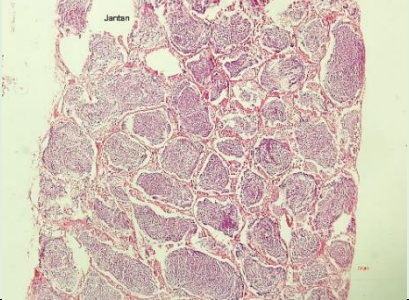
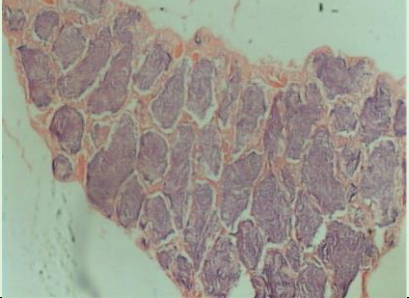
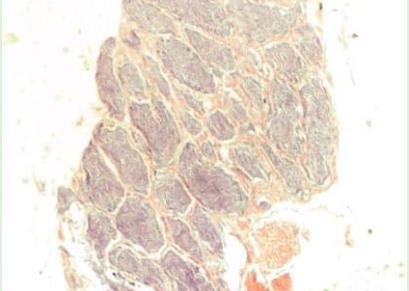


Gonad ikan nila berjumlah sepasang, terletak di dalam rongga perut, dibawah vertebrae dan dibatasi oleh selaput tipis. Gonad ini terbentuk memanjang dan bermuara di lubang pengeluaran sperma atau telur. Gonad pada ikan muda mempunyai ukuran yang sangat kecil menyerupai benang tipis, sedangkan pada ikan yang telah mengalami perkembangan gonad lebih lanjut, gonadnya berukuran besar, berwarna putih menyerupai lemak.

Pengamatan jaringan gonad dengan menggunakan teknik pewarnaan asetokarmin seperti yang ditampilkan pada Gambar 5.15. memperlihatkan bahwa pada perlakuan yang diberikan ditemukan gonad betina normal, gonad jantan normal dan gonad yang intersex. Melalui pengamatan mikroskopis dengan perbesaran 40 x dapat dilihat perbedaan antara bakal telur, jaringan testis dan bakal sel sperma. Pada jaringan gonad jantan terlihat bakal sperma yang berukuran sangat kecil sehingga hanya terlihat berupa bintik merah atau titik-titik kecil yang menyebar merata (Gambar 5.15.b). Sedangkan pada pengamatan jaringan gonad betina, terlihat sel telur yang berbentuk bulat dan memiliki ukuran seragam serta jauh lebih besar dibandingkan dengan bakal sperma dengan inti berada ditengahnya, mengelilingi sel telur (Gambar 5.15.a). Pada gonad ikan intersex dapat dilihat adanya sel telur dan sel sperma yang umumnya kedua sel tersebut terletak dalam suatu kelompok yang terpisah seperti terlihat pada (Gambar 5.15.c).

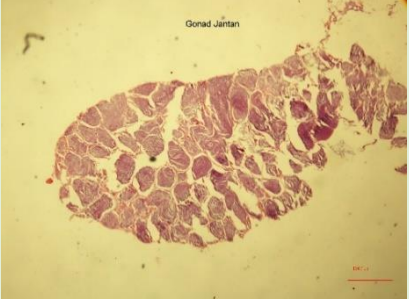
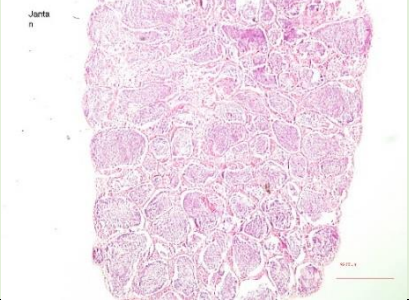
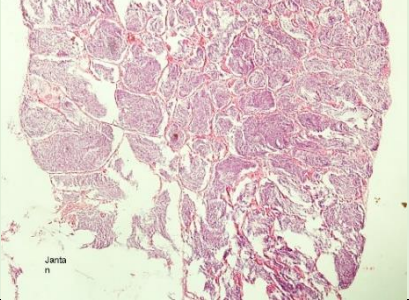
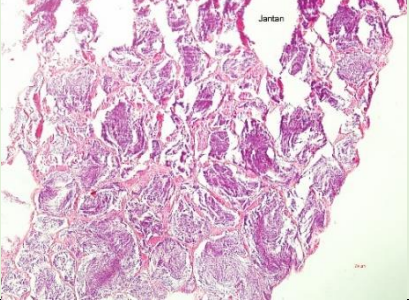
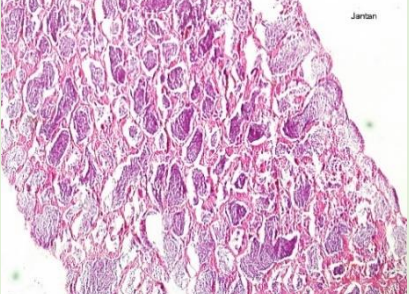
### 5.3.2.2. Histologi Pewarnaan Gonad dengan Hematoksilin-eosin (HE)

Tabel 5.8. Histologi gonad ikan Nila 60 hari setelah perlakuan perendaman dalam ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi.

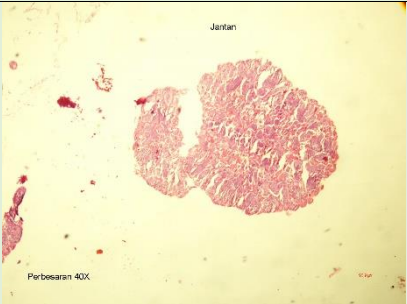
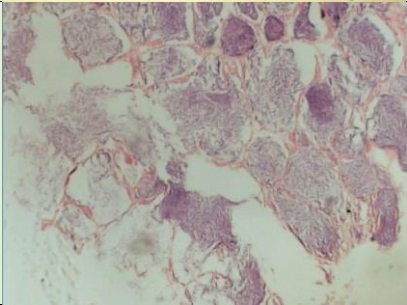
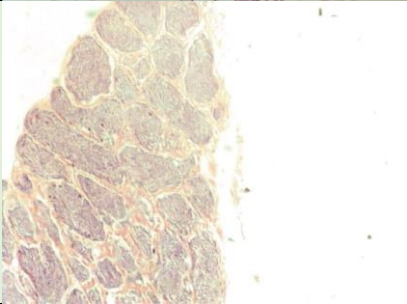
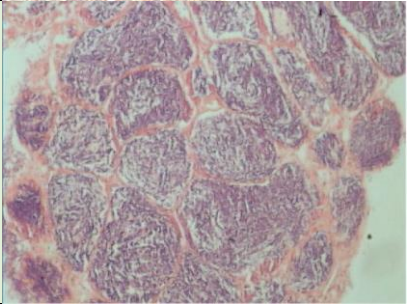
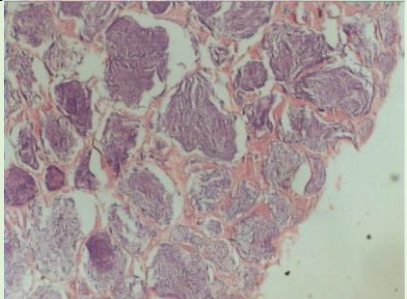
Perlakuan	Gonad ikan Hari ke-60
Kontrol Negatif TH(K-) 0 mg/l	
Kontrol Positif MT(K+) 50 mg MT/l	
EPB1 30 mg/l	
EPB2 60 mg/l	
EPB3 90 mg/l	



Tabel 5.9. Histologi gonad ikan Nila 60 hari setelah perlakuan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi melalui pakan.

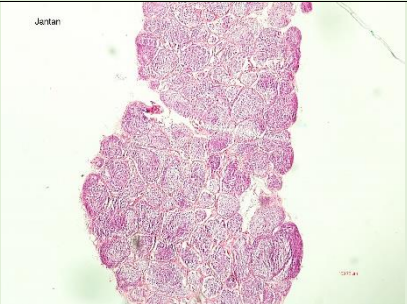
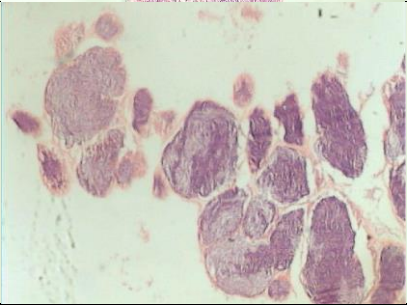
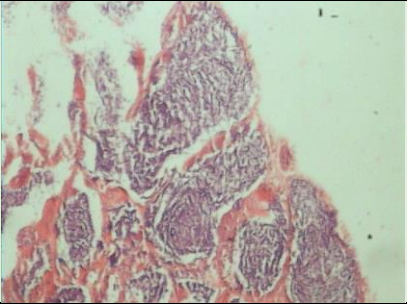
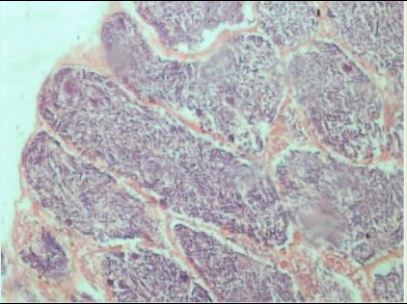
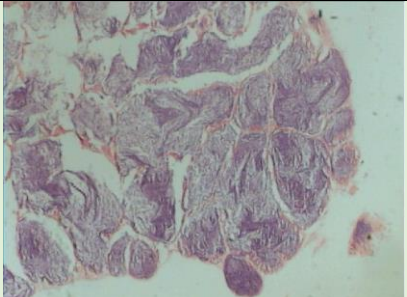
Perlakuan	Gonad ikan Hari ke-60
Kontrol Negatif TH(K-) 0 mg/Kg Pakan	
Kontrol MT (K+) 50 mg MT/kg Pakan	
EPB1 30 mg/kg pakan	
EPB2 60 mg/kg pakan	
EPB3 90 mg/kg pakan	

Tabel 510. Histologi gonad ikan Nila 60 hari setelah perlakuan perendaman dalam ekstrak kolom Stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi.

Perlakuan	Gonad ikan Hari ke-60
Kontrol Negatif TH(K-) 0 mg/l	
Kontrol Postip ST(K+) 50 mg ST/l	
SPB1 25 mg/l	
SPB2 50 mg/l	
SPB3 75 mg/l	



Tabel 5.11. Histologi gonad ikan Nila 60 hari setelah perlakuan pemberian ekstrak kolom Stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi melalui pakan.

Perlakuan	Gonad ikan Hari ke-60
Kontrol Negatif TH(K-) 0 mg/Kg Pakan	
Kontrol Positif ST (K+) 50 mg ST/kg Pakan	
SPB1 25 mg/kg pakan	
SPB2 50 mg/kg pakan	
SPB3 75 mg/kg pakan	

Hasil histologi gonad ikan Nila yang diberi perlakuan dengan berbagai tingkatan dosis ekstrak metanol akar tanaman pasak bumi yaitu 30 mg, 60 mg dan 90 mg disertai dengan perlakuan kontrol negatif 0 mg dan kontrol positif MT 50 mg baik melewati proses perendaman maupun melalui pakan pada pengamatan pemeliharaan pada hari ke 60 memperlihatkan gonad yang sudah mulai berkembang (Tabel 5.9. dan Tabel 5.10).

Hal serupa juga terjadi pada hasil histologi gonad ikan Nila yang diberi perlakuan dengan ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi dengan dosis sebesar 25 mg, 50 mg dan 750 mg disertai dengan perlakuan kontrol negatif 0 mg dan kontrol positif Stigmastrol Sintetik 50 mg baik dengan cara perendaman atau melalui pakan pada pengamatan pemeliharaan pada hari ke 60 memperlihatkan gonad yang sudah mulai berkembang (Tabel 5.11. dan Tabel 5.12).

Gambaran histologi pada semua perlakuan yang ada menunjukkan adanya perkembangan pada diameter *tubulus seminiferus* gonad ikan Nila, dari keseluruhan gambar perlakuan yang menerima hormon, perkembangan diameter terlihat lebih cepat dibandingkan dengan tanpa hormon atau perlakuan kontrol negatif. Fungsi tubulus seminiferus ialah sebagai tempat memproduksi spermatozoa atau gamet jantan (spermatogenesis). Pada ikan jantan Tubulus seminiferus adalah organ seks yang terdapat di dalam gonad, proses meiosis pada ikan jantan terjadi pada tubulus seminiferus yang terdiri dari jaringan berbentuk tabung yang dilapisi dengan jenis sel yang dikenal sebagai sel Sertoli kolumnar yang dikelilingi oleh sel-sel spermatogenik pada epitel interior dan sel batang pada eksterior.

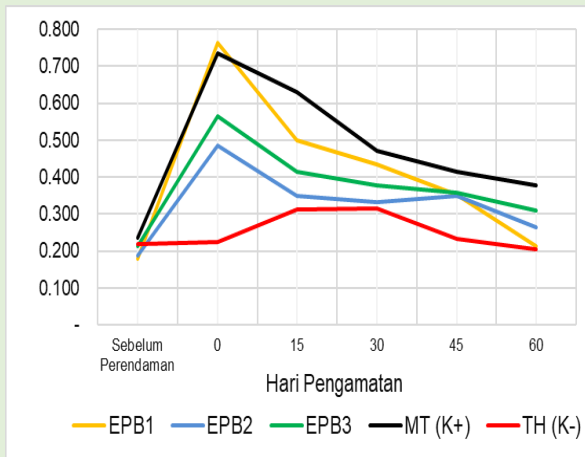
Menurut Yamazaki (1983) hormon androgen merangsang proses pembentukan gonad. Sehingga diduga senyawa stigmasterol yang menyerupai hormon androgen mempengaruhi proses diferensiasi gonad ikan nila.



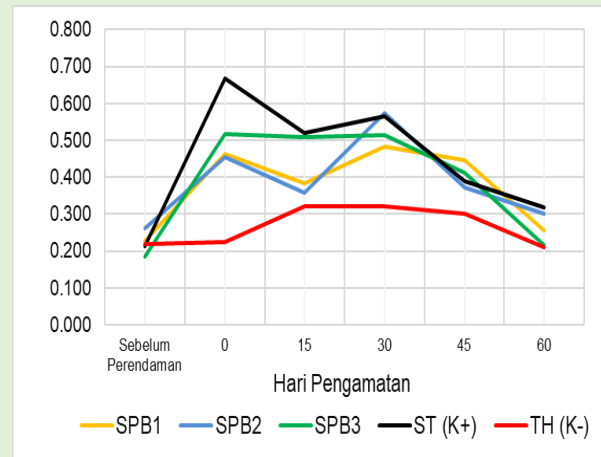
Menurut Sukmaningsih et al. (2011), waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikan setiap langkah perkembangan sel spermatogenik berbeda, oleh karena itu akan terjadi berbagai bentuk kombinasi sel dari berbagai jenis perkembangan sel-sel germinal di dalam tubulus seminiferus. Selain penyesuaian lama daur spermatogenesis, perbedaan tersebut diduga juga disebabkan karena terdapat faktor lain yang mempengaruhi perkembangan gonad yaitu faktor lingkungan ataupun hormon.

Penelitian yang dilakukan oleh Triwahyudi dan purwoko (2010) memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak *Eurycoma longifolia* dapat meningkatkan diameter tubulus seminiferus pada mencit Balb/C jantan yang stres, menjadi lebih tinggi dari keadaan fisiologis tanpa stres. Pemberian ekstrak *Eurycoma longifolia* dengan dosis 5 mg/hari dan 10 mg/hari pada mencit Balb/C jantan dapat memberikan efek peningkatan diameter tubulus seminiferus, sedangkan pemberian dengan dosis 20 mg/hari memberikan efek toksik pada mencit. Secara umum dapat dinyatakan bahwa efek kerja *Eurycoma longifolia* pada testis mencit Balb/C tidak dipengaruhi oleh kondisi stres.

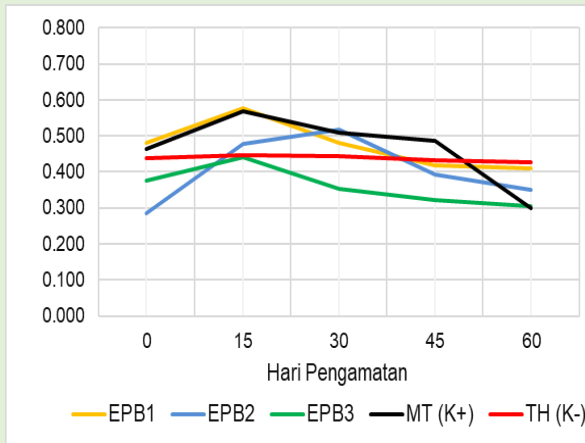
5.3.3. Profil Hormon Testosteron Ikan Nila



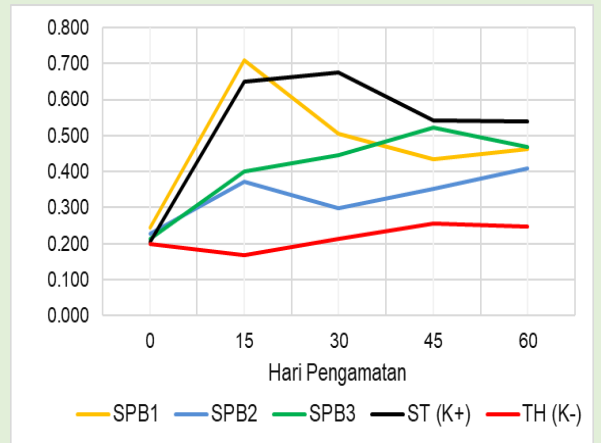
Testosteron dalam Tubuh (pg/ml) Rata-rata Ikan Nila Melalui Perendaman Ekstrak Metanol Pasak Bumi (a)



Testosteron dalam Tubuh (pg/ml) Rata-rata Ikan Nila Melalui Perendaman Ekstrak Kolom stigmasterol Pasak Bumi (b)



Testosteron dalam Tubuh (pg/ml) Rata-rata Ikan Nila yang diberikan Melalui Pakan Ekstrak Metanol Pasak Bumi (c)



Testosteron dalam Tubuh (pg/ml) Rata-rata Ikan Nila yang diberikan Melalui Pakan Ekstrak Ekstrak Kolom Stigmasterol Pasak Bumi (d)

Gambar 5.16. Testosteron dalam tubuh (pg/ml) rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol dan Ekstrak kolom Stigmasterol Pasak Bumi

Melalui metode ELIZA diketahui konsentrasi testosteron dalam tubuh larva ikan sebelum perendaman dengan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi adalah 0,178 – 0,235 pg/ml. Setelah perendaman sesuai perlakuan nilai testoteron EPB1(30mg/l), EPB2(60mg/l), EPB3(90mg/l) dan Kontrol positif 50 mg/l MT(K+)



melonjak dengan kisaran nilai 0,487 – 0,764 pg/ml, sedangkan pada kontrol negatif terdapat kenaikan dari semula 0,218 pg/ml menjadi 0,225 pg/ml.

Selanjutnya pada hari ke 15, hari ke 30, hari ke 45 dan hari ke-60 perlakuan EPB1(30mg/l), EPB2(60mg/l), EPB3(90mg/l) dan Kontrol positif 50 mg/l MT(K+) mengalami penurunan kandungan testosteron di dalam tubuh ikan nila sedangkan pada kontrol negatif terjadi sedikit kenaikan kadar testosteron dari hari ke 15 hingga hari ke 30 dan menurun dari hari ke 45 hingga hari ke 60 dengan kisaran nilai yang sangat sempit (Gambar 5.16.a).

Sebelum dilakukan pemberian ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi melalui pencampuran bahan pakan kandungan testosteron dalam tubuh ikan nila berkisar antara 0,286 pg/ml – 0,480 pg/ml (0 hari). Selanjutnya pada hari ke-15 terjadi peningkatan dengan kisaran nilai 0,442 pg/ml – 0,576 pg/ml dan mengalami penurunan dengan nilai yang bervariasi dari masing-masing perlakuan dari hari ke-30, hari ke-45 dan hari ke-60 (Gambar 5.16.c).

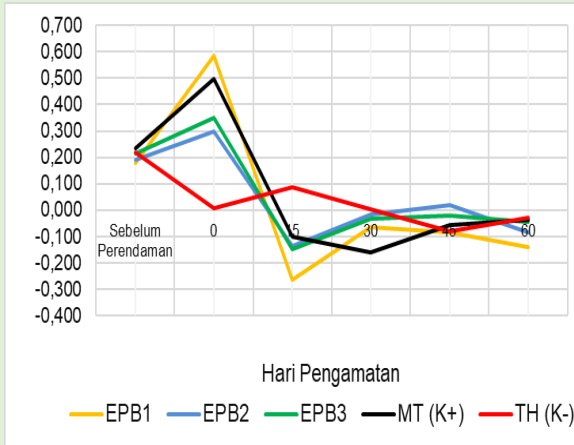
Sebelum di mulai perendaman ikan nila dengan menggunakan ekstrak kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi kandungan testosteron pada ikan nila 0,185 – 0,261 pg/ml. Setelah perendaman (hari ke-0) sesuai perlakuan nilai kandungan testoteron SPB1(25mg/l), SPB2(50mg/l), SPB3(75mg/l) dan kontrol positif 50 mg/l ST(K+) melonjak dengan kisaran nilai 0,223 – 0,667 pg/ml, sedangkan pada kontrol negatif terdapat kenaikan dari semula 0,218 pg/ml menjadi 0,223 pg/ml. Pada hari ke-15 semuanya mengalami penurunan kecuali kontrol negatif (K-) yang mengalami peningkatan menurun dengan perlahan mulai hari ke-15, hari ke-30, hari ke-45 dan merosot dengan tajam di hari ke-45 menuju hari ke-60. kandungan testoteron SPB1(25mg/l), SPB2(50mg/l) dan kontrol positif 50 mg/l ST(K+) dari hari ke-15 meningkat hingga hari ke-30 kemudian menurun secara tajam dari hari ke-30, hari ke-45 hingga ke-60 (Gambar 5.16.b).



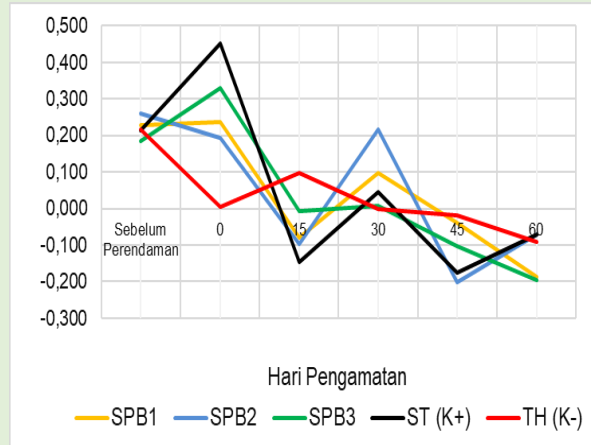
Kandungan testosteron dalam tubuh ikan sebelum dilaksanakan percobaan pemberian pakan yang dicampur dengan ekstrak kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi berkisar antara 0,185 – 0,261 pg/ml. Setelah perendaman (hari ke-0) kandungan testosteron SPB1(25mg/kg), SPB2(50mg/kg), SPB3(75mg/kg) dan kontrol positif 50 mg/l ST(K+) melonjak dengan kisaran nilai 0,372 pg/ml – 0,710 pg/ml, sedangkan pada kontrol negatif TH(K-) malah menurun hingga hari ke 15 kemudian meningkat secara perlahan dari hari ke-15, hari ke-30 hingga hari ke-45 selanjutnya kandungan testosteron menurun secara perlahan dari hari ke-45 hingga hari ke-60. Dari hari ke-15 hingga hari ke-60 SPB1(25mg/kg), SPB2(50mg/kg), SPB3(75mg/kg) dan kontrol positif 50 mg/l ST(K+) memiliki kecenderungan yang berbeda-beda ada yang mengalami penurunan dan ada pula yang mengalami peningkatan kandungan testosteron di hari ke-60 tersebut (Gambar 5.16.d).

Gambar 25 jika dilihat secara keseluruhan baik pemberian ekstrak metanol dan ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi baik melewati proses perendaman maupun diberikan bersama pakan memiliki kesamaan. Semua ikan nila yang digunakan telah memiliki testosteron alamiah di dalam tubuhnya yang terlihat dari data ikan yang digunakan sebelum perendaman dan sebelum pemberian pakan memperlihatkan keberadaan hormon testosteron di dalam tubuhnya (dalam skala ukur pg/ml). Selain kontrol negatif, puncak peningkatan testosteron umumnya terjadi pada hari ke-15 setelah pelaksanaan percobaan dilakukan.

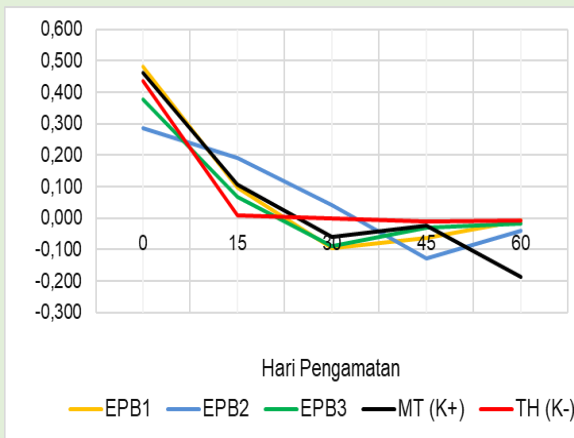




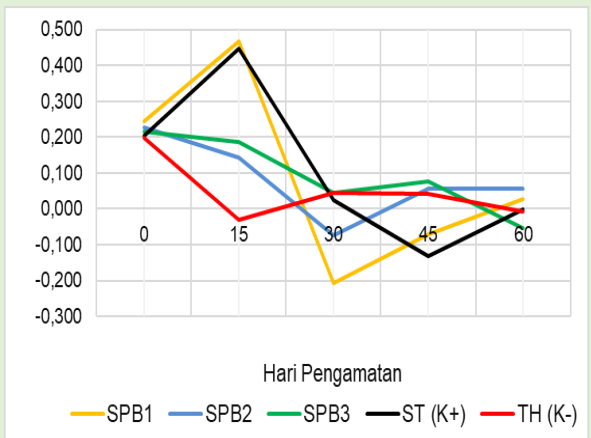
Dinamika peningkatan dan penurunan Hormon Testosteron dalam Tubuh (pg/ml) Rata-rata Ikan Nila Melalui Perendaman Ekstrak Metanol Pasak Bumi (a)



Dinamika peningkatan dan penurunan Hormon Testosteron dalam Tubuh (pg/ml) Rata-rata Ikan Nila Melalui Perendaman Ekstrak Kolom stigmasterol Pasak Bumi (b)



Dinamika peningkatan dan penurunan Hormon Testosteron dalam Tubuh (pg/ml) Rata-rata Ikan Nila yang diberikan Melalui Pakan Ekstrak Metanol Pasak Bumi (c)



Dinamika peningkatan dan penurunan Hormon Testosteron dalam Tubuh (pg/ml) Rata-rata Ikan Nila yang diberikan Melalui Pakan Ekstrak Ekstrak Kolom Stigmasterol Pasak Bumi (d)

Gambar 5.17. Dinamika peningkatan dan penurunan Hormon Testosteron dalam tubuh (pg/ml) rata-rata ikan Nila melalui perendaman dan melalui pemberian pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol dan Ekstrak kolom Stigmasterol Pasak Bumi

Gambar 5.17. memperlihatkan penurunan dan peningkatan kandungan testosteron dalam tubuh ikan nila yang diberikan ekstrak metanol dan ekstrak kolom stigmasterol akar tanaman tumbuhan pasak bumi melalui metode perendaman dan melalui campuran bahan pakan. Dinamika melalui perendaman

memiliki kemiripan yaitu lonjakan kandungan hormon testosteron yang membentuk dua puncak yang tidak sama tingginya selama masa pengamatan. Puncak yang pertama dan tertinggi umumnya terjadi di hari-0 setelah ikan direndam dengan ekstrak metanol atau ekstrak kolom stigmasterol selama 24 jam, kemudian kandungan testosteron merosot dengan tajam hingga hari ke-15. Puncak yang kedua yang lebih rendah yang umumnya terjadi di hari ke-30 atau hari ke-45 setelah itu menurun dengan perlahan di hari ke-60 atau akhir pengamatan.

Dinamika hormon testosteron pada ikan nila yang diberikan pakan dengan campuran ekstrak metanol tumbuhan pasak bumi menunjukkan kecenderungan yang terus merosot dengan tajam mulai dari hari-0 menuju hari ke-15 hingga hari ke-60 (Gambar 5.17.c). Pola yang berbeda ditunjukkan oleh ikan nila yang diberikan pakan dengan campuran ekstrak kolom stigmasterol yang lebih mirip dengan pola pertama (Gambar 5.17.a dan Gambar 5.17.b) yang memiliki dua puncak lonjakan hormon testosteron yaitu pada hari ke-15 puncak pertama dan hari ke-30 atau hari ke-45 terjadinya puncak kedua (Gambar 5.17.d).

Penurunan kadar steroid yang cepat juga telah dilaporkan oleh Padian dan Kirankumar (2012), bahwa penurunan steroid sangat cepat sewaktu di awal dan secara bertahap stabil. Tingkat penurunan kadar hormon tergantung pada spesies, kemurnian steroid yang digunakan, organ yang dideteksi dan protokol perlakuan. Pada penelitian ini deteksi testosteron dilakukan menggunakan seluruh tubuh ikan nila.

Beberapa peneliti lain melaporkan bahwa hormon MT cepat dimetabolisme dan diekskresikan. Konsentrasi MT di plasma ikan nila menurun pada jam ke-22 setelah penghentian pakan (Rinchard et al., 1999). Konsentrasi MT di tubuh ikan setelah 24 jam menjadi 2,5-3,0% (Curtis et al., 1991) dan setelah 100 jam berkurang menjadi 1% (Johnstone et al., 1983).



### 5.3.4. Kualitas Air Pemeliharaan Ikan Nila

Tabel 5.12. Kualitas Air Selama Masa Pemeliharaan

No.	Perlakuan	Parameter			
		T <sup>o</sup> C	DO(mg/l)	pH	NH <sub>3</sub> (mg/l)
1.	Rendam EPB K(-) 0 mg/l	28,2 – 29,8	5,5 – 6,2	6,4 – 7,6	0,018 – 0,028
2.	Rendam MT(+) 50 mg/l	28,0 - 30,0	5,4 – 6,7	6,2 – 7,6	0,014 – 0,023
3.	Rendam EPB1 30 mg/l	28,0 - 30,0	5,5 – 6,8	6,2 – 7,4	0,010 – 0,026
4.	Rendam EPB2 60 mg/l	28,0 - 30,0	5,7 – 6,2	6,2 – 7,3	0,012 – 0,031
5.	Rendam EPB3 90 mg/l	28,5 - 30,0	5,5 – 6,1	6,2 – 7,2	0,014 – 0,031
6.	Pakan EPB K(-) 0 mg/kg	29,1 - 30,0	5,5 – 6,6	6,3 – 7,4	0,010 – 0,021
7.	Pakan MT(+) 50 mg/kg	28,7 - 30,0	5,8 – 6,3	6,2 – 7,5	0,012 – 0,029
8.	Pakan EPB1 30 mg/kg	28,9 - 30,0	5,7 – 6,2	6,5 – 7,1	0,018 – 0,030
9.	Pakan EPB2 60 mg/kg	28,3 - 30,0	5,4 – 6,7	6,3 – 7,3	0,018 – 0,032
10.	Pakan EPB3 90 mg/kg	28,5 - 30,0	5,5 – 6,3	6,2 – 7,2	0,018 – 0,032
11.	Rendam SPB K(-) 0 mg/l	28,4 - 30,0	5,8 – 6,7	6,4 – 7,4	0,010 – 0,018
12.	Rendam ST(+) 50 mg/l	28,9 - 30,0	5,5 – 6,6	6,2 – 7,5	0,012 – 0,024
13.	Rendam SPB1 25 mg/L	28,5 - 30,0	5,7 – 6,5	6,2 – 7,3	0,010 – 0,026
14.	Rendam SPB2 50 mg/L	28,4 - 30,0	5,9 – 6,4	6,4 – 7,4	0,012 – 0,028
15.	Rendam SPB3 75 mg/L	28,3 - 30,0	5,5 – 6,3	6,3 – 7,2	0,014 – 0,031
16.	Pakan SPB K(-) 0 mg/lkg	28,2 - 30,0	5,4 – 6,2	6,2 – 7,4	0,010 – 0,020
17.	Pakan ST(+) 50 mg/kg	28,2 - 30,0	5,7 – 6,8	6,3 – 7,6	0,016 – 0,031
18.	Pakan SB1 25 mg/kg	28,1 - 30,0	5,4 – 6,6	6,2 – 7,4	0,018 – 0,032
19.	Pakan SPB2 50 mg/kg	28,6 - 30,0	5,3 – 6,4	6,2 – 7,2	0,012 – 0,032
20.	Pakan SPB3 75 mg/kg	28,5 - 30,0	5,5 – 6,7	6,3 – 7,3	0,010 – 0,021

Suhu selama pemeliharaan berkisar 28 – 30 °C, Oksigen terlarut 5,4 – 6,8 mg/l, pH berkisar 6,2 sampai 7,6 dan Amoniak terlarut berkisar antara 0,01 – 0,032 mg/l. Semua parameter tersebut masih berada dalam kisaran toleransi kehidupan benih ikan Nila.

#### 5.4. Pembahasan Umum

Ikan nila *Oreochromis niloticus* merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang tumbuh cepat, mempunyai daya hidup tinggi dan mempunyai dimorfisme kelamin dimana pertumbuhan ikan nila jantan lebih cepat daripada ikan betina (Srisakultiew dan Komonrat, 2013). Sifat tersebut mengarahkan untuk memelihara ikan nila dengan jenis kelamin jantan. Monoseks jantan pada ikan nila dapat memberikan pertumbuhan hampir dua kali lipat daripada ikan nila yang dibudidayakan secara campuran (Dagne et al., 2013), mengurangi reproduksi yang tidak terkontrol (Ferdous dan Ali, 2011) dan menyeragamkan ukuran saat panen (Beardmore et al. 2001). Produksi monoseks jantan efektif dilakukan menggunakan hormon androgen yaitu  $17\alpha$ -metiltestosteron (Wassermann dan Afonso, 2003; Megbowon dan Mojekwu, 2014).

Penggunaan  $17\alpha$ -metiltestosteron (MT) di Indonesia menurut Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No: KEP.52/MEN/2014 telah dilarang karena potensi bahaya yang ditimbulkannya. Untuk menggantikan fungsi  $17\alpha$ -metiltestosteron beberapa peneliti telah mencari alternatif lain seperti bahan alami yang berasal dari tumbuh-tumbuhan yang memiliki aktivitas androgen.

Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) merupakan salah satu tumbuhan herba yang banyak terdapat di Asia Tenggara, termasuk Indonesia, Malaysia, Thailand, Laos, Kamboja dan Vietnam. Menurut Nainggolan dan Simanjuntak (2005), akar pasak bumi secara tradisional dikonsumsi masyarakat sebagai: tonikum pascapartum, anti mikroba, anti hipertensi, anti inflamasi, antipiretik, anti tumor, mengobati sakit perut, ulkus, malaria, disentri dan sebagai afrodisiak.

Pamor pasak bumi sebagai afrodisiak sudah dikenal masyarakat mancanegara.

Pada pasak bumi terkandung eurikomalakton, eurikomanol, laurikomalakton A dan B, dehidrokomalakton, eurikomanon, eurikomanol, benzoqui-non, saponin, dan asam lemak sterol ester (Supriadi, 2001), serta beberapa jenis sterol, yaitu



sitosterol dan stigmasterol. Selain itu juga di dalam pasak bumi terkandung berbagai jenis mineral seperti Fe, Co, Mn, dan Zn (Gunawan, 2005). Akar merupakan bagian dari tumbuhan yang banyak mengandung alkaloid, saponin, dan quasinoid. Senyawa-senyawa tersebut dapat meningkatkan hormon testosteron (Hasanah et al., 2006).

Dalam penelitian ini ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi yang diberikan melalui pakan ternyata menghasilkan persentase jantan (80,36% - 82,10%) lebih tinggi dari mekanisme pemberian bahan serupa melalui perendaman (72,66% - 76,36%) sedangkan persentase jantan ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi melalui peredaman (65,82% - 67,14%) memperlihatkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan ekstrak kolom stigmaterol akar tumbuhan Pasak Bumi yang diberikan melalui pakan (63,92% - 66,97%).

Tingginya angka keberhasilan pada ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi diduga karena sinergisitas stigmasterol pasak bumi dengan bahan lain yaitu dari golongan asam amino yaitu Arginin. Sinergisitas adalah kombinasi atau paduan unsur atau bagian yang dapat menghasilkan keluaran lebih baik dan lebih besar daripada dikerjakan sendiri-sendiri, selain itu gabungan beberapa unsur akan menghasilkan suatu keluaran lebih baik dan lebih besar.

Hal ini ini dilihat dari pengujian LC-MS/MS teridentifikasi sebanyak 19 jenis asam amino pada ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi. Jumlah Arginin sebesar 2.360 mg/kg, Asam glutamat sebesar 1.230 mg/kg, Prolin sebesar 802 mg/kg, Asam aspartat 633 mg/kg dan lainnya sementara pada ekstrak kolom Stigmasterol hanya teridentifikasi 2 jenis asam amino yaitu Serin sebesar 0,42 mg/kg dan Fenil alanin sebesar 0,27 mg/kg.

Arginine, atau L-arginin, adalah asam amino yang dibutuhkan untuk menjaga hati, kulit, sendi, dan otot yang sehat. Arginine membantu memperkuat sistem kekebalan tubuh, mengatur hormon dan gula darah, serta meningkatkan



kesuburan pada pria. Selain itu, penelitian telah menunjukkan bahwa asam amino ini dapat meningkatkan sirkulasi darah, mengobati impotensi dan penyakit jantung (Mulyadi, 2018).

Regulasi diferensiasi kelamin di dalam tubuh ikan dapat dilihat dari level aromatase pada ikan. Terdapat dua jenis aromatase, yaitu aromatase tipe 1 (tipe gonad) dan tipe 2 (tipe otak). Aktivitas enzim aromatase berkorelasi dengan struktur gonad, yaitu larva dengan aktivitas aromatase rendah akan mengarah pada terbentuknya testis, sedangkan aktivitas aromatase yang tinggi akan mengarahkan terbentuknya ovari (Sever et al., 1999). Aromatase adalah enzim sitokrom P-450 yang mengkatalis perubahan dari androgen menjadi estrogen.

Penghambatan aromatase bisa dikarenakan oleh senyawa kimia steroid dan non steroid yang telah mencapai tingkat tertentu dalam keberhasilan sex reversal ikan (Seralini dan Moslemi 2001). Hal ini dapat dianggap bahwa penghambatan tindakan aromatase oleh faktor fisik dan kimia bisa meniru efek pembalikan kelamin oleh pemberian androgen pada beberapa spesies ikan (Kwon et al., 2001).

### 5.5. Kebaharuan Penelitian/Novelty

Ekstrak bagian tumbuhan Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) yaitu akar, batang, daun, kulit dan ranting mengandung senyawa steroid alamiah. Kandungan steroid terbanyak berada pada bagian akar. Senyawa aktif steroid dari akar tumbuhan Pasak Bumi dalam bentuk ekstrak metanol dan ekstrak kolom stigmasterol dapat dimanfaatkan untuk maskulinisasi pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*).



## BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Identifikasi kandungan senyawa bioaktif steroid dari bagian tumbuhan pasak bumi memperlihatkan perbandingan efektivitas metode pengekstraksi pada bagian tumbuhan Pasak Bumi adalah akar yang dimaserasi dengan kloroform (rendemen 9,53%), akar yang direflux dengan metanol (rendemen 9,22%), ranting yang disoklet dengan metanol (rendemen 6,09%), Batang yang direflux dengan metanol (rendemen 4,30%), Daun yang direflux dengan methanol (rendemen 3,87%) dan Kulit yang disoklet dengan pelarut metanol (rendemen 3,37%).
2. Isolasi stigmasterol Akar tumbuhan Pasak Bumi menunjukkan persentase stigmasterol total dalam ekstrak metanol sebesar 5,40 % dan rata-rata persentase stigmasterol dalam akar sebanyak 1,35 %. Pengujian melalui GC-MS Ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi ditemukan 31 jenis senyawa dengan kandungan senyawa stigmasterol 5,97% sedangkan pengujian melalui GC-MS Ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan Pasak Bumi memperlihatkan ekstrak kolom yang dihasilkan masih belum sepenuhnya senyawa stigmasterol. Sebanyak 15 jenis senyawa yang teridentifikasi. Persentase senyawa Stigmasterol hanya sebesar 32,82%. Pengujian LC-MS/MS dari 22 jenis asam amino yang di analisis hanya teridentifikasi sebanyak 19 jenis asam amino pada ekstrak metanol akar tumbuhan Pasak Bumi. Jumlah Arginin sebesar 2.360 mg/kg, Asam glutamat sebesar 1.230 mg/kg, Prolin sebesar 802 mg/kg, Asam aspartat 633 mg/kg dan

lainnya sementara pada ekstrak kolom Stigmasterol hanya teridentifikasi 2 jenis asam amino yaitu Serin sebesar 0,42 mg/kg dan Fenil alanin sebesar 0,27 mg/kg.

3. Dalam kegiatan Maskulinisasi ikan Nila secara umum memperlihatkan performa dan kinerja ekstrak metanol lebih baik dibandingkan ekstrak kolom stigmasterol dalam menghasilkan persentase jantan, kelangsungan hidup, maupun pertumbuhan Ikan Nila. Histologi gonad Ikan Nila memperlihatkan perkembangan diameter terlihat lebih cepat (besar) yang menerima perlakuan hormon dibandingkan dengan tanpa hormon atau perlakuan kontrol negatif. Terdapat perbedaan pola antara perendaman dengan yang diberikan pakan. Melalui perendaman hormon testosteron melonjak drastis (H-0) kemudian turun secara Fluktuatif hingga (H-60) sedangkan melalui pakan, hormon testosteron dari (H-0) meningkat hingga (H-15) kemudian turun secara fluktuatif hingga (H-60).

## 6.2. Saran

Pemanfaatan jenis hormon yang berasal ekstrak metanol Akar tumbuhan Pasak bumi dan ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi dapat dijadikan sebagai bahan alternatif dalam kegiatan alih kelamin ikan, karena selain aman bahan ini tidak menimbulkan tekanan fisiologis pada ikan, ramah lingkungan dan aman terhadap konsumen. Sebagai sarana untuk melengkapi informasi yang masih terbatas, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui perkembangan ikan hasil alih kelamin. Selain itu diperlukan penelitian pada skala yang lebih besar untuk melihat hasil yang lebih nyata di lapangan.



## DAFTAR PUSTAKA

[APG] Angiospermae Phylogeny Group. 2003. An update of the angiospermae phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II., Bot. Botanical Journal of the Linnean Society. 141:399436.

[KEPMEN] Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan. 2014. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan tentang klasifikasi obat ikan Nomor 52. pp 1-3.

[Depkes RI.] Departemen Kesehatan republik Indonesia. 1986. Sediaan Galenik, 5-7, 10-12, Jakarta.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Washington: Association of Official Analytical Chemists.

Anam, C., Sirojudin, Firdausi, K.S. 2007. Analisis Gugus Fungsi pada Sampel Uji, Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. J. Fisika FMIPA Undip. 10(1): 79-85.

Andre, H. 2006. Upaya Maskulinisasi Induk Ikan Lele Dumbo, *Clarias* sp. Yang Telah Diovariektomi Parsial dengan Metode Implantasi Hormon 17- $\alpha$  Metiltestosteron. Skripsi. Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB.

Ang, H.H., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K. 2000. Eurycolactones A-C, novel quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Tetrahedron Letters* 41:6849-6853.

Ang, H.H., Hitotsuyanagi, Y., Fukaya, H., Takeya, K. 2002. Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. Abstract. *Phytochemistry* 59(8):833-837.

Ang, H.H., Lee K.L. 2002. Effect of *Eurycoma longifolia* on libido in middle-aged male rats. Abstract. *Journal of Basic Clinical Physiology Pharmacology* 13(3):249-254.

Ang, H.H., Lee, K.I. and Kiyoshi, M. 2003. *Eurycoma longifolia* Jack enhances sexual motivation in middle-aged male mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*.14(3) 301-8.

Ang, H.H., Ngai, T.H., Tan, T.H. 2003. Effect of *Eurycoma longifolia* Jack on sexual qualities in middle aged male rats. *Phytomedicine* 10(6-7):590-593.

Alwir, Y. 2001. Isolasi penentuan komposisi kimia dan uji biologi senyawa steroid dari cacing laut (*Eunice sicilensis*). Tesis. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.

Ansel, H.C. 1989. Introduction to Pharmaceutical Dosage Form. Lea and Febiger, Inc. New York.



- Arisandi, A. 2007. Efektivitas Ekstrak Steroid Teripang Untuk Memanipulasi Kelamin Udang Galah. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Arsenia, G.C., Francis, N.B. and Jose, S.A. 2005. Sex Reversal of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. by Egg Immersion Technique The Effect of Hormone Concentration and Immersion Time. College of Fisheries and Freshwater Aquaculture Center. Central Luzon State University, Science of Muñ oz. Nueva Ecija 3120. Philippines.
- Astarina, N.W.G., Astuti, K.W., Warditiani, N.K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber Purpureum* Roxb.), Jurnal Farmasi Udayana.
- Bahti, H.H., Tjokronegoro, R. dan Dimyati. 1983. Isolasi dan Identifikasi senyawa-senyawa steroid dan senyawa-senyawa yang bertalian dengannya serta senyawa-senyawa alkaloid dari daun Kemboja (*Plumiera acutifolia* Poir). FMIPA. Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Bangham, A.D., Horne, R.W. 2006. Action of saponins on biological cell membranes. Journal Nature 196(1):952-953.
- Baroiller, J.F., D'Cotta, H., Bezault, E., Wessel, S., Schwark, H.G. 2009. Tilapia Sex Determination: Where Temperature and Genetics Meet. Review. Comparative Biochemistry and Physiology (in Press).
- Bearmore, J.A., Mair, G.C. dan Lewis, R.I. 2000. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. Aquaculture 197: 283-301.
- Bedir, E., Abou-Gazar, H., Ngwendson, J.N., Khan, I.A. 2003. Eurycomaoside: a new quassinoid-type glycoside from the roots of *Eurycoma longifolia*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 5(11):1301-1303.
- Biswas, A.K., Morita, T., Yoshizaki, G., Maita, M., dan Takeuchi, T. 2005. Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. Aquaculture 243: 229 – 239.
- Bowman, M.P., Bowker, J., Carty, D.G., Straus, D.L., Farmer, B.D., Mitchell, A.J., Ledbetter, C.K. 2012. The safety of 17 $\alpha$ -methyltestosterone administered in feed to larval Nile tilapia. Drug Research Information Bulletin. Aquatic Animal Drug Approval Partnership. 28: 1-3.
- Brodie, A. 1991. Aromatase and it's Inhibitors an Overview. Journal Steroid Biochemical Molecular Biology. 40 No.1-3: 225-261.
- Bulkini, A. 2012. Maskulinisasi ikan cupang (*Betta splendens*) melalui perendaman embrio dalam ekstrak purwoceng (*Pimpinella alpina*). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.



- Cahyana, A.A. 2014. Analisa SEM (Scanning Electron Microscope) Pada Kaca Tzn Yang Dikristalkan. Solo: Fisika UNS.
- Cahyani, D. 2014. Maskulinisasi ikan cupang *Betta splendens* dengan ekstrak tanaman purwoceng melalui perendaman artemia. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Carman, O., Sastrawibawa, S. dan Alimudin. 1998. Peningkatan Kualitas Genetik melalui Produksi Jantan Super pada Ikan Nila Merah (*Oreochromis niloticus*) secara Masal dalam rangka Peningkatan Efisiensi Produksi (Laporan Riset Unggulan Terpadu IV). Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi. Dewan Riset Nasional. Jakarta.
- Cerda, J., Calman, B.G., Lafleur, Jr.G.J., and Limensand, S. 1996. Pattern of vitellogenesis and follicle maturational competence during the ovarian follicular cycle of *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology*, 103: 24 – 35.
- Chan, S.T.H. and Yeung, W.S.B. 1983. Sex Control and Sex Reversal in Fish Under Natural Condition. in: Hoar WS, Randal DJ, Donaldson EM. Editor Fish Physiology: Vol IX B. New York. Academic Press.
- Chan, K.L., Lee, S., Sam, T.W., Han, B.H. 1989. A quassinoid glycoside from the roots of *Eurycoma longifolia*. *Abstract. Phytochemistry* 28(10): 2857-2859.
- Chan, K.L., litaka, Y., Noguchi, H., Sugiyama, H., Saito, I., Sankawa, U. 1992. 6 $\alpha$ -Hydroxyeurycomalactone, a quassinoid from *Eurycoma longifolia*. *Abstract. Phytochemistry* 31(12): 4295-4298.
- Chan, K.L., Choo, C.Y. 2002. The toxicity of some quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Abstract. Planta Medica* 68(7): 662-664.
- Chan, K.L., Choo, C.Y., Abdullah, N.R., Ismail, Z. 2004. Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifolia* Jack. using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 223-227.
- Chan, K.L., Choo, C.Y., and Abdullah, N.R. 2005. Semisynthetic 15-O-acyl- and 1,15-di-O-acyleurycomanones from *Eurycoma longifolia* as potential antimalarials. *Planta Med* 71 (10): 967-9.
- Chang, X.T., Kobayashi, T., Kajura, H., Nakamura, M., Nagahama, Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *J Mol Endocrinol* 18: 57–6.
- Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kajura, H.K., Sudhakumari, C.C.,



- Nagahama, Y. 2005. Two types of aromatase with diverent encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology* 141:101–115.
- Cholik, F., Ateng G.J., Poernomo, dan Jauzi, A. 2005. *Akuakultur: Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa. Diterbitkan atas Kerjasama Masyarakat Perikanan Nusantara (MPN) dengan Taman Mini Indonesia Indah (TMII)*. Jakarta.
- Christian, G.D. 1994. *Analytical Chemistry. Fifth Edition. University of Washington. John Wiley & Sons, USA.*
- Contreras-Shanchez, W.M., Fitzpatrick, M.S. 2001. Fate of methyltestosterone in the pond environment: impact of MT-contaminated soil on tilapia sex differentiation. *Effluents and Pollution Research 2C (9ER2C)*. Department of Fisheries and Wildlife. Oregon State University, USA
- Coulson J.M. dan Richardson, 1999. *Chemical Engineering – 4<sup>th</sup> ed. British Librari Cataloguing in Publication Data. Bath Press, Bath. Great Britain.*
- Coulson, J.M., and Richardson, J.F. 1999. *Chemical Engineering Design, 6nd Ed., vol 6, Elsevier Butterworth-Heinemann Linacre House, Jordan Hill, Oxford OX2 8DP.*
- Craig, C.R., Stizel, R.E. 1997. *Modern Pharmacology wih Clinical Applications*. Boston: Little Brown and Company.
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S.L., Duke, J.A., Brielmann, H.L. 2006. *Natural Products from Plants. Second edition. CSR. London.*
- Curtis, L.R., Diren, F.T., Hurley, M.D., Seim, W.K., Tubb, R.A. 1991. Disposition and elimination of 17 $\alpha$ methyltestosterone in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 99: 193-201.
- Dagne, A., Degefu, F., Lakew, A. 2013. Comparative growth performance of monosex and mixed-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. in pond culture system at sabeta, Ethiopian. *International Journal of Aquaculture*. 3(7): 30-34.
- Davis, R.B., Simco, B.A., Groudie, C.A., Parker, N.C., Couldwell, W. and Snellgrove, P. 1990. Hormonal Sex Manipulation and Evidence for Female Homogamety on Channel Catfish. *General and Comparative Endocrinology* 78: 218-223.
- Desprez D., Geraz E., Hoareau M.C., Melard C., Bosc P., and Baroiller J.F. 2003. Production of a High Percentage of Male Offspring with a Natural Androgen, 11 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione (11-Boha4), in Florida Red Tilapia. *Aquaculture* 216: 55-65.



- Devlin, T.M. 1993. The Textbook of biochemistry with clinical correlation. Third ed. Jhon Wiley and Sons Inc. Publication. New York, Chchester, Brisbane, Toronto, Singapore. 1185 pp.
- Devlin, R.H. dan Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.
- Djosebagio, S. 1990. Fisiologi kelenjar endokrin. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor. 247 hal.
- Dunham, R.A. 2004. Aquaculture and fisheries biotechnology : Genetic Approaches. CABI Publ. Cambridge, USA. 357 p.
- Effendie, M.I. 1997. Biologi perikanan. Yayasan Pustaka Nusatama. Yogyakarta
- Emilda. 2008. Pemanfaatan steroid asal jeroan teripang sebagai bahan aktif dalam sex reversal pada ikan nila. Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Feist, G., Schreck, C.B. 1996. Brain-pituitary-gonadal axis during early development and sexual differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 1023 (3): 394 – 409.
- Firdous, Z., Masum, M.A., Ali, M.M. 2011. Influence of stocking density on growth performance and survival of monosex tilapia *Oreochromis niloticus* fry. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*. 4(2):99-103.
- Fitzsimmons, K. 1997. Introduction to Tilapia Nutrition in Tilapia Aquaculture. Proceeding from The Fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Orlando, Florida, 1: 9-12.
- Fitzpatrick, M.S., Sanchez, W.M.C., Milston, R.H., Lucero, M., Feist, G.W. 1999. Steroid Immersion for Masculinization of Tilapia: Immersion of Tilapia Fry in MDHT. Oregon Cooperative Fishery Research Unit. Oregon State University. Corvallis. USA.
- Fowles, I.A. 1998. Gas Chromatography Analytical Chemistry by Open Learning. John Wiley & Sons Ltd: Chichester.
- Fujaya, Y. 2002. Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan. Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen pendidikan Nasional. 201 hal.
- Fullerton, D.S. 1980. Steroid dan senyawa terapeutik sejenis. Toronto. J.B Lippincott. 256 hal.



- Gabay, O. 2009. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786147>. Diakses 20 Juni 2015 Jam 15.20 WIB ).
- Gabriel, N.N., Qiang, J., Ma, X.Y., He, J., Xu, P., & Omoregie, E. 2017. Sex-reversal effect of dietary Aloe vera (Liliaceae) on genetically improved farmed Nile tilapia fry. *North American Journal of Aquaculture*, 79(1), 100–105.
- Gabriel, N.N. 2019. Review on the progress in the role of herbal extracts in tilapia culture. *Cogent Food & Agriculture* (2019), 5: 1619651.
- García-Ayuso, L. E., Sánchez, M., Fernández de Alba, A., & Luque de Castro, M.D. 1998. Focused Microwave-Assisted Soxhlet: An Advantageous Tool for Sample Extraction. *Analytical Chemistry*, 70(11), 2426–2431.
- Ghosal, I., Chakraborty, S.B. 2014. Effects of the aqueous seed extract of *Tribulus terrestris* on sex reversal of Nile tilapia. *Journal Pharmaceutical Science*. 4: 459-461.
- Goat, L.J. dan Toshihiro, A. 1997. *Analysis of sterols*. Blackie Academic & Profesional. London.
- Govoroun, M., McMeel, O.M., Mecherouki, H., Smith, T.J., and Guiguen, Y. 2001. 17 $\beta$  Estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the Rainbow Trout. *Endocrinology*, Vol. 142, 5:1841-1848.
- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A. and Sindelar, R.D. 2005. Biologically active quassinoids and their chemistry: Potential Leads for Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 173-190.
- Guerrero III, R.D. 1974. An Asetocarmine Squash Method for Sexing Juvenile Fishes. *The Progressive Fish Culturist*. 42 (4) 36 : 56.
- Gunarso, W. 1989. Mikroteknik. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor. 117 pp.
- Gunawan, D. 2005. *Ramuan Tradisional Untuk Keharmonisan Suami Isteri*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hadad, E.A. dan Taryono, M. 1998. Pasak Bumi *Eurycoma longifolia* Jack. Di dalam: Supriadi. *Tumbuhan obat, khasiat dan penggunaannya*. Jakarta: Pustaka Indonesia. hlm. 91-92.
- Hadihah, J. T. 2000. *Eurycoma longifolia* Jack (Pasak bumi). <http://www.bogor.indo.net.id/kri/eurycoma.htm> [ 21 Februari 20015].



- Hadie, W., Hadie, L.E., Kusmiri, I.I., Jaelani, Sularto dan Himayani, Y. 2001. Evaluasi pertumbuhan udang galah pada ekosistem kolam dan tambak air payau. Universitas Brawijaya.
- Hafez, E.S.E. 1987. Reproductive behavior. Philadelphia. Lea and Febiger. 537 hal.
- Hafez, E.S.E., Jainudeen, M.R., and Rosnina, Y. 2000. Chapter 3: Hormones, Growth Factors, and Reproduction. In: Reproduction in Farm Animals. Edited by: Hafez and Hafez. 7th Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, New York, Tokyo. P. 35-54.
- Harborne, J.B. 2006. Metode Fitokimia. ITB. Bandung.
- Harvey, B.J. and Carolsfeld, J. 1993. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: IDRC.
- Hasanah, N., Marsetyawan, H.N.E., Soesatyo dan Mustofa. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Pada Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit Terhadap Infeksi. Jurnal Sains Kesehatan. Universitas Gajah Mada.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid III. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan.
- Heryani, H. 2002. Kajian fraksi aktif dan formulasi tabat barito (*Ficus deltoidea* Jack) sebagai anti mikroorganisme klinis. Disertasi. Program Studi Teknologi Industri Pertanian. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Hewit, L.M., Kovacs, T.G., Dubes, M.G., Maclatchy, D.L., Martel, P.H., McMaster, M.E., Paice, M.G., Parrott, J.L., Heuvel, M.R.V.D and Van der Kraak, G.L. 2008. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 27, No. 3, pp. 682-697.
- Hidayat, M.G. 2004. Perbandingan Metode Ekstraksi Flavonoid dan Terpenoid dari Sidaguri Serta Daya Inhibisi Ekstrak Terhadap Aktivitas Xantin Oksidase. Skripsi. FMIPA. IPB. Bogor.
- Himawan, R.F. 2010. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).
- Hopkins, K.D., Shelton, W.L. and Engle, C.R. 1979. Estrogen Sex Reversal of *Tilapia aurea*. Aquaculture Research, 18: 263 -268
- Houghton, P.J. dan Rahman, A. 1998. Laboratory Handbook for the fractionation of natural extracts. UK: Chapman & Hall.



- Hunter, G.A. and Donaldson, E.M. 1983. Hormonal Sex Control and Its Application to Fishculture. In: WS Hoar, DJ Randall, EM Donaldson (Editors). Fish Physiology. Academic Press. New York, P: 223-291.
- Husen, R., Pihie, A.H. dan Nallappan, M. 2004. Screening for antihyperglycaemic activity in several local herbs of Malaysia. J Ethnopharmacol 95:205-208.
- Hussein, S., Ibrahim, R., Kiong, A.L.P., Fadzilah, N.M. and Daud, S.K. 2005. Multiple shoot formation of important tropical medicinal plant, *Eurycoma longifolia* Jack. J. Biotechnol 22: 349-351.
- Hutchison, J.B. 1993. Aromatase: Neuromodulator in the control of behavior. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 44(4-6), 509-520.
- Ibrahim, M.N. 2001. Isolasi dan uji aktivitas biologi senyawa steroid dari lintah laut, *Discodoris* sp. Tesis. Program Studi Biologi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Indonesian Botanic Garden [IBG]. 1998. The Flora of Bukit Tiga Puluh National Park, Kerumutan Sanctuary and Mahato Protective Reserve Riau, Indonesia. Jakarta: Indonesian Botanical Garden.
- Isnawati, R. 2013. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC).
- Itokawa, H., Kishi, E., Morita, H., Takeya, K., Iitaka, Y. 1991. Eurylene, a new squalene-type triterpene from *Eurycoma longifolia*. Abstract. Tetrahedron Letters 32(15):1803-1804.
- Itokawa, H., Qin, X.R., Morita, H., Takeya, K. 1993. C18 and C19 Quassinoids from *Erycoma longifolia*. J.Natural Prod, 56 (10), 1766 - 1771.
- Iskandar, A. 2010. Efektifitas Ekstrak Tepung Testis Sapi dalam Alih Kelamin Ikan Nila *Oreochromis niloticus* Melalui Teknik Perendaman. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.
- Izquierdo, M.S., Palacios, H.F. and Tacon, H.F. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture, 197:25 - 42.
- Jacob, A.M., Purwaningsih, S., Rinto. 2011. Anatomy, bioactive compounds and antioxidant activity of mangrove api api (*Avicennia marina*) leaf. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia XIV(2):143-152.
- Jiwajinda, S., Santisopasri, A., Mukakami, Hirai, N. and Ohigasha, H. 2001. Quassinoids from *Erycoma longifolia* as plant Growth Inhibitors. In vitro Anti tumor promoting and anti-parasitic activities of the quassinoids from *Eurycoma longifolia*, a Medical Plant in Southeast Asia. Journal of Ethnopharmacology 82 (1) : 55 -58. Phytochemistry 58 (6): 959-962.



- Johnstone, R., Macintosh, D.J., Wright, R.S. 1983. Elimination of orally administered  $17\alpha$ -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* tilapia and *Salmo gairdneri* rainbow trout juveniles. *Aquaculture* 35: 249-257.
- Kang, J.S. 2012. Principles and Applications of LC-MS/MS for The Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. Korea (KR): In Tech Open.
- Ketaren, S. 1986. Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan. Jakarta: UI Press.
- Kim, D.S., Cho, H.J., Bang, I.C., Choi, G.C. and Nam, Y.K. 2000. Effect of Immersion of Larvae in Estradiol  $17\beta$  on Feminization, Structural Changes of Gonad and Growth Performance in The Far Eastern Catfish, *Silurus asotus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 32: 323-328.
- Kirpichnikov, V.S. 1981. Genetics Bases of Fish Selection. Springer-Verlag. Berlin.
- Kiryakit, A. 2014. Efficacy of red kwao krua (*Butea superba* Roxb) crude extract for all male production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aatsea*, 10(2), 391–398.
- Kuo, P.C., Damu, A.G., Lee, K.H., Wu, T.S. 2004. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12:537-544.
- Kurniasih, T. 2004. Produksi ikan nila jantan homogamet YY (YY supermale) untuk meningkatkan produksi nila. *Warta Penelitian Perikanan Indonesia*.
- Kustiariyah. 2006. Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas Biologis senyawa steroid dari teripang sebagai aprodisiaka alami. Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Kwon, Y.J., Haghpanah, V., Kongson-Hurtado, M.L., Mc Andrew, J.B., and Penman, J.D. 2000. Masculinization of Genetic Female Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) By Dietary Administration of an Aromatase Inhibitor During Sexual Differentiation. *The Journal of Experimental Zoology* 287: 46-53.
- Kwon, J.Y., McAndrew, B.J., Penman, D.J. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development* 59: 359-370.
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Busetti, F., Card, M., Humpage, A., Orbell, J.D., Ridgway, H.F., Stewart, M.B., 515 van de Merwe, J.P., Escher, B.I., 2019. Transformation of endocrine disrupting chemicals, 516 pharmaceutical and personal care products during drinking water disinfection. *Sci. Total Environ.* 517 657, 1480–1490.



- Liao, C.D., Chen, Y.C., Lin, H.Y. 2014. Incidence of citrinin in RYR and various commercial monascus products in Taiwan from 2009 to 2012. *Food Chemistry*.38:178-183.
- Macintosh, D.J. dan Litte, D.C. 1995. Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Bromage, N.R. dan Ronald, J.B. Eds. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science. USA. Pp 277-330.
- Malison, J., Procarione L.S., Kayes, T.B. Hansen, J.F. and Held, J.A. 1998. Induction of out-season spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture*, 163:151 – 161.
- Mantau, 2005. Produksi Benih Ikan Nila Jantan Dengan Rangsangan Hormon Metil Testosteron dalam Tepung Pellet. *Jakarta: Jurnal Litbang Pertanian*.
- Mair, G.C., Abucay, J.S., Beardmore, J.A., Skibinski, D.O.F. 1995. Growth performance trials of genetically male tilapia ŽGMT. derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: on station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture* 137, 313–324.
- Manosro, J., Petchjul, K., danManosroi, A. 2004. Effect of Fluoxymesterone Fish Feed Granule on Sex Reversal of the Hybrid Thai Red Tilapia (*O.niloticus*, X *O. mossambicus*). *Asian Fisheries Science*. 17:323-331.
- Marcott, C. 1986. *Material Characterization Hand Book Infrared Spektroskopy*. ASM. International. Amerika. Hlm.
- Mattjik, A.A. dan Sumertajaya, I.M. 2006. *Perancangan Percobaan: Dengan Aplikasi SAS dan Minitab*. Penerbit IPB Press. Bogor.
- Matty, A.T. 1985. *Fish Endocrinology*. Croom Helm. Timber Press. Oregon USA.
- Megayana, Y., Subekti, S., Alamsjah, M.A. 2012. Studi kandungan alginat dan klorofil rumput laut *Sargassum* sp. pada umur panen yang berbeda. *Journal of Aquaculture and Fish Health* 1(1):120-127.
- Megbowon, I., Mojekwu, T.O. 2014. Tilapia sex reversal using methyltestosterone (MT) and its effect on fish, man and environment. *Biotechnology*. 13(5): 213- 216.
- McMaster, M.C. 2007. *GC/MS: a practical user's guide*. – 2nd. Wiley Interscience. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Memmat, M.I., Reham, A.A., Omaima, M.D., Asmaa, E.H. 2015. Detection of methyltestosterone and atrenbolone acetate hormones residue in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Benha Veterinary Medical Journal* 28 (1): 276-280.
- Minorsky. 2004. On the inside. *Plant physiology* 131(3):1157-1158.



Mirza, J.A. and Shelton, W.L. 1988. Induction of Ginogenesis and Sex Reversal in Silver Carp. *Aquaculture Research*, 68:1-4.

Morita, H., Kishi, E., Takeya, K., Itokawa, H., Iitaka, Y. 1993. Squalene derivatives from *Eurycoma longifolia*. *Phytochemistry* 34(3):765-771.

Montgomery, R. 1993. *Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Mulder, M. (1996). *Basic Principles of Membrane Technology*. Kluwer Academic Publisher. Netherland.

Mukherjee, D., Ghosal, I., Chakraborty, S.B. 2015. Application Of *Asparagus racemosus* Roots for Production Of Monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* *International Journal of Advanced Research*, Volume 3, Issue 9, 828 – 833.

Mukherjee, D., Ghosal, I., Chakraborty, S.B. 2015b. Production of Monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Using Seed of *Mucuna pruriens*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. e-ISSN: 2278-3008, p-ISSN:2319-7676. Volume 10, Issue 1 Ver. IV (Jan -Feb. 2015), PP 55-59. [www.iosrjournals.org](http://www.iosrjournals.org).

Mulyadi, T. 2018. Dua Puluh Macam Asam Amino dan Fungsinya. [budisma.net/2018/10/20-macam-asam-aminodan-fungsinya.html](http://budisma.net/2018/10/20-macam-asam-aminodan-fungsinya.html). Diakses tgl 20 oktober 2018.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. dan Rodwell, V.W. 1997. *Biokimia Harper*: Edisi 24. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

Muslim. 2010. Maskulinisasi Ikan Nila *Oreochromis niloticus* dengan Pemberian Tepung Testis Sapi. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.

Nakamura, M., Kabayashi, T., Chang, X.T., and Nagahama, Y. 1998. Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish. *The Journal of Experimental Zoology*. 281:362-372.

Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleostei gonads. *Fish Physiology*, 9 B:223 -275.

Nagahama, Y., Michiyasu, Y., Masakane, Y., Toshinobu, T., and Yoshino, K. 1991. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current Topic in Developmental Biology* 30 :103 – 145.

Nagy A., Bercsenyi, M. and Csanyi, V. 1981. Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 38:725-728.



Nainggolan, O. dan Simanjuntak, J.W. 2005. Pengaruh ekstrak ethanol akar pasak bumi terhadap perilaku seksual mencit putih. *Cermin Dunia Kedokteran* 146:47. Departemen Farmasi Institut Teknologi Bandung, Bandung.

Nakamura, M., Kabayashi, T., Chang, X.T., and Nagahama, Y. 1998. Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish. *The Journal of Experimental Zoology*. 281: 362-372.

Nasrun. 1994. Pengaruh pemberian artemia yang direndam dalam hormon  $17\alpha$ -methyltestosterone terhadap nisbah kelamin ikan betta (*Betta splendens*).. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 64 hal.

Nurhanan, M.Y, Azimahtol, H.L.P., Mohamad, I.A. and Shukri, M.A. 2005. Cytotoxic effects of the root extracts of *Eurycoma longifolia* Jack. *Phytoter Res* 19(11) 994-6.

Nurjanah, Taufiqurrahman, Nurhayati, T. 2010. Komposisi kimia dan vitamin A, B1, B2, B3 daging ikan gurami (*Osphronemus goramy*) pada berbagai ukuran. *Akuatik* 4(1):21-29.

Nurkhasanah, A. 2015. Maskulinisasi Ikan Pelangi (*Iriatherina wernerii*) Melalui Perendaman Embrio dalam Ekstrak Tanaman Purwoceng (*Pimpinella alpina*). [Skripsi]. Departemen Budidaya Perairan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Nuryamin, A. 2000. Studi Potensi Tumbuhan Obat Akar Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr), Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), Seluang belum (*Luvunga eleutheranda* Dalz) dan Gin Kalimantan (*Psychotriavaletoniil. Jocrhr*). Skripsi Jurusan Konservasi Sumberdaya Hutan Fakultas Kehutanan IPB. Bogor.

Oldfield, R.G. 2005. Genetic, abiotic and social influences on sex differentiation in cichlid fishes and the evolution of sequential hermaphroditism. *Fish and Fisheries*. 6 : 93-110.

Padua, L.S., Bunyapraphatsara, N. and Lemmens, R.H.M.J. (eds.). 1999. *Plant Resources of South-East Asia No 12(1): Medicinal and poisonous plant 1*. Backhuy Publishers, Leiden, The Netherlands. 711p.

Pandian, T.J. 1999. Sex Determination and Differentiation in Teleosts. In Karunasagar, I., Indrani, K., Alan, R.: *Aquaculture and Biotechnology*. Science Publisher, Inc. USA.

Pandian, T.J. dan Sheela, S.G. 1995. Hormonal Induction of Sex Reversal in Fish. *Aquaculture* 138: 1-22.



- Pandian, T.J. dan Kirankumar. 2003. Recent Advances in Hormonal Induction of Sex-Reversal in Fish. Di dalam: Jana B.B dan Webster C.D, (Editor). Sustainable Aquaculture: Global Perspectives. New York: Food Product Press; 2003. hlm 205-230.
- Panjaitan, R.G.P. 2008. Pengujian Aktivitas Hepatoprotektor Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). Disertasi. Sekolah pasca sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Panjaitan, R.G.P., Harahap, J.A., dan Zakiah, Z. 2009. Pemberian Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Pada Induk Laktasi Untuk Meningkatkan Bobot Badan Anak Mencit. Makara, Sains, 13 (2): 195-199.
- Parks, L.G.; Lambright C.S., Orlando, E.F., Guillet, L.J.Jr., Ankleys, G.T. and Gray, L.E.Jr. 2001. Masculinization of Female Mosquitofish in Kraft Mill Effluent-Contaminated Fenholloway River Water Is Associated with Androgen Receptor Agonist Activity. Toxicological sciences. 62; 257-267.
- Park, I.S., Kim, J.H., Cho, S.H. and Kim, D.S. 2004. Sex Differentiation and Hormonal Sex Reversal in The Bagrid Catfish *Pseudobagrus Fulvidraco* (R). Aquaculture Research, 232: 183-193.
- Patel, D. 2011. Matrix effect in a view of LC-MS/MS: an overview. Int J Pharm Biosci. 2(1): 559-564. ISSN 0975-6299.
- Phelps, R.P. dan Popma, T.J. 2000. Sex Reversal of Tilapia. Pages 39 – 59 in B.A. Costa-Pierce and J.E. Rakocy, eds. Tilapia Aquaculture in the Americas, Vol. 2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Phelps, R.P., Sanchez, W.C., Couturier, G.M, Abiado, M., Dabrowski, K. 2001. Studies on Fate of Methyltestosterone and Its Metabolism In Tilapia and on The Use of Phytochemicals as an Alternative Methode to Produce a Monosex Population of Tilapia. Reproduction Control Research 1 (10RCR1/Experiment/Mexico).
- Phillay, T.V.R dan Kutty, M.N. 2005. Aquaculture Principles and Practices. Bleckwall publishing.
- Piferrer, F. 2001. Endocrine Sex Control Strategies for Feminization of Teleost Fish. Aquaculture 197: 229-281.
- Piferrer, F., Bla'zquez, M. 2006. Aromatase distribution and regulation in fish. Springer Science+Business Media B.V.: 1-12 Popma, T.J and M. Masser, 1999. Tilapia: Life History and Biology. SRAC Publ. No. 283.
- Popma, T. and Masser, M. 1999. Tilapia life history and biology. SRAC Publication No. 283. Southern Regional Aquaculture Center, MSU. Mississippi, United States of America. 4 p.



- Popma, T.J. dan Lovshin, L.L. 1999. Worldwide Prospect for Commercial Production of Tilapia. Research and Development Series No. 41. International Center for aquaculture and Aquaric Environments. Departemen of Fisheries and Allied Aquaculture Auburn University, Alabama.
- Purwoko, Y., Triwahyudi, Z.E., 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Eurycoma longifolia* Terhadap Diameter Tubulus Seminiferus Mencit Balb/C Jantan yang Dibuat Stres dengan Stresor Renjatan Listrik. Semarang, Januari – Juni 2010, pp. 45-50.
- Putra, S. 2011. Maskulinisasi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) melalui perendaman dalam ekstrak purwoceng (*Pimpinella alifina*). Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Republika Online. 2012. Akar Pasak Bumi Penambah Stamina. Republika. <[http://www.republika.co.id/koran\\_detail.asp?id=121552&kat\\_id=150&kat\\_id1=&kat\\_id2=>](http://www.republika.co.id/koran_detail.asp?id=121552&kat_id=150&kat_id1=&kat_id2=>) (10 Mei 2012).
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., and Sasal, P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50–61.
- Riani, E., Khaswar, S. dan Kaseno. 2008. Pemanfaatan steroid teripang sebagai aprodisiaka alami dan untuk pengembangan budidaya perikanan. Laporan Eksekutif Hibah Penelitian Pascasarjana-HPTP. Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Richard, J., Dabrowski, K., Garcia-Abiado, M.A. 1999. Uptake and depletion of plasma 17 $\alpha$ -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: effect on plasma steroids and sex reversal. *Steroids* 64 (8): 518-525.
- Riris, I.D. 1994. Steroid dalam kerang hijau. Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Ridzuan, M., Rain, N.A., Zhahri, I. and Zakiah, I. 2005. Effect of *Eurycoma longifolia* extract on the glutathione level in Plasmodium Falciparum infected erythrocytes in vitro. *J Trop Biomed* 22(2) 155-63.
- Ruiz-Jimenez, J. 2004. Automatic soxlet extraction. *Journal Anal Chim Acta* 159-525. Elsevier. <http://www.sciencedirect>. (10 Desember 2011).
- Rohaeti, E., Heryant, R., Rafi, M., Wahyuningrum, A. And Darusman, L.K. 2011, Prediksi kadar flavonoid total tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) menggunakan kombinasi spektroskopi IR dengan regresi kuadrat terkecil parsial, *Jurnal Kimia*, 5 (2).



- Rohmy, S. 2018. Maskulinisasi ikan hias *Sinodontis Synodontis eupterus* melalui perendaman embrio menggunakan ekstrak Purwoceng *Pimpinella alpina*. Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Rosida, R. 2003. Pengaruh Pemberian Ekstrak (*Eurycoma Longifolia* Jack) Per Oral Terhadap Jumlah Sel Spermatogenik, Sel Sertoli dan Sel Leydig pada Mencit (*mus musculus*) Jantan Strain Swiss. Pasca Sarjana Ilmu Kedokteran. Universitas Airlangga (Tesis).
- Saleh, C. 2008. Isolasi dan penentuan struktur senyawa steroid dari akar tumbuhan cendana (*Santalum album* Linn). Disertasi. Program Doktor Ilmu Kimia. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Satayavivad, J., Soonthornchareonnon, N., Somanaban, A., Thebtaranonth, Y. 1998. Toxicological and antimalarial activity of eurycomalactone and *Eurycoma longifolia* extract in mice. Thai Journal of Phytopharmacy 5(2):1-20.
- Sari, D.W.S., 2013, Potensi Lamun *Enhalus acoroides* dan *Thalassia hemprichii* dari Perairan Pulau Pramuka Kepulauan Seribu Sebagai Antioksidan dan Aktivitasnya dalam Menghambat Pembentukan Peroksida, Tesis. Universitas Padjadjaran.
- Schmidt, G., Steinhart, H. 2001. Impact of extraction solvents on steroid contents determined in beef. Journal of Food chemistry 76:83–88.
- Schultz, R. 1984. Serum Level of 11-oxotestosterone in male and 17  $\beta$  estradiol in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first reproductive cycle. General Comparative Endocrinology, 56 : 111 – 120.
- Schunack, W.K., Mayer dan Haake, M. 1990. Pengaruh Obat. Buku Pelajaran Kimia Farmasi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Seralini, G.E., Moslemi, S. 2001. Aromatase inhibitors: past, present and future. Mol. Cell. Endocrinol. 178:117-131.
- Sever, D.M., Halliday, T., Waight, V., Brown, J., Davies, H.A., Moriarty, E.C. 1999. Sperm storage in female of the smooth new (*Triturus vulgaris* L.): ultrastructure of the spermathecal during the breeding season. Journal of Experimental Zoology 283 : 51-70.
- Shalaby, A.M.E., Ashraf, A.R. dan Yassir, A.E.K. 2007. Sex reversal of Nile tilapia fry using different doses 17 $\alpha$ -Methyltestosterone at different dietary protein levels. Central Laboratory for Aquaculture Research, Abbasa, Abo-Hammad, Sharkia Governorate, Egypt.
- Sidik, M. 1997. Antioksidan Alami Asal Tumbuhan. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XII. Bandung. ITB.



- Silverin, B., Baillien, M., Foidart, A., Balthazart, J. 2000. Distribution of aromatase activity in the brain and peripheral tissues of passerine and nonpasserine avian species. *General and Comparative Endocrinology* 117: 34–53.
- Skoog, D. A. 1998. Principles of Instrumental Analysis. Fifth Edition. Brooks/cole-Thomson Learning, USA.
- Sindelar, R.D., Walker, L.A., Sindelar, R.W., Vangapandu, S. dan Guo, Z. 2005. Biologically active quassinoids and their chemistry: potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry* 12:173-190.
- Siregar, L., Keng, C.L. dan Lim, B.P. 2003. Selection of cell source and the effect of pH and MS macronutrients on biomass production in cell cultures of (*Eurycoma longifolia* Jack). *Journal of Plan Biotechnology*, 5(2) :125-130.
- Siregar, L.A.M., Keng, K.L. and Lim, B.P. 2005. Production of alkaloid from callus culture and cell suspension of *Eurycoma longifolia* Jack. Di dalam: *National Seminar of Mediclinal Plant XXVII*; Bogor, 15-16 Sep 2005. Bogor: ISMECRI-POKJANAS.
- Sitorus, M. 2009. Spektroskopi Elusidasi Struktur Molekul Organik. Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Skoog, D.A. 1998. Principles of Instrumental Analysis. Fifth Edition. Brooks/cole-Thomson Learning, USA.
- Smith, C.A., Elf, P.K., Lang, J.W., and Joss, J.M.P. 1994. Aromatase Enzyme Activity During Gonadal Sexual Differentiation in Alligator Embryos. *Differentiation* 58: 281-290.
- Sofia. 2017. Efektivitas Lama Perendaman Embrio dalam Ekstrak Tanaman Purwoceng *Pimpinella alpina* terhadap Pengarahan Kelamin Jantan Ikan Pelangi *Iriatherina wernerii*. [Skripsi]. Departemen Budidaya Perairan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- SNI 6141-2009. Produksi Benih Ikan Nila Hitam (*Oreochromis niloticus* Bleeker) Kelas Benih Sebar. Badan Standarisasi Nasional (BSN). Jakarta.
- Srisakultiew, P., Kamonrat, W. 2013. Immersion of 17 $\alpha$ -methyltestosterone dose & duration on tilapia masculinization. *Journal of Fisheries Science*. 7(4): 302-308.
- Sudirman, S., Nurjanah, Jacob, A.M. 2014. Proximate compositions, bioactive compounds and antioxidant activity from large-leafed mangrove (*Bruguiera gymnorrhiza*) fruit. *International Food Research Journal* 21(6):2387-2391.
- Sumardjo, D. 2009. Pengantar Kimia Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC.



- Sumarto, Desmelati, Dahlia, Hasan, B., Azwar, M. 2011. Penentuan senyawa bioaktif ekstrak daging siput bakau (*Terebralia sulcata*) dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Jurnal Berkala Perikanan Terubuk 39(2):85-96.
- Supriadi, 2001. Tumbuhan Obat Indonesia, Penggunaan dan Khasiatnya. Ed ke-1. Jakarta: Pustaka Populer Obor.
- Susanti, A.D., Ardiana, D., Gumelar, G.P., Bening, Y.G. 2012, Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glatinosa*), Simposium Nasional RAPI XI FT UMS ISSN : 1412-9612.
- Susilowati, A. 2008. Teknik Perbanyak dan Kekekabatan Genetik Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). Pascasarjana IPB. Bogor. Thesis.
- Taufiqurrachman. 1999. Pengaruh ekstrak *Pimpinella alpina* Mol. (purwoceng) dan akar *Eurycoma longifolia* Jack. (pasak bumi) terhadap peningkatan kadar testosteron, LH, dan FSH serta perbedaan peningkatannya pada tikus jantan Sprague Dawley. Tesis. Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang. 64 p.
- Tave D. 1992. Genetics for Fish Hatchery Managers. An AVI book.
- Theodoridis, G., Helen, G.G., Wilson, I.D. 2008. LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. Trends in anal Chem. 27: 251-260. doi:10.1016/j.trac.2008.01.008.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., 2011, Phytochemical Screening and Extraction: A Review, International Pharmaceutical Sciencia Volume 1, Issue 1.
- Tremblay, L. dan Van Der Kraak, G. 1998. Use of a series of homologous *in vitro* and *in vivo* assays to evaluate the endocrine modulating actions of  $\beta$ - sitosterol in rainbow trout. Aquatic Toxicology 43; 149–162.
- Triajie, H. 2008. Efektivitas ekstrak teripang pasir yang telah diformulasikan terhadap maskulinisasi udang galah. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Istitut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Turner, E.M. dan Baghara, D.A. 1976. Hormonal Enchanment of Growth In Fish Physiology Vol VIII. Academic Press. New York.
- Ueda, J., Tezuka, Y., Banskota, A.H., Tran, Q.L., Tran, Q.K., Harimaya, Y., Saiki, I., Kadota, S. 2002. Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants. Biol Pharm Bull 25:753–60.
- Varadaraj, K. dan Pandian, T.J. 1990. Production of all female sterile triploid *Oreochromis mossambicus*. Aquaculture 84 : 117 – 123.



Vickery, M.L. dan Vickery, B. 1981. Secondary Plant Metabolism. The Macmillan Press LTD. London.

Wassermann, G.J., Afonso, L.O.B. 2003. Sex reversal in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus by androgen immersion. *Aquaculture Research*. 34: 65-71.

Wichins, F.F. and Lee, D.O.C. 2002. Crustacean Farming (Raching and Culture). Iowa State University Press. Blackwell Science Company. USA.446 pp.

Wijaya, P.D.H., 2017. Maskulinisasi ikan *Sinodontis eupterus* pada stadia larva menggunakan ekstrak cabe jawa *Piper retrofractum*. Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.

Winarno, F.G. 2008. Kimia Pangan dan Gizi. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama.

Wong, K.M. dan Soepadmo, E. 1995. *Tree Flora of Sabah and Sarawak*. Vol ke-1. Sabah: Sabah Forestry Departement and Forest Research Institute Malaysia.

Wozniak, A., Holman, S.D., Hutchinson, J.B. (1992) In vitro potency and selectivity of the nonsteroidal androgen aromatase inhibitor CGS 16949A compared to steroidal inhibitors in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:281-287.

Xiong, Y., Yuan, C., Chen, R., Dawson, T.M., Dawson, V.L. 2010. Preparation and biological activity saponin *Ophiogon japonicas*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(26):1964-1970.

Yamazaki, F. 1983. Sex Control and Manipulation in Fish. *Aquaculture* 33: 329-354.

Yatim, W. 1986. Genetika untuk Mahasiswa. Penerbit Tarsito. Bandung.

Yunizal, 1998. Prosedur Analisa Kimiawi dan Produk Olahan Hasil-hasil Perikanan. BRKP Slipi. Jakarta: BRKP DKP RI.

Yusrina, W. 2015. Maskulinisasi Ikan Guppy (*Poecilia reticulata*) dengan Ekstrak Cabe Jawa (*Piper retrofractum Vahl*) melalui Perendaman Induk Bunting. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Zairin, Jr.M. 2002. *Sex Reversal: Memproduksi Benih Ikan Jantan atau Betina*. Penebar Swadaya. Jakarta.

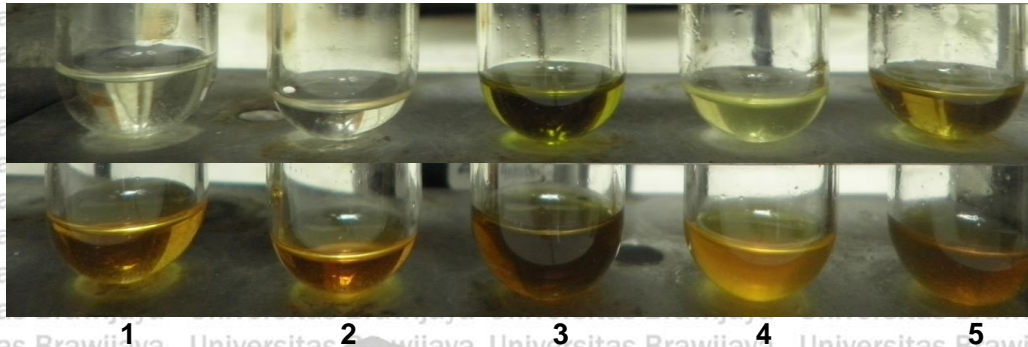
Zairin Jr.M. 2003. Endokrinologi dan Peranannya Bagi Masa Depan Perikanan Indonesia. Orasi Ilmiah Pengukuhan Guru Besar Tetap Ilmu Fisiologi Reproduksi dan Endokrinologi Hewan Air. Institut Pertanian Bogor.





# LAMPIRAN

### Lampiran 1. Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Tumbuhan Pasak Bumi



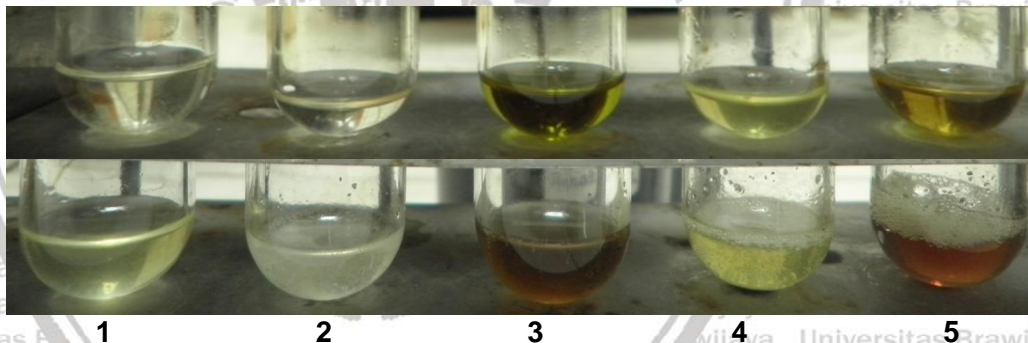
Keterangan:

- A= Ekstrak sebelum uji  
 B= Setelah diuji (Reagen Wagner)  
 1= Ekstrak Akar  
 2= Ekstrak Batang  
 3= Ekstrak Daun  
 4= Ekstrak Kulit  
 5= Ekstrak Ranting

Hasil:

- 1 = -  
 2 = -  
 3 = -  
 4 = -  
 5 = -  
 Tidak terdeteksi alkaloid

#### Uji Alkaloid



Keterangan:

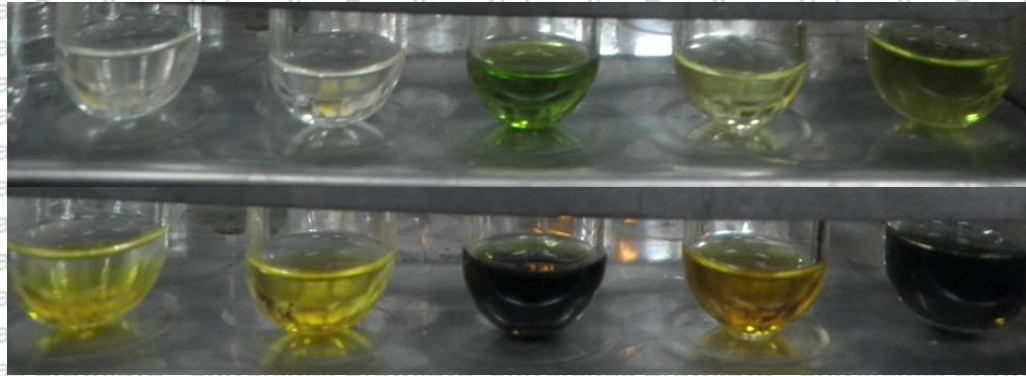
- A= Ekstrak sebelum uji  
 B= Setelah diuji (HCl dan Mg)  
 1= Ekstrak Akar  
 2= Ekstrak Batang  
 3= Ekstrak Daun  
 4= Ekstrak Kulit  
 5= Ekstrak Ranting

Hasil:

- 1 = - Akar tidak terdeteksi flavonoid  
 2 = - Batang tidak terdeteksi flavonoid  
 3 = ++++ Daun mengandung flavonoid dengan kadar yang tinggi  
 4 = - Kulit tidak terdeteksi flavonoid  
 5 = ++++ Ranting mengandung flavonoid dengan kadar yang tinggi

#### Uji Flavonoid





Keterangan:

A= Ekstrak sebelum uji

B= Setelah diuji ( $\text{FeCl}_3$ )

1= Ekstrak Akar

2= Ekstrak Batang

3= Ekstrak Daun

4= Ekstrak Kulit

5= Ekstrak Ranting

Hasil: + bila larutan berubah warna menjadi kehitaman

1 = - Akar tidak terdeteksi fenolik

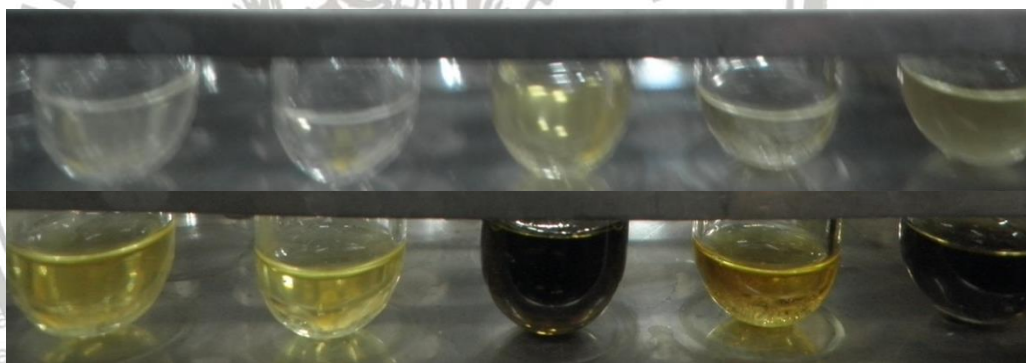
2 = - Batang tidak terdeteksi fenolik

3 = ++++ Daun mengandung fenolik dengan kadar yang tinggi

4 = - Kulit tidak terdeteksi fenolik

5 = ++++ Ranting mengandung fenolik dengan kadar yang tinggi

#### Uji Fenolik



Keterangan:

A= Ekstrak sebelum uji

B= Setelah diuji ( $\text{FeCl}_3$ )

1= Ekstrak Akar

2= Ekstrak Batang

3= Ekstrak Daun

4= Ekstrak Kulit

5= Ekstrak Ranting

Hasil: + bila larutan berubah warna menjadi kehitaman

1 = - Akar tidak terdeteksi tanin

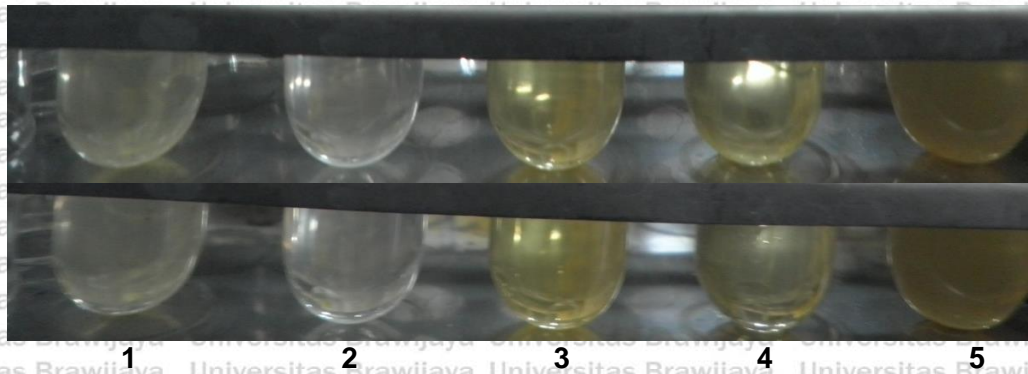
2 = - Batang tidak terdeteksi tanin

3 = ++++ Daun mengandung tanin dengan kadar yang tinggi

4 = - Kulit tidak terdeteksi tanin

5 = ++++ Ranting mengandung tanin dengan kadar yang tinggi

#### Uji Tannin



Keterangan:

A= Ekstrak sebelum uji

B= Setelah diuji (FeCl<sub>3</sub>)

1= Ekstrak Akar

2= Ekstrak Batang

3= Ekstrak Daun

4= Ekstrak Kulit

5= Ekstrak Ranting

Hasil: + bila berwarna kemerahan

1 = ++++ Akar mengandung saponin

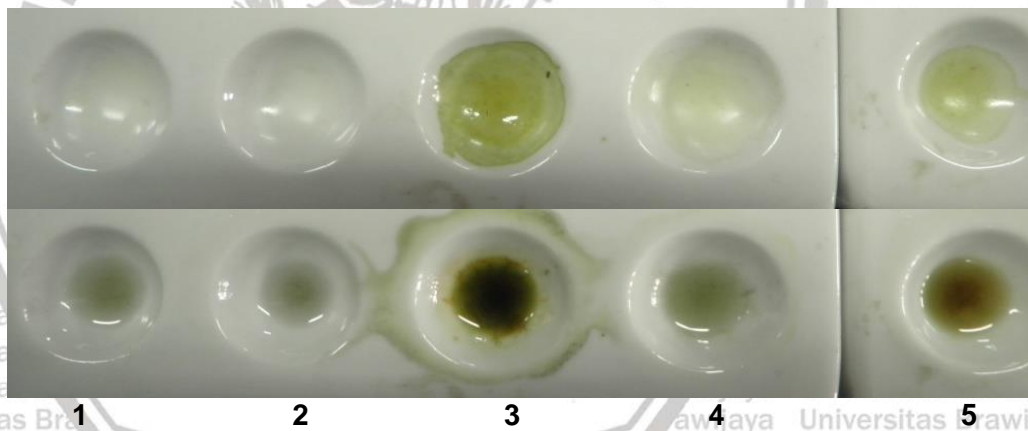
2 = + Batang mengandung saponin

3 = - Daun tidak mengandung saponin

4 = ++++ Kulit mengandung saponin

5 = +++ Ranting mengandung saponin

## Uji Saponin



Keterangan:

A= Ekstrak sebelum uji

B= Setelah diuji (Liebermann Burchad)

1= Ekstrak Akar

2= Ekstrak Batang

3= Ekstrak Daun

4= Ekstrak Kulit

5= Ekstrak Ranting

Hasil: + triterpenoid bila berubah warna

menjadi coklat atau merah

+ Steroid bila berubah warna

menjadi hijau atau biru

1 = ++ Akar mengandung steroid

2 = ++ Batang mengandung steroid

3 = ++++ Daun mengandung steroid dan

triterpenoid

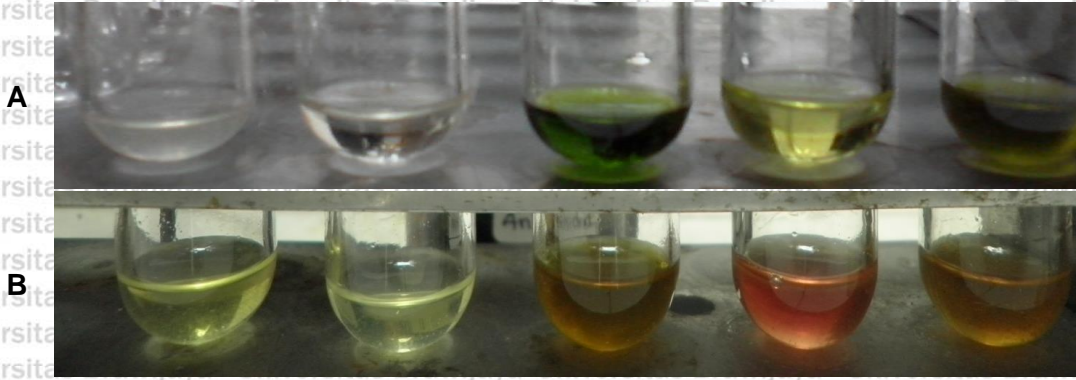
4 = ++ Kulit mengandung Steroid

5 = +++ Ranting mengandung steroid dan

triterpenoid

## Uji Terpenoid - Steroid





Keterangan:

A= Ekstrak sebelum uji

B= Setelah diuji

1= Ekstrak Akar

2= Ekstrak Batang

3= Ekstrak Daun

4= Ekstrak Kulit

5= Ekstrak Ranting

Hasil: + bila berwarna kemerahan

1 = - Akar mengandung kuinon

2 = - Batang tidak terdeteksi kuinon

3 = + Daun mengandung kuinon

4 = ++++ Kulit mengandung kuinon

5 = + Ranting mengandung kuinon

Uji Kuinon

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran 2. Perbandingan Efektivitas Metode Pengekstraksi Pada Bagian Tumbuhan Pasak Bumi

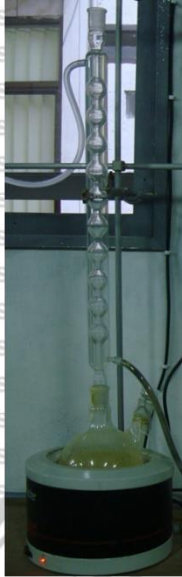
### Perbandingan Efektivitas Metode Pengekstraksi Pada Bagian Tumbuhan Pasak Bumi

Bagian Tumbuhan	Metode	Pelarut yang digunakan untuk mengekstrak			
		Metanol	Aseton	Kloroform	Klo-Met
Akar	Masserasi	Sampel : 30 Ekstrak : 1,29 Rendemen: 2,15	Sampel : 30 Ekstrak : 0,32 Rendemen: 0,54	Sampel : 30 Ekstrak : 5,72 Rendemen: 9,53	Sampel : 30 Ekstrak : 2,23 Rendemen: 4,74
	Soxhletasi	Sampel : 30 Ekstrak : 2,71 Rendemen: 4,52	Sampel : 30 Ekstrak : 1,99 Rendemen: 3,31	Sampel : 30 Ekstrak : 0,34 Rendemen: 0,43	Sampel : 30 Ekstrak : 0,10 Rendemen: 1,66
	Reflux	Sampel : 30 Ekstrak : 3,69 Rendemen: 9,22	Sampel : 30 Ekstrak : 0,15 Rendemen: 0,50	Sampel : 30 Ekstrak : 0,16 Rendemen: 0,53	Sampel : 30 Ekstrak : 0,83 Rendemen: 4,16
Batang	Masserasi	Sampel : 30 Ekstrak : 2,63 Rendemen: 1,32	Sampel : 30 Ekstrak : 0,45 Rendemen: 3,27	Sampel : 30 Ekstrak : 0,08 Rendemen: 0,20	Sampel : 30 Ekstrak : 0,89 Rendemen: 2,23
	Soxhletasi	Sampel : 30 Ekstrak : 0,34 Rendemen: 3,45	Sampel : 30 Ekstrak : 0,96 Rendemen: 2,41	Sampel : 30 Ekstrak : 0,04 Rendemen: 0,10	Sampel : 30 Ekstrak : 0,28 Rendemen: 2,83
	Reflux	Sampel : 30 Ekstrak : 0,42 Rendemen: 4,30	Sampel : 30 Ekstrak : 0,15 Rendemen: 1,53	Sampel : 30 Ekstrak : 0,03 Rendemen: 2,55	Sampel : 30 Ekstrak : 0,35 Rendemen: 1,77
Daun	Masserasi	Sampel : 30 Ekstrak : 0,40 Rendemen: 1,67	Sampel : 30 Ekstrak : 0,16 Rendemen: 2,26	Sampel : 30 Ekstrak : 0,31 Rendemen: 1,87	Sampel : 30 Ekstrak : 0,14 Rendemen: 1,99
	Soxhletasi	Sampel : 30 Ekstrak : 0,80 Rendemen: 3,26	Sampel : 30 Ekstrak : 0,13 Rendemen: 1,48	Sampel : 30 Ekstrak : 0,41 Rendemen: 3,25	Sampel : 30 Ekstrak : 0,31 Rendemen: 1,89
	Reflux	Sampel : 30 Ekstrak : 0,68 Rendemen: 3,87	Sampel : 30 Ekstrak : 0,31 Rendemen: 3,28	Sampel : 30 Ekstrak : 0,22 Rendemen: 3,13	Sampel : 30 Ekstrak : 0,21 Rendemen: 1,82
Kulit	Masserasi	Sampel : 30 Ekstrak : 0,20 Rendemen: 1,32	Sampel : 30 Ekstrak : 0,37 Rendemen: 2,49	Sampel : 30 Ekstrak : 0,04 Rendemen: 0,26	Sampel : 30 Ekstrak : 0,26 Rendemen: 1,71
	Soxhletasi	Sampel : 30 Ekstrak : 0,50 Rendemen: 3,37	Sampel : 30 Ekstrak : 0,13 Rendemen: 0,89	Sampel : 30 Ekstrak : 0,10 Rendemen: 0,66	Sampel : 30 Ekstrak : 0,38 Rendemen: 2,57
	Reflux	Sampel : 30 Ekstrak : 0,46 Rendemen: 3,08	Sampel : 30 Ekstrak : 0,08 Rendemen: 1,12	Sampel : 30 Ekstrak : 0,06 Rendemen: 0,85	Sampel : 30 Ekstrak : 0,42 Rendemen: 2,80
Ranting	Masserasi	Sampel : 30 Ekstrak : 0,75 Rendemen: 3,12	Sampel : 30 Ekstrak : 0,18 Rendemen: 0,76	Sampel : 30 Ekstrak : 0,07 Rendemen: 0,28	Sampel : 30 Ekstrak : 0,31 Rendemen: 1,29
	Soxhletasi	Sampel : 30 Ekstrak : 1,46 Rendemen: 6,09	Sampel : 30 Ekstrak : 0,23 Rendemen: 0,96	Sampel : 30 Ekstrak : 0,04 Rendemen: 0,61	Sampel : 30 Ekstrak : 1,32 Rendemen: 0,55
	Reflux	Sampel : 30 Ekstrak : 0,51 Rendemen: 4,22	Sampel : 30 Ekstrak : 0,24 Rendemen: 1,98	Sampel : 30 Ekstrak : 0,11 Rendemen: 0,44	Sampel : 30 Ekstrak : 1,02 Rendemen: 4,24

Keterangan: Sampel (gram), Ekstrak (gram), Rendemen (%)



### Lampiran 3. Isolasi Ekstrak Kolom Stigmasterol dari Akar Tumbuhan Pasak Bumi



Ekstraksi sampel dengan metode reflux



Penyaringan sampel



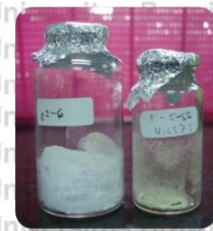
Evaporasi/pemekatan sampel



Ekstrak metanol

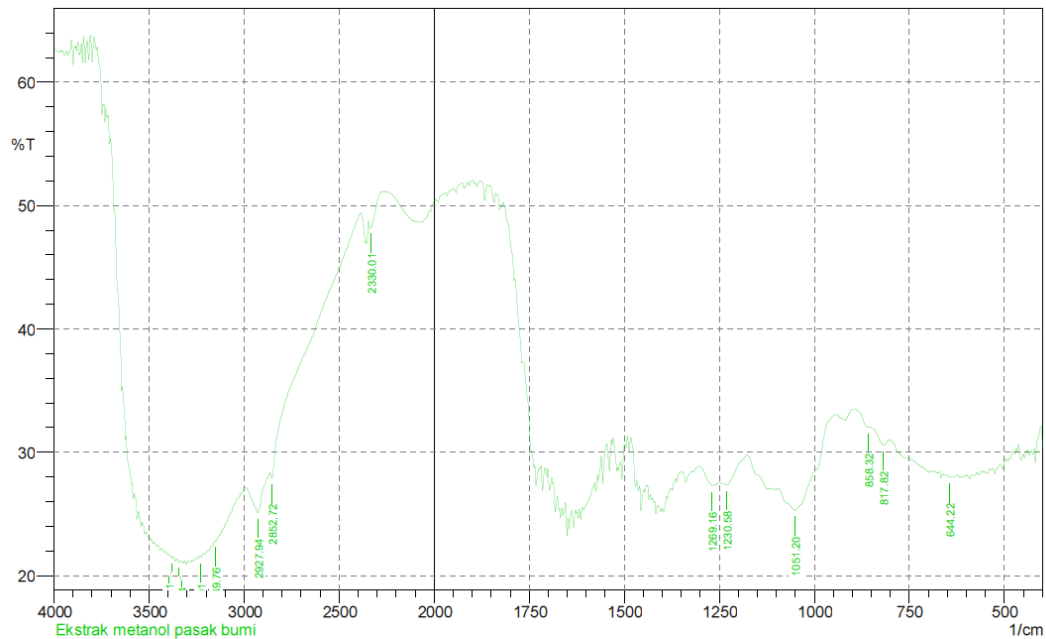


Proses pemisahan ekstrak metanol dengan metode kromatografi kolom

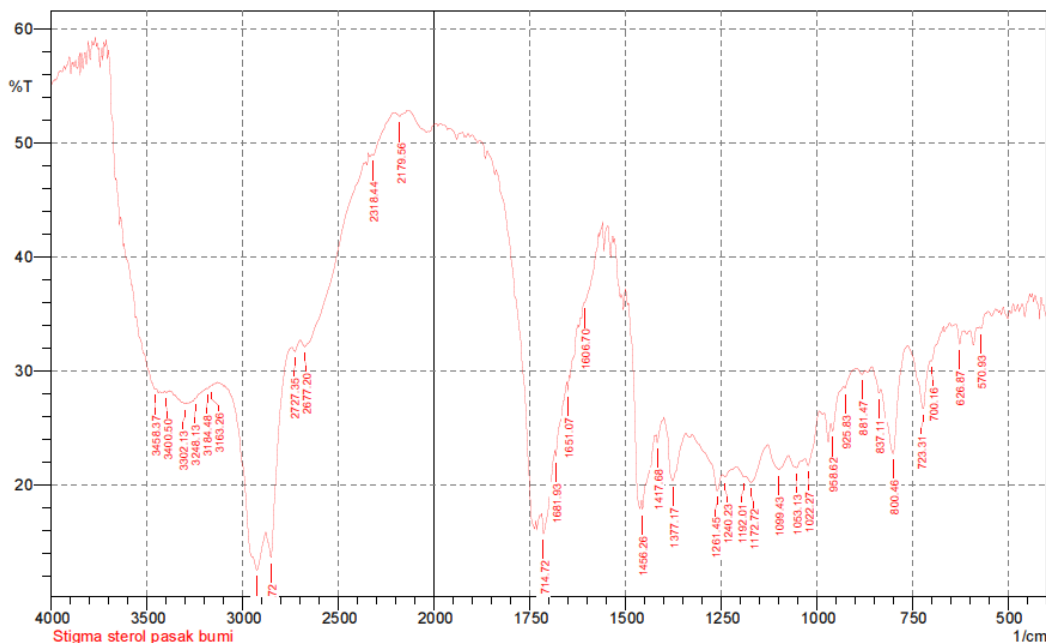


Kristal stigmasterol

Lampiran 4. Spektroskopi (FTIR) Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi



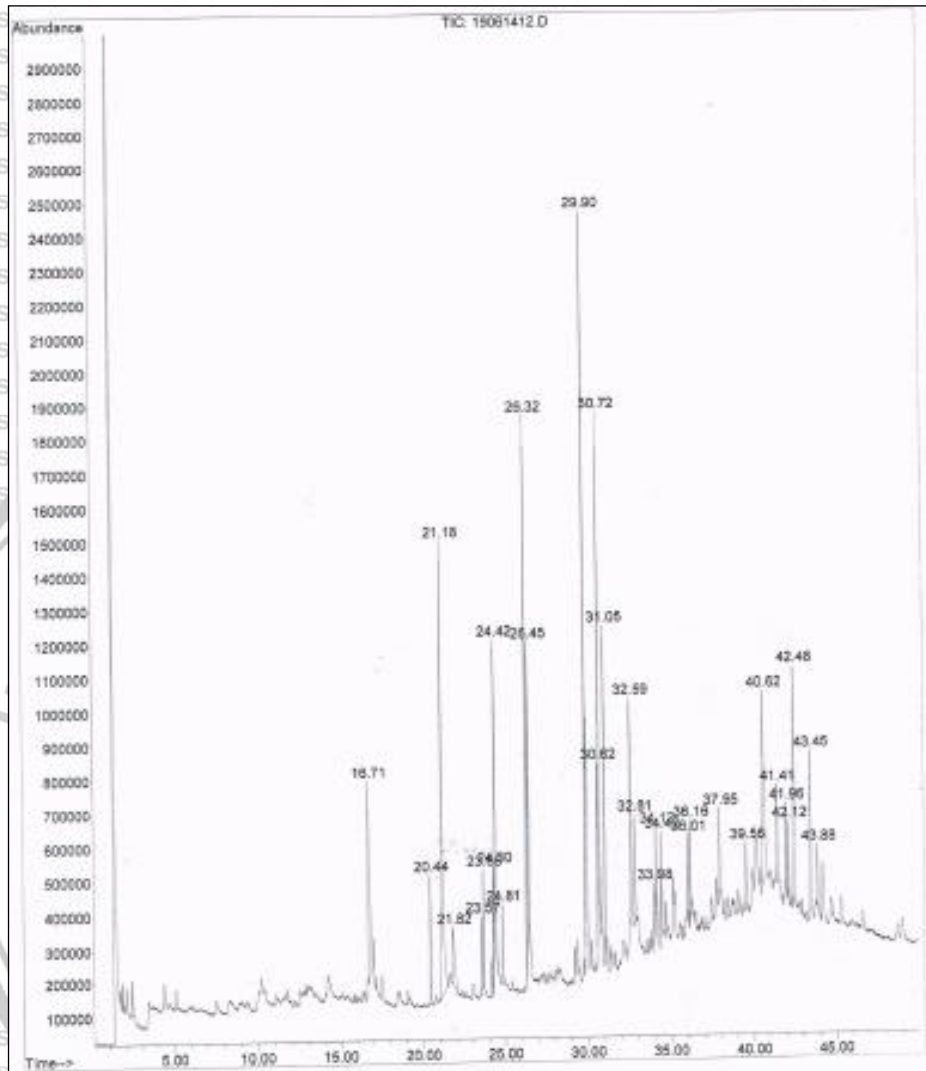
Spektrum inframerah dari ekstrak metanol tumbuhan Pasak Bumi



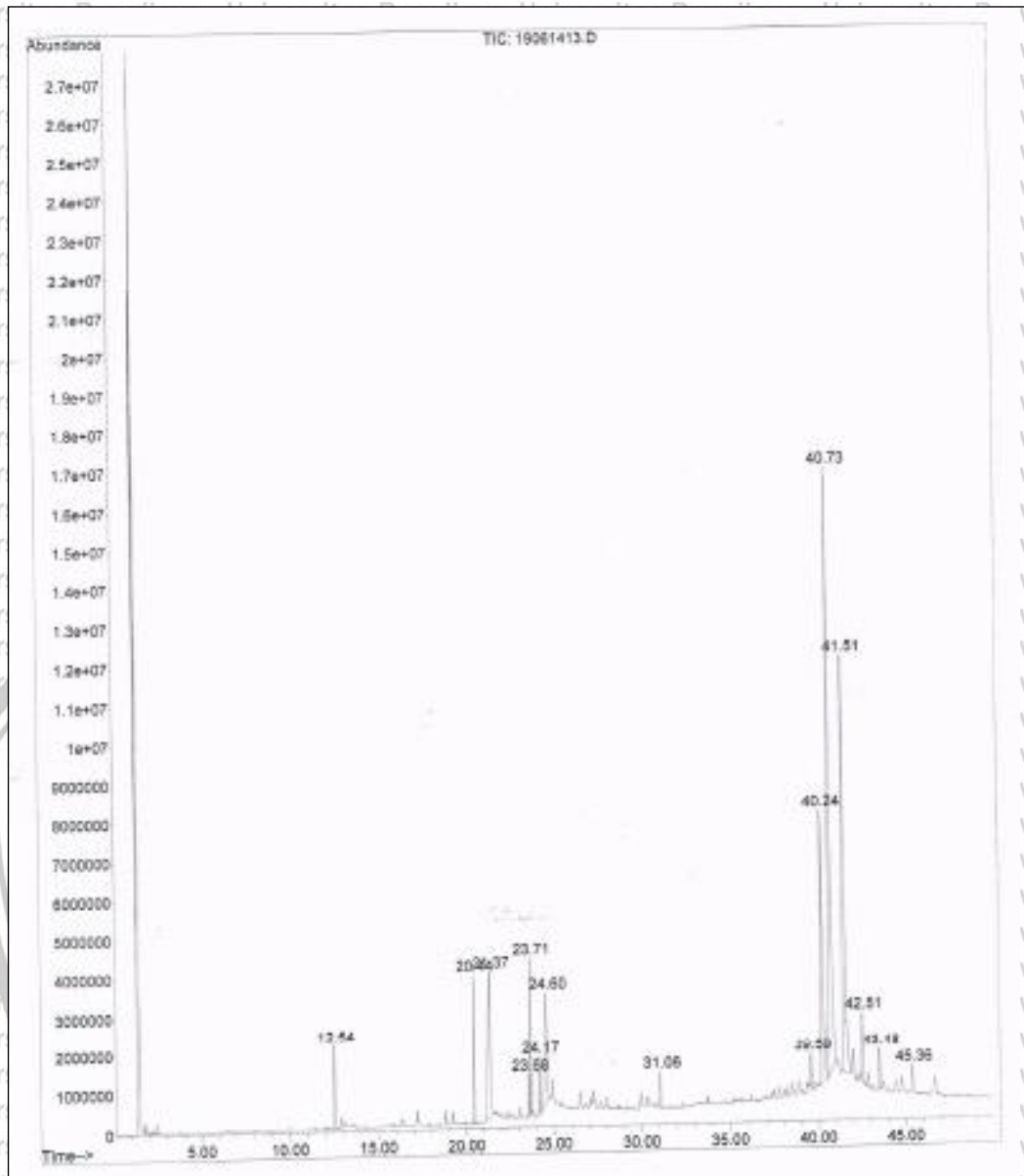
Spektrum inframerah dari stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi



### Lampiran 5. Profiling GC-MS Ekstrak Metanol dan Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi



Profiling sampel GCMS ekstrak metanol tumbuhan Pasak Bumi



Profiling sampel GC-MS stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi



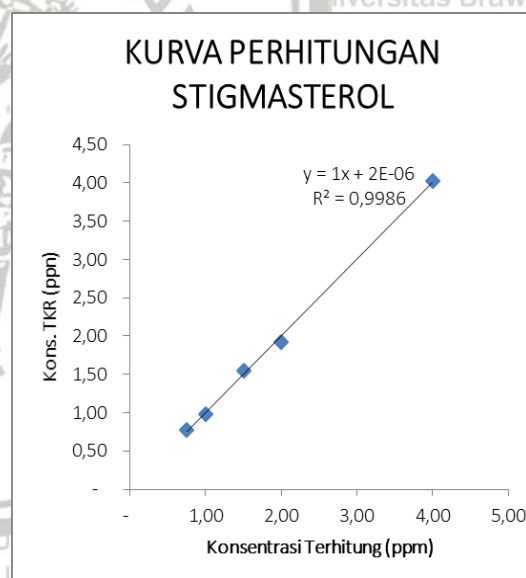
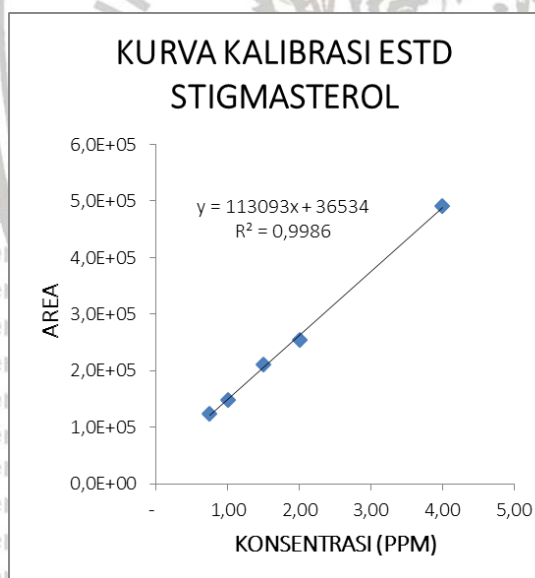
### Lampiran 6. LC-MS Ekstrak Metanol dan Stigmasterol Tumbuhan Pasak Bumi

Perhitungan standar stigmasterol

No	Nama STANDARD	Kons. (PPM)	(Area)	KONS. TKR (ppm)	KONS. THT (ppm)	RECOVERY
1	STANDARD 1	0,75	123.866,00	0,77	0,77	1,03
2	STANDARD 2	1,00	148.123,00	0,99	0,99	0,99
3	STANDARD 3	1,50	211.717,00	1,55	1,55	1,03
4	STANDARD 4	2,00	253.968,00	1,92	1,92	0,96
5	STANDARD 5	4,00	491.111,00	4,02	4,02	1,00

Keterangan:

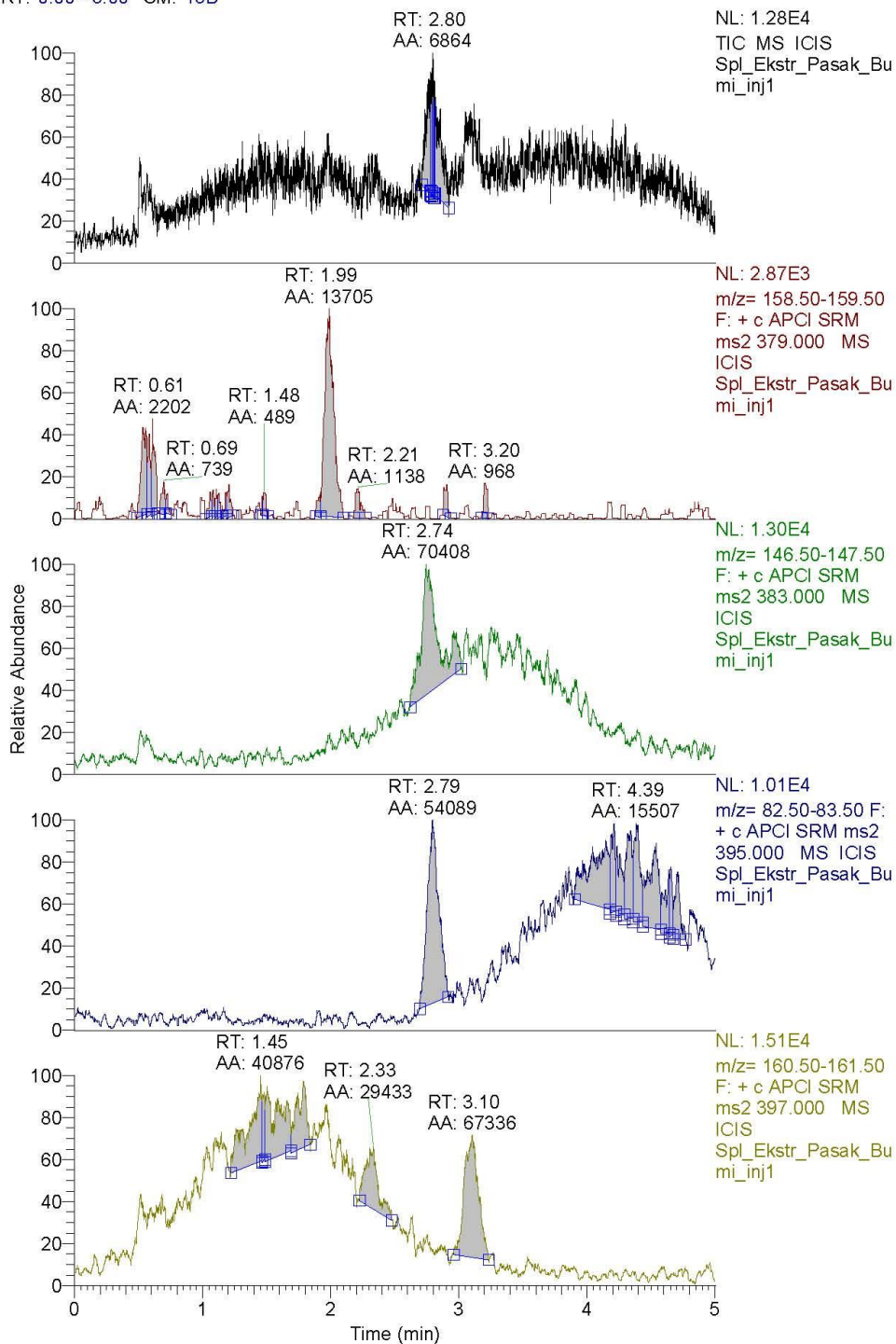
TKR = Terukur; THT = Terhitung; AVG = 1,00; STD DEV = 0,03; % RSD = 2,99



Kurva kalibrasi ESTD stigmasterol dan kurva perhitungan stigmasterol

Spl\_Ekstr\_Pasak\_Bumi\_inj1

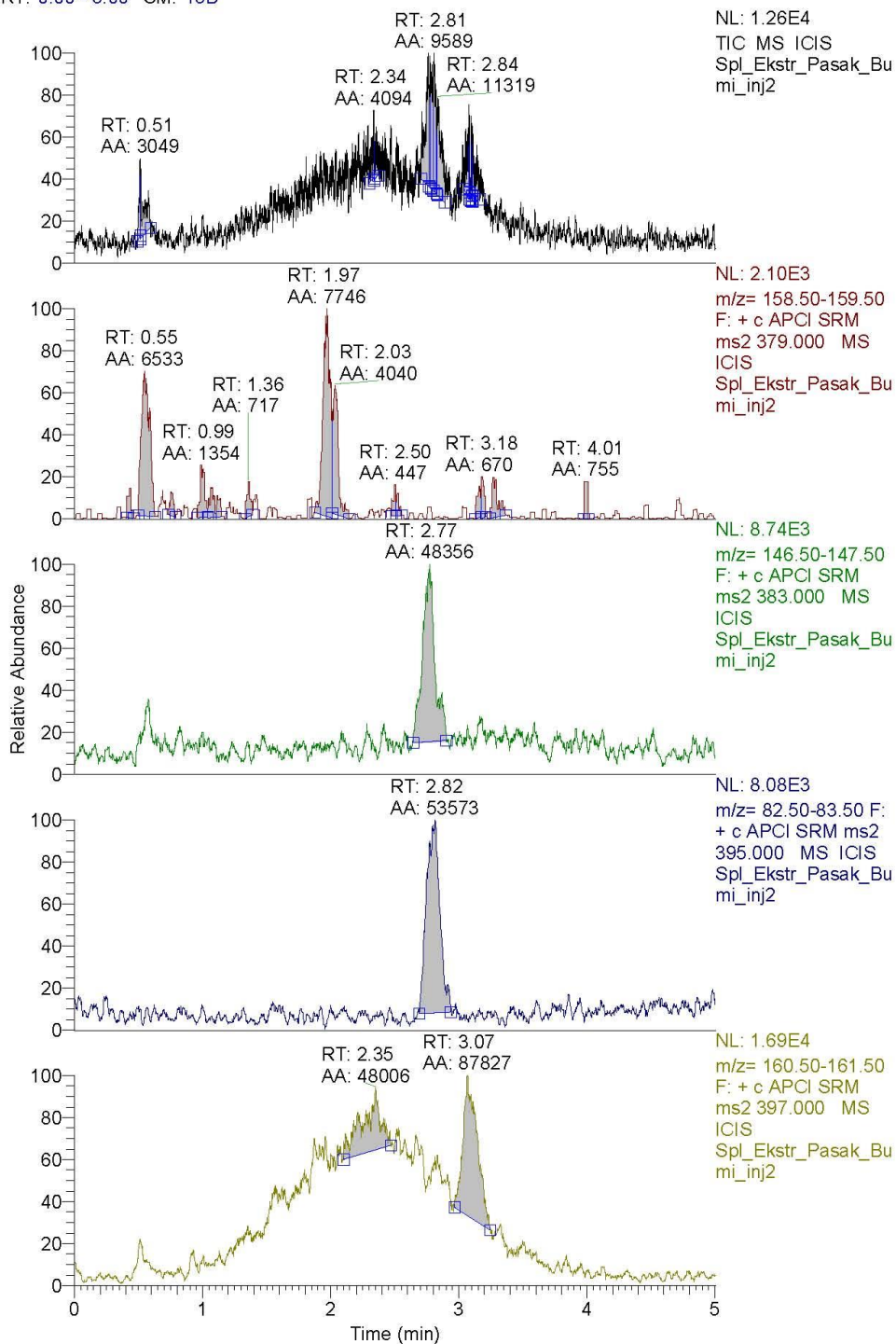
RT: 0.00 - 5.00 SM: 15B





Spl\_Ekstr\_Pasak\_Bumi\_inj2

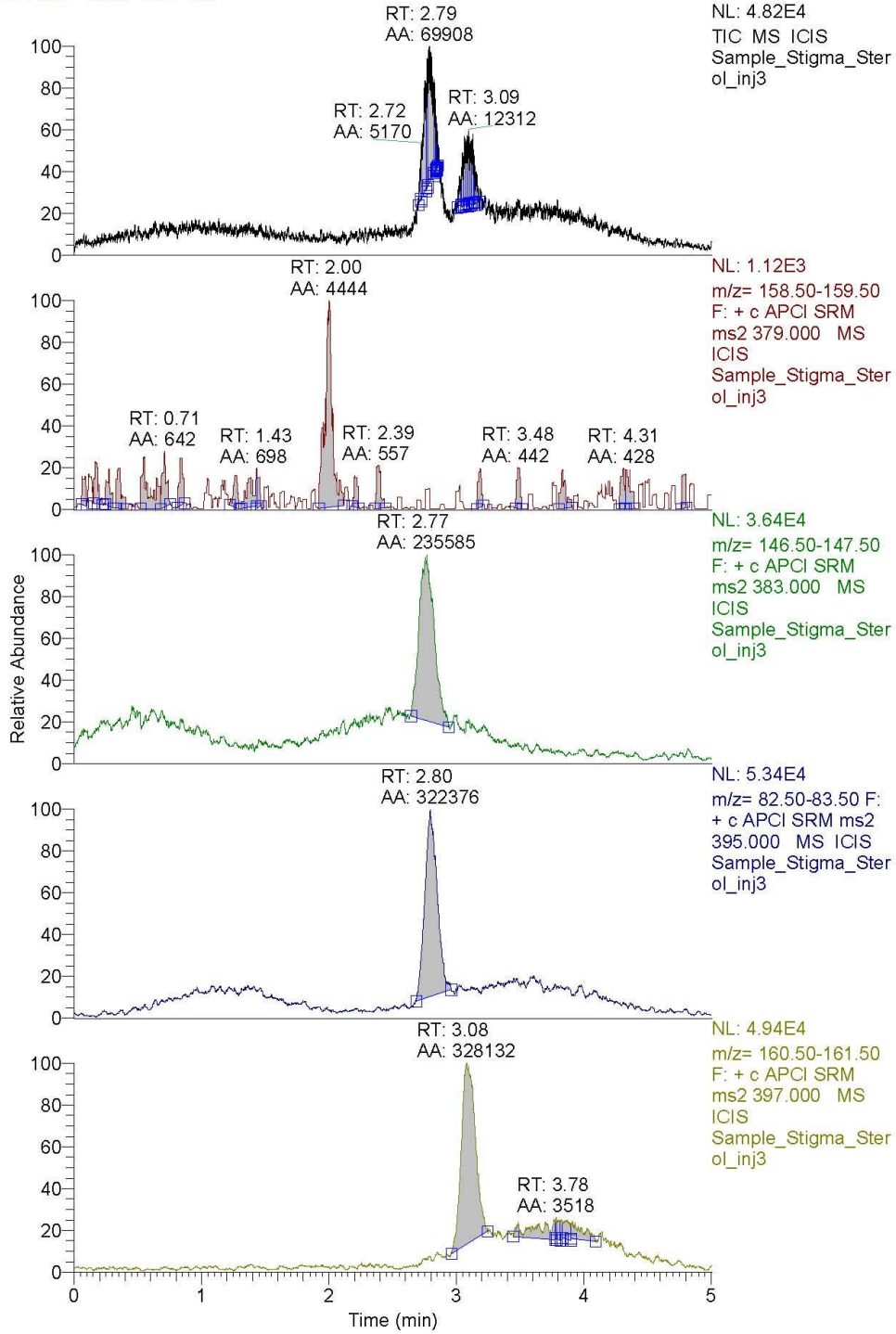
RT: 0.00 - 5.00 SM: 15B





Sample\_Stigma\_Sterol\_inj3

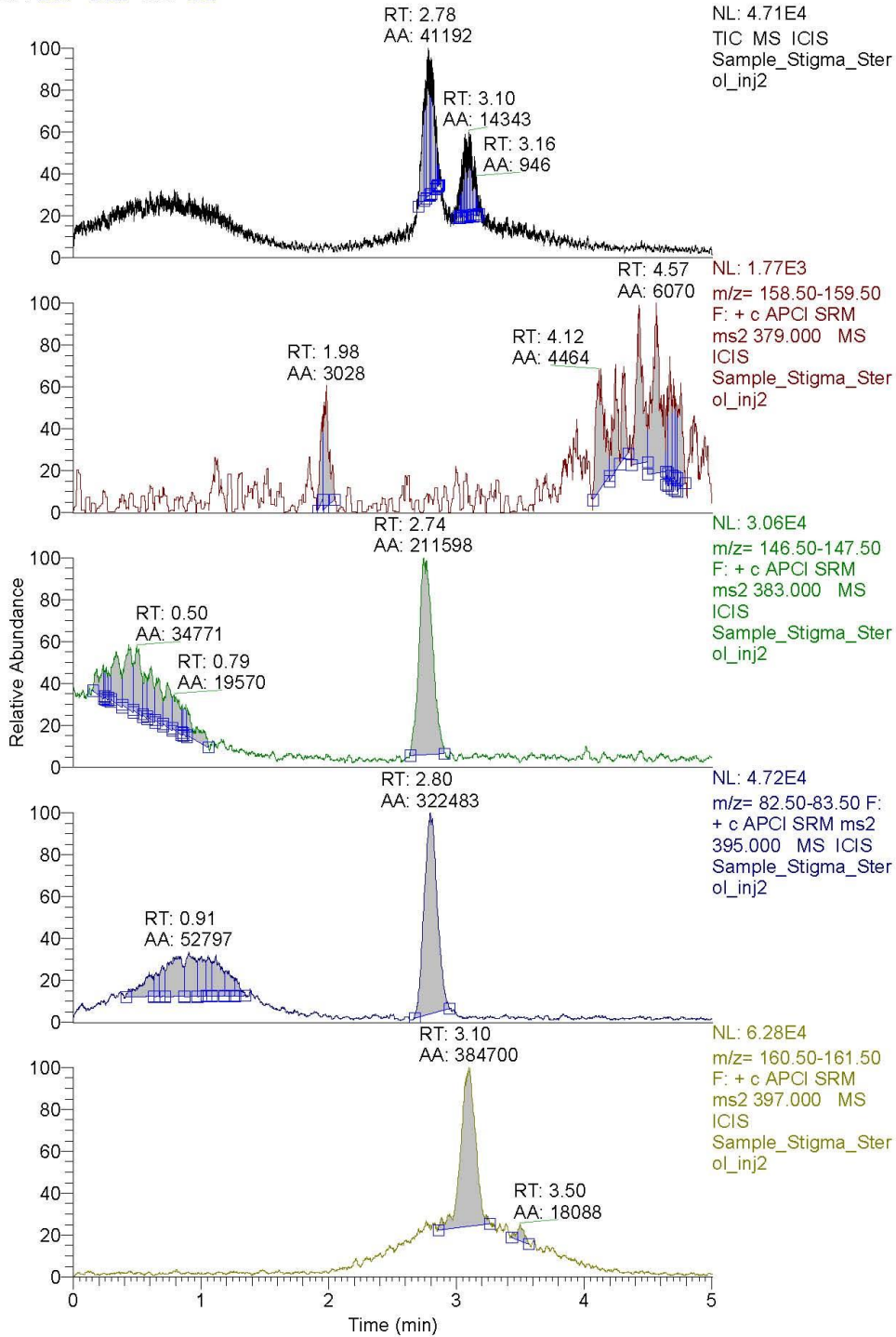
RT: 0.00 - 5.00 SM: 15B





Sample\_Stigma\_Sterol\_inj2

RT: 0.00 - 5.00 SM: 15B



**Lampiran 7. LC-MS/MS Asam Amino Bebas Ekstrak Metanol dan Ekstrak Kolom Stigmasterol Akar Tumbuhan Pasak Bumi**

**LC-MS/MS Asam Amino Bebas Ekstrak Akar Tumbuhan Pasak Bumi**

No.	Measurand	Ppm (mg/kg)	
		RL	Result
1.	Alanine	20,0	173
2.	Argine	20,0	2.360
3.	Asparagine	20,0	67,4
4.	Aspartic Acid	20,0	633
5.	Cysteine	20,0	ND
6.	Glutamic Acid	20,0	1.230
7.	Glutamine	20,0	17,5
8.	Glycine	20,0	24,4
9.	Histidine	20,0	47,2
10.	Isoleucine	20,0	48,7
11.	Leucine	20,0	25,7
12.	Lysine	20,0	32,8
13.	Methionine	20,0	ND
14.	Phenylalanine	20,0	56,7
15.	Proline	20,0	802
16.	Seleno-L-cystein	20,0	ND
17.	Serine	20,0	69,3
18.	Threonine	20,0	42,9
19.	Tran-4-hidroxy-L-Proline	20,0	10,1
20.	Tryptophan	20,0	10,4
21.	Tyrosine	20,0	183
22.	Valine	20,0	56,1

Note :

ND : Not Detected

LoQ : Limit of Quantitation.

Lowest level for which it has been demonstrated that criteria for accuracy and precision have been met, measured once during method validation.

RL : Reporting Limit = practical LoQ. RL is measured every analysis batch.



## LC-MS/MS Asam Amino Bebas Ekstrak Akar Tumbuhan Pasak Bumi

No.	Measurand	Ppm (mg/kg)	
		RL	Result
1.	Alanine	20,0	ND
2.	Argine	20,0	ND
3.	Asparagine	20,0	ND
4.	Aspartic Acid	20,0	ND
5.	Cysteine	20,0	ND
6.	Glutamic Acid	20,0	ND
7.	Glutamine	20,0	ND
8.	Glycine	20,0	ND
9.	Histidine	20,0	ND
10.	Isoleucine	20,0	ND
11.	Leucine	20,0	ND
12.	Lysine	20,0	ND
13.	Methionine	20,0	ND
14.	Phenylalanine	20,0	0,42
15.	Proline	20,0	ND
16.	Seleno-L-cystein	20,0	ND
17.	Serine	20,0	0,42
18.	Threonine	20,0	ND
19.	Tran-4-hidroxy-L-Proline	20,0	ND
20.	Tryptophan	20,0	ND
21.	Tyrosine	20,0	ND
22.	Valine	20,0	ND

Note :

ND : Not Detected

LoQ : Limit of Quantitation.

Lowest level for which it has been demonstrated that criteria for accuracy and precision have been met, measured once during method validation.

RL : Reporting Limit = practical LoQ. RL is measured every analysis batch.

Lampiran 8. Data dan uji statistik jumlah prosentase jenis kelamin ikan nila dengan perendaman ekstrak metanol tumbuhan Pasak Bumi.

Perlakuan	Ulangan	Σ Sampel	Σ Jantan	Σ Intersex	Σ Betina	Jantan (%)	Intersex (%)	Betina (%)
EPB1	1	40	28	4	8	70,00	10,00	20,00
	2	39	28	5	6	71,79	12,82	15,38
	3	42	32	3	7	76,19	7,14	16,67
<b>TOTAL</b>		<b>121,00</b>	<b>88,00</b>	<b>12,00</b>	<b>21,00</b>	<b>217,99</b>	<b>29,96</b>	<b>52,05</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>40,33</b>	<b>29,33</b>	<b>4,00</b>	<b>7,00</b>	<b>72,66</b>	<b>9,99</b>	<b>17,35</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,528</b>	<b>2,309</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>3,185</b>	<b>2,839</b>	<b>2,382</b>
EPB2	1	44	32	4	8	72,73	9,09	18,18
	2	41	31	4	6	75,61	9,76	14,63
	3	43	34	2	7	79,07	4,65	16,28
<b>TOTAL</b>		<b>128,00</b>	<b>97,00</b>	<b>10,00</b>	<b>21,00</b>	<b>227,41</b>	<b>23,50</b>	<b>49,10</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>42,67</b>	<b>32,33</b>	<b>3,33</b>	<b>7,00</b>	<b>75,80</b>	<b>7,83</b>	<b>16,37</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,528</b>	<b>1,528</b>	<b>1,155</b>	<b>1,000</b>	<b>3,176</b>	<b>2,775</b>	<b>1,775</b>
EPB3	1	44	33	4	7	75,00	9,09	15,91
	2	40	30	5	5	75,00	12,50	12,50
	3	43	34	3	6	79,07	6,98	13,95
<b>TOTAL</b>		<b>127,00</b>	<b>97,00</b>	<b>12,00</b>	<b>18,00</b>	<b>229,07</b>	<b>28,57</b>	<b>42,36</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>42,33</b>	<b>32,33</b>	<b>4,00</b>	<b>6,00</b>	<b>76,36</b>	<b>9,52</b>	<b>14,12</b>
<b>STDEV</b>		<b>2,082</b>	<b>2,082</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>2,350</b>	<b>2,787</b>	<b>1,711</b>
K+	1	42	36	3	3	85,71	7,14	7,14
	2	43	34	5	4	79,07	11,63	9,30
	3	39	34	2	3	87,18	5,13	7,69
<b>TOTAL</b>		<b>124,00</b>	<b>104,00</b>	<b>10,00</b>	<b>10,00</b>	<b>251,96</b>	<b>3,90</b>	<b>24,14</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,33</b>	<b>34,67</b>	<b>3,33</b>	<b>3,33</b>	<b>83,99</b>	<b>7,97</b>	<b>8,05</b>
<b>STDEV</b>		<b>2,082</b>	<b>1,155</b>	<b>1,528</b>	<b>0,577</b>	<b>4,322</b>	<b>3,327</b>	<b>1,122</b>
K-	1	43	21	0	22	48,84	-	51,16
	2	39	22	0	17	56,41	-	43,59
	3	43	23	0	20	53,49	-	46,51
<b>TOTAL</b>		<b>125,00</b>	<b>66,00</b>	<b>-</b>	<b>59,00</b>	<b>158,74</b>	<b>-</b>	<b>141,26</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,67</b>	<b>22,00</b>	<b>-</b>	<b>19,67</b>	<b>52,91</b>	<b>-</b>	<b>47,09</b>
<b>STDEV</b>		<b>2,309</b>	<b>1,000</b>	<b>0,000</b>	<b>2,517</b>	<b>3,819</b>	<b>0,000</b>	<b>3,819</b>

Anova persentase (%) jantan dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for Jantan (%) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam)  
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	78505,00	1	78505,00	6651,382	0,000000
Perlakuan	1624,04	4	406,01	34,399	0,000008
Error	118,03	10	11,80		



### Uji Duncan persentase (%) ikan nila jantan dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi

Duncan test; variable Jantan (%) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 11,803, df = 10,000

Perlakuan	{1} - 72,662	{2} - 75,802	{3} - 76,357	{4} - 83,988	{5} - 52,912
1 EPB1					
2 EPB2	0,289206				
3 EPB3	0,237176	0,847427			
4 K+	0,003607	0,018949	0,021700		
5 K-	0,000210	0,000107	0,000075	0,000044	

### Anova persentase (%) ikan nila Intersex dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for Intersex (%) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	748,0517	1	748,0517	108,1067	0,000001
Perlakuan	197,6947	4	49,4237	7,1426	0,005510
Error	69,1957	10	6,9196		

### Uji Duncan Persentase (%) ikan nila Intersex dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak Bumi

Duncan test; variable Intersex (%) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 6,9196, df = 10,000

Perlakuan	{1} - 9,9878	{2} - 7,8327	{3} - 9,5226	{4} - 7,9663	{5} - 0,0000
1 EPB1					
2 EPB2	0,371022				
3 EPB3	0,832998	0,470138			
4 K+	0,390225	0,951738	0,485507		
5 K-	0,001607	0,004643	0,001984	0,005224	

Lampiran 9. Data dan uji statistik penambahan berat, SGP dan kelangsungan hidup ikan nila dengan perendaman Ekstrak metanol tumbuhan Pasak Bumi.

Perlakuan	Ulangan	Pertambahan Berat (g)	SGP (%)	Kelangsungan Hidup (%)
EPB1	1	8,248	0,137	80,000
	2	8,109	0,135	78,000
	3	7,839	0,130	84,000
<b>TOTAL</b>		<b>24,196</b>	<b>0,403</b>	<b>242,000</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>8,065</b>	<b>0,134</b>	<b>80,667</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,208</b>	<b>0,003</b>	<b>3,055</b>
EPB2	1	8,748	0,146	88,000
	2	9,199	0,153	82,000
	3	9,307	0,155	86,000
<b>TOTAL</b>		<b>27,254</b>	<b>0,454</b>	<b>256,000</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>9,085</b>	<b>0,151</b>	<b>85,333</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,297</b>	<b>0,005</b>	<b>3,055</b>
EPB3	1	8,647	0,144	88,000
	2	9,216	0,153	80,000
	3	9,205	0,153	86,000
<b>TOTAL</b>		<b>27,068</b>	<b>0,451</b>	<b>254,000</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>9,023</b>	<b>0,150</b>	<b>84,667</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,325</b>	<b>0,005</b>	<b>4,163</b>
K+	1	7,869	0,131	84,000
	2	8,178	0,136	86,000
	3	8,336	0,139	78,000
<b>TOTAL</b>		<b>24,383</b>	<b>0,406</b>	<b>248,000</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>8,128</b>	<b>0,135</b>	<b>82,667</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,238</b>	<b>0,004</b>	<b>4,163</b>
K-	1	7,362	0,123	86,000
	2	7,938	0,132	78,000
	3	8,098	0,135	86,000
<b>TOTAL</b>		<b>23,398</b>	<b>0,389</b>	<b>250,000</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>7,799</b>	<b>0,130</b>	<b>83,333</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,387</b>	<b>0,006</b>	<b>4,619</b>

Anova kelangsungan hidup (%) ikan nila dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for SR Diakhir (%) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam)						
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p	
Intercept	104166,7	1	104166,7	6975,446	0,000000	
Perlakuan	40,0	4	10,0	0,670	0,627687	
Error	149,3	10	14,9			



### Anova pertambahan berat (gram) dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for Berat Akhir (gram) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam)  
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1063,429	1	1063,429	11994,01	0,000000
Perlakuan	4,204	4	1,051	11,85	0,000822
Error	0,887	10	0,089		

### Uji Duncan pertambahan berat (gram) dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi

Duncan test; variable Berat Akhir (gram) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = ,08866, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - 8,0653	{2} - 9,0847	{3} - 9,0227	{4} - 8,1277	{5} - 7,7993
1 EPB1						
2 EPB2	0,002851					
3 EPB3	0,003649	0,804025				
4 K+	0,802996	0,003657	0,004396			
5 K-	0,299699	0,000661	0,000849	0,226336		

### Anova pertumbuhan spesifik harian (SGP) ikan nila dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for SGP (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	0,294556	1	0,294556	11993,01	0,000000
Perlakuan	0,001167	4	0,000292	11,88	0,000816
Error	0,000246	10	0,000025		

### Uji Duncan pertumbuhan spesifik harian (SGP) dengan perendaman ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi

Duncan test; variable SGP (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00002, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - ,13423	{2} - ,15121	{3} - ,15017	{4} - ,13526	{5} - ,12979
1 EPB1						
2 EPB2	0,002838					
3 EPB3	0,003649	0,801700				
4 MT	0,805821	0,003619	0,004370			
5 NH	0,298495	0,000656	0,000846	0,226615		

**Lampiran 10. Data dan uji statistik jumlah dan prosentase jenis kelamin ikan nila melalui pakan dengan penambahan ekstrak metanol akar tumbuhan pasak bumi.**

Perlakuan	Ulangan	Σ Sampel	Σ Jantan	Σ Intersex	Σ Betina	Jantan (%)	Intersex (%)	Betina (%)
EPB1	1	44	36	3	5	81,82	6,82	11,36
	2	43	36	2	5	83,72	4,65	11,63
	3	45	34	4	7	75,56	8,89	15,56
<b>TOTAL</b>		<b>132,00</b>	<b>106,00</b>	<b>9,00</b>	<b>17,00</b>	<b>241,09</b>	<b>20,36</b>	<b>38,55</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>44,00</b>	<b>35,33</b>	<b>3,00</b>	<b>5,67</b>	<b>80,36</b>	<b>6,79</b>	<b>12,85</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,00</b>	<b>1,15</b>	<b>1,00</b>	<b>1,15</b>	<b>4,27</b>	<b>2,12</b>	<b>2,35</b>
EPB2	1	46	37	4	5	80,43	8,70	10,87
	2	45	35	3	7	77,78	6,67	15,56
	3	42	37	2	3	88,10	4,76	7,14
<b>TOTAL</b>		<b>133,00</b>	<b>109,00</b>	<b>9,00</b>	<b>15,00</b>	<b>246,31</b>	<b>20,12</b>	<b>33,57</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>44,33</b>	<b>36,33</b>	<b>3,00</b>	<b>5,00</b>	<b>82,10</b>	<b>6,71</b>	<b>11,19</b>
<b>STDEV</b>		<b>2,08</b>	<b>1,15</b>	<b>1,00</b>	<b>2,00</b>	<b>5,36</b>	<b>1,97</b>	<b>4,22</b>
EPB3	1	44	35	4	5	79,55	9,09	11,36
	2	43	36	2	5	83,72	4,65	11,63
	3	42	34	3	5	80,95	7,14	11,90
<b>TOTAL</b>		<b>129,00</b>	<b>105,00</b>	<b>9,00</b>	<b>15,00</b>	<b>244,22</b>	<b>20,88</b>	<b>34,90</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>43,00</b>	<b>35,00</b>	<b>3,00</b>	<b>5,00</b>	<b>81,41</b>	<b>6,96</b>	<b>11,63</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>-</b>	<b>2,12</b>	<b>2,23</b>	<b>0,27</b>
K+	1	40	36	3	1	90,00	7,50	2,50
	2	42	37	3	2	88,10	7,14	4,76
	3	40	35	1	4	87,50	2,50	10,00
<b>TOTAL</b>		<b>122,00</b>	<b>108,00</b>	<b>7,00</b>	<b>7,00</b>	<b>265,60</b>	<b>17,14</b>	<b>17,26</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>40,67</b>	<b>36,00</b>	<b>2,33</b>	<b>2,33</b>	<b>88,53</b>	<b>5,71</b>	<b>5,75</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,15</b>	<b>1,00</b>	<b>1,15</b>	<b>1,53</b>	<b>1,31</b>	<b>2,79</b>	<b>3,85</b>
K-	1	43	22	0	21	51,16	0	48,84
	2	42	20	0	22	47,62	0	52,38
	3	41	20	0	21	48,78	0	51,22
<b>TOTAL</b>		<b>126,00</b>	<b>62,00</b>	<b>-</b>	<b>64,00</b>	<b>147,56</b>	<b>-</b>	<b>152,44</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>42,00</b>	<b>20,67</b>	<b>-</b>	<b>21,33</b>	<b>49,19</b>	<b>-</b>	<b>50,81</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,00</b>	<b>1,15</b>	<b>-</b>	<b>0,58</b>	<b>1,81</b>	<b>-</b>	<b>1,81</b>

**Anova presentase (%) jantan rata-rata ikan Nila melalui pakan dengan penambahan ekstrak Metanol Pasak Bumi**

Univariate Tests of Significance for Jantan (%) (Ekstrak Pasak Bumi Pakan)  
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	P
Intercept	87367,90	1	87367,90	7740,800	0,000000
Perlakuan	2882,92	4	720,73	63,857	0,000000
Error	112,87	10	11,29		



### Uji Duncan Presentase (%) jantan rata-rata ikan Nila melalui pakan dengan penambahan ekstrak Metanol Pasak Bumi

Duncan test; variable Jantan (%) (Ekstrak Pasak Bumi Pakan) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 11,287, df = 10,000

Perlakuan	{1} - 80,365	{2} - 82,103	{3} - 81,406	{4} - 88,532	{5} - 49,187
1 EPB1					
2 EPB2	0,559088				
3 EPB3	0,712303	0,804895			
4 MT	0,019388	0,041235	0,032189		
5 NH	0,000187	0,000068	0,000100	0,000044	

### Anova Presentase (%) intersex rata-rata ikan Nila melalui pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi

Univariate Tests of Significance for Intersex (%) (Ekstrak Pasak Bumi Pakan) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	410,9239	1	410,9239	97,40621	0,000002
Perlakuan	105,5761	4	26,3940	6,25649	0,008674
Error	42,1866	10	4,2187		

### Uji Duncan Presentase (%) intersex rata-rata ikan Nila melalui pakan dengan penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi

Duncan test; variable Intersex (%) (Ekstrak Pasak Bumi Pakan) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 4,2187, df = 10,000

Perlakuan	{1} - 6,7861	{2} - 6,7081	{3} - 6,9616	{4} - 5,7143	{5} - 0,0000
1 EPB1					
2 EPB2	0,963941				
3 EPB3	0,918832	0,888576			
4 MT	0,555675	0,566774	0,503102		
5 NH	0,003559	0,003315	0,003359	0,006840	

Lampiran 11. Data dan uji statistik pertambahan berat, SGP dan kelangsungan hidup ikan nila melalui pakan dengan penambahan ekstrak metanol tumbuhan Pasak Bumi.

Perlakuan	Ulangan	Pertambahan Berat (g)	SGP (%)	Kelangsungan Hidup (%)
EPB1	1	9,15	0,15	88,00
	2	10,11	0,17	86,00
	3	8,80	0,15	90,00
<b>TOTAL</b>		28,06	0,47	264,00
<b>RATA-RATA</b>		9,35	0,16	88,00
<b>STDEV</b>		0,68	0,01	2,00
EPB2	1	10,05	0,17	92,00
	2	9,21	0,15	90,00
	3	9,91	0,17	84,00
<b>TOTAL</b>		29,17	0,49	266,00
<b>RATA-RATA</b>		9,72	0,16	88,67
<b>STDEV</b>		0,45	0,01	4,16
EPB3	1	9,75	0,16	88,00
	2	10,01	0,17	86,00
	3	9,20	0,15	84,00
<b>TOTAL</b>		28,96	0,48	258,00
<b>RATA-RATA</b>		9,65	0,16	86,00
<b>STDEV</b>		0,41	0,01	2,00
K+	1	9,81	0,16	80,00
	2	10,17	0,17	84,00
	3	9,87	0,16	80,00
<b>TOTAL</b>		29,85	0,50	244,00
<b>RATA-RATA</b>		9,95	0,17	81,33
<b>STDEV</b>		0,19	0,003	2,31
K-	1	7,80	0,13	86,00
	2	7,94	0,13	84,00
	3	8,09	0,13	82,00
<b>TOTAL</b>		23,83	0,40	252,00
<b>RATA-RATA</b>		7,94	0,13	84,00
<b>STDEV</b>		0,14	0,002	2,00

**Anova Persentase (%) Kelangsungan Hidup rata-rata ikan Nila melalui Pakan dengan Penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi**

Univariate Tests of Significance for SR Diakhir (%) (Ekstrak Pasak Bumi Pakan)  
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	109910,4	1	109910,4	15852,46	0,000000
Perlakuan	108,3	4	27,1	3,90	0,036706
Error	69,3	10	6,9		



### Uji Duncan Persentase (%) Kelangsungan Hidup rata-rata ikan Nila melalui Pakan dengan Penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi

Duncan test; variable SR Diakhir (%) (Ekstrak Pasak Bumi Pakan) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 6,9333, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - 88,000	{2} - 88,667	{3} - 86,000	{4} - 81,333	{5} - 84,000
1	EPB1					
2	EPB2	0,763012				
3	EPB3	0,374319	0,263813			
4	MT	0,015884	0,010570	0,064658		
5	NH	0,105803	0,070415	0,374319	0,243304	

### Anova Pertambahan Berat (gram) rata-rata ikan Nila melalui Pakan dengan Penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi

Univariate Tests of Significance for Berat Akhir (gram) (Ekstrak Pasak Bumi Pakan) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1304,036	1	1304,036	7330,394	0,000000
Perlakuan	7,702	4	1,926	10,824	0,001177
Error	1,779	10	0,178		

### Uji Duncan Pertambahan Berat (gram) rata-rata ikan Nila melalui Pakan dengan Penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi

Duncan test; variable Berat Akhir (gram) (Ekstrak Pasak Bumi Pakan) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = ,17789, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - 9,3520	{2} - 9,7227	{3} - 9,6523	{4} - 9,9500	{5} - 7,9427
1	EPB1					
2	EPB2	0,328507				
3	EPB3	0,403783	0,842393			
4	K+	0,136424	0,524259	0,428724		
5	K-	0,002317	0,000708	0,000818	0,000335	

### Anova Pertumbuhan Spesifik Harian (SGP) rata-rata ikan Nila melalui Pakan dengan Penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi

Univariate Tests of Significance for SGP (Ekstrak Pasak Bumi Pakan) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0.362232	1	0.362232	7330.394	0.000000
<b>Perlakuan</b>	0.002140	4	0.000535	10.824	0.001177
<b>Error</b>	0.000494	10	0.000049		

### Uji Duncan Pertumbuhan Spesifik Harian (SGP) rata-rata ikan Nila melalui Pakan dengan Penambahan Ekstrak Metanol Pasak Bumi

Duncan test; variable SGP (Ekstrak Pasak Bumi Pakan) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = .00005, df = 10.000

Perlakuan	{1} - .15587	{2} - .16204	{3} - .16087	{4} - .16583	{5} - .13238
<b>1</b> EPB1					
<b>2</b> EPB2	0.328507				
<b>3</b> EPB3	0.403783	0.842393			
<b>4</b> MT	0.136424	0.524259	0.428724		
<b>5</b> NH	0.002317	0.000708	0.000818	0.000335	



Lampiran 12. Data dan uji statistik jumlah dan prosentase jenis kelamin ikan nila dengan perendaman ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi.

Perlakuan	Ulangan	Σ Sampel	Σ Jantan	Σ Intersex	Σ Betina	Jantan (%)	Intersex (%)	Betina (%)
EPB1	1	40	26	3	11	65,00	7,50	27,50
	2	42	28	6	8	66,67	14,29	19,05
	3	43	30	4	9	69,77	9,30	20,93
<b>TOTAL</b>		<b>125,00</b>	<b>84,00</b>	<b>13,00</b>	<b>28,00</b>	<b>201,43</b>	<b>31,09</b>	<b>67,48</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,67</b>	<b>28,00</b>	<b>4,33</b>	<b>9,33</b>	<b>67,14</b>	<b>10,36</b>	<b>22,49</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,528</b>	<b>2,000</b>	<b>1,528</b>	<b>1,528</b>	<b>2,419</b>	<b>3,515</b>	<b>4,438</b>
EPB2	1	42	25	4	13	59,52	9,52	30,95
	2	43	31	3	9	72,09	6,98	20,93
	3	41	27	2	12	65,85	4,88	29,27
<b>TOTAL</b>		<b>126,00</b>	<b>83,00</b>	<b>9,00</b>	<b>34,00</b>	<b>197,47</b>	<b>21,38</b>	<b>81,15</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>42,00</b>	<b>27,67</b>	<b>3,00</b>	<b>11,33</b>	<b>65,82</b>	<b>7,13</b>	<b>27,05</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,000</b>	<b>3,055</b>	<b>1,000</b>	<b>2,082</b>	<b>6,285</b>	<b>2,326</b>	<b>5,367</b>
EPB3	1	41	25	3	13	60,98	7,32	31,71
	2	42	29	3	10	69,05	7,14	23,81
	3	40	28	4	8	70,00	10,00	20,00
<b>TOTAL</b>		<b>123,00</b>	<b>82,00</b>	<b>10,00</b>	<b>31,00</b>	<b>200,02</b>	<b>24,46</b>	<b>75,52</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,00</b>	<b>27,33</b>	<b>3,33</b>	<b>10,33</b>	<b>66,67</b>	<b>8,15</b>	<b>25,17</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,000</b>	<b>2,082</b>	<b>0,577</b>	<b>2,517</b>	<b>4,958</b>	<b>1,602</b>	<b>5,971</b>
K+	1	42	28	2	12	66,67	4,76	28,57
	2	41	24	3	14	58,54	7,32	34,15
	3	42	26	3	13	61,90	7,14	30,95
<b>TOTAL</b>		<b>125,00</b>	<b>78,00</b>	<b>8,00</b>	<b>39,00</b>	<b>187,11</b>	<b>19,22</b>	<b>93,67</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,67</b>	<b>26,00</b>	<b>2,67</b>	<b>13,00</b>	<b>62,37</b>	<b>6,41</b>	<b>31,22</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,577</b>	<b>2,000</b>	<b>0,577</b>	<b>1,000</b>	<b>4,085</b>	<b>1,428</b>	<b>2,797</b>
K-	1	40	19	0	21	47,50	0	52,50
	2	42	22	0	20	52,38	0	47,62
	3	41	21	0	20	51,22	0	48,78
<b>TOTAL</b>		<b>123,00</b>	<b>62,00</b>	<b>-</b>	<b>61,00</b>	<b>151,10</b>	<b>-</b>	<b>148,90</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,00</b>	<b>20,67</b>	<b>-</b>	<b>20,33</b>	<b>50,37</b>	<b>-</b>	<b>49,63</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,000</b>	<b>1,528</b>	<b>0,000</b>	<b>0,577</b>	<b>2,550</b>	<b>0,000</b>	<b>2,550</b>

Anova Persentase Jantan dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for Jantan (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Rendam)  
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	58548,30	1	58548,30	3143,629	0,000000
Perlakuan	591,82	4	147,95	7,944	0,003775
Error	186,24	10	18,62		

### Uji Duncan Persentase Jantan dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Duncan test; variable Jantan (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Rendam) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 18,624, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - 50,367	{2} - 67,145	{3} - 65,823	{4} - 66,674	{5} - 62,369
1	NH					
2	SPB1	0,001369				
3	SPB2	0,001842	0,728112			
4	SPB3	0,001494	0,896613	0,814197		
5	SST	0,006852	0,234817	0,350237	0,270601	

### Anova Ikan Intersex dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for Intersex (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Rendam) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	616,3011	1	616,3011	137,7481	0,000000
Perlakuan	180,7916	4	45,1979	10,1021	0,001539
Error	44,7412	10	4,4741		

### Uji Duncan Ikan Intersex dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Duncan test; variable Intersex (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Rendam) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 4,4741, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - 0,0000	{2} - 10,363	{3} - 7,1262	{4} - 8,1533	{5} - 6,4073
1	NH					
2	SPB1	0,000274				
3	SPB2	0,002725	0,103604			
4	SPB3	0,001309	0,229829	0,565406		
5	SST	0,004195	0,058358	0,686160	0,357386	



Lampiran 13. Data dan uji statistik jumlah pertambahan berat, SGP, kelangsungan hidup ikan nila melalui perendaman dengan penambahan ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi.

Perlakuan	Ulangan	Pertambahan Berat (g)	SGP (%)	Kelangsungan Hidup (%)
EPB1	1	7,551	0,126	80,00
	2	7,264	0,121	84,00
	3	7,652	0,128	86,00
<b>TOTAL</b>		22,467	0,374	250,00
<b>RATA-RATA</b>		7,489	0,125	83,33
<b>STDEV</b>		0,201	0,003	3,06
EPB2	1	7,673	0,128	84,00
	2	7,572	0,126	86,00
	3	7,552	0,126	82,00
<b>TOTAL</b>		22,797	0,380	252,00
<b>RATA-RATA</b>		7,599	0,127	84,00
<b>STDEV</b>		0,065	0,001	2,00
EPB3	1	7,638	0,127	82,00
	2	7,300	0,122	84,00
	3	7,638	0,127	80,00
<b>TOTAL</b>		22,576	0,376	246,00
<b>RATA-RATA</b>		7,525	0,125	82,00
<b>STDEV</b>		0,195	0,003	2,00
K+	1	7,003	0,117	84,00
	2	7,274	0,121	82,00
	3	7,540	0,126	84,00
<b>TOTAL</b>		21,817	0,364	250,00
<b>RATA-RATA</b>		7,272	0,121	83,33
<b>STDEV</b>		0,269	0,004	1,15
K-	1	7,793	0,130	80,00
	2	7,473	0,125	84,00
	3	7,843	0,131	82,00
<b>TOTAL</b>		23,109	0,385	246,00
<b>RATA-RATA</b>		7,703	0,128	82,00
<b>STDEV</b>		0,201	0,003	2,00

**Anova Persentase(%) Kelangsungan Hidup dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi**

Univariate Tests of Significance for SR Diakhir (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Rendam)  
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	103169,1	1	103169,1	22757,88	0,000000
Perlakuan	9,6	4	2,4	0,53	0,717181
Error	45,3	10	4,5		

### Uji Duncan Persentase(%) Kelangsungan Hidup dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for SR Diakhir (%) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam)  
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	104166,7	1	104166,7	6975,446	0,000000
<b>Perlakuan</b>	40,0	4	10,0	0,670	0,627687
<b>Error</b>	149,3	10	14,9		

### Anova Pertambahan berat (gram) dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for Berat Akhir (gram) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam)  
Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	1063,429	1	1063,429	11994,01	0,000000
<b>Perlakuan</b>	4,204	4	1,051	11,85	0,000822
<b>Error</b>	0,887	10	0,089		

### Uji Duncan Pertambahan berat (gram) dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Duncan test; variable Berat Akhir (gram) (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Approximate  
Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = ,08866, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - 8,0653	{2} - 9,0847	{3} - 9,0227	{4} - 8,1277	{5} - 7,7993
<b>1</b>	EPB1					
<b>2</b>	EPB2	0,002851				
<b>3</b>	EPB3	0,003649	0,804025			
<b>4</b>	K+	0,802996	0,003657	0,004396		
<b>5</b>	K-	0,299699	0,000661	0,000849	0,226336	



### Anova Pertumbuhan Spesifik Harian (SGP) dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Univariate Tests of Significance for SGP (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,294556	1	0,294556	11993,01	0,000000
<b>Perlakuan</b>	0,001167	4	0,000292	11,88	0,000816
<b>Error</b>	0,000246	10	0,000025		

### Uji Duncan Pertumbuhan Spesifik Harian (SGP) dengan perendaman ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi

Duncan test; variable SGP (Ekstrak Pasak Bumi Rendam) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00002, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - ,13423	{2} - ,15121	{3} - ,15017	{4} - ,13526	{5} - ,12979
<b>1</b>	EPB1					
<b>2</b>	EPB2	0,002838				
<b>3</b>	EPB3	0,003649	0,801700			
<b>4</b>	MT	0,805821	0,003619	0,004370		
<b>5</b>	NH	0,298495	0,000656	0,000846	0,226615	

Lampiran 14. Data dan uji statistik jumlah dan prosentase jenis kelamin ikan nila dengan pemberian ekstrak kolom stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan.

Perlakuan	Ulangan	Σ Sampel	Σ Jantan	Σ Intersex	Σ Betina	Jantan (%)	Intersex (%)	Betina (%)
EPB1	1	41	25	4	12	60,98	9,76	29,27
	2	40	25	3	12	62,50	7,50	30,00
	3	41	28	2	11	68,29	4,88	26,83
<b>TOTAL</b>		<b>122,00</b>	<b>78,00</b>	<b>9,00</b>	<b>35,00</b>	<b>191,77</b>	<b>22,13</b>	<b>86,10</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>40,67</b>	<b>26,00</b>	<b>3,00</b>	<b>11,67</b>	<b>63,92</b>	<b>7,38</b>	<b>28,70</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,577</b>	<b>1,732</b>	<b>1,000</b>	<b>0,577</b>	<b>3,860</b>	<b>2,441</b>	<b>1,660</b>
EPB2	1	41	26	4	11	63,41	9,76	26,83
	2	40	29	3	8	72,50	7,50	20,00
	3	40	26	3	11	65,00	7,50	27,50
<b>TOTAL</b>		<b>121,00</b>	<b>81,00</b>	<b>10,00</b>	<b>30,00</b>	<b>200,91</b>	<b>24,76</b>	<b>74,33</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>40,33</b>	<b>27,00</b>	<b>3,33</b>	<b>10,00</b>	<b>66,97</b>	<b>8,25</b>	<b>24,78</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,577</b>	<b>1,732</b>	<b>0,577</b>	<b>1,732</b>	<b>4,853</b>	<b>1,303</b>	<b>4,150</b>
EPB3	1	41	24	6	11	58,54	14,63	26,83
	2	42	29	3	10	69,05	7,14	23,81
	3	40	28	3	9	70,00	7,50	22,50
<b>TOTAL</b>		<b>123,00</b>	<b>81,00</b>	<b>12,00</b>	<b>30,00</b>	<b>197,58</b>	<b>29,28</b>	<b>73,14</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,00</b>	<b>27,00</b>	<b>4,00</b>	<b>10,00</b>	<b>65,86</b>	<b>9,76</b>	<b>24,38</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,000</b>	<b>2,646</b>	<b>1,732</b>	<b>1,000</b>	<b>6,361</b>	<b>4,226</b>	<b>2,220</b>
K+	1	40	24	4	10	60,00	10,00	25,00
	2	42	28	5	9	66,67	11,90	21,43
	3	42	25	4	13	59,52	9,52	30,95
<b>TOTAL</b>		<b>124,00</b>	<b>77,00</b>	<b>13,00</b>	<b>32,00</b>	<b>186,19</b>	<b>31,43</b>	<b>77,38</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,33</b>	<b>25,67</b>	<b>4,33</b>	<b>10,67</b>	<b>62,06</b>	<b>10,48</b>	<b>25,79</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,155</b>	<b>2,082</b>	<b>0,577</b>	<b>2,082</b>	<b>3,994</b>	<b>1,260</b>	<b>4,811</b>
K-	1	40	20	0	20	50,00	0	50,00
	2	42	21	0	19	50,00	0	45,24
	3	41	21	0	20	51,22	0	48,78
<b>TOTAL</b>		<b>123,00</b>	<b>62,00</b>	<b>-</b>	<b>59,00</b>	<b>151,22</b>	<b>-</b>	<b>144,02</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>41,00</b>	<b>20,67</b>	<b>-</b>	<b>19,67</b>	<b>50,41</b>	<b>-</b>	<b>48,01</b>
<b>STDEV</b>		<b>1,000</b>	<b>0,577</b>	<b>0,000</b>	<b>0,577</b>	<b>0,704</b>	<b>0,000</b>	<b>2,474</b>

Anova Persentase Jantan (%) dengan pemberian ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan

Univariate Tests of Significance for Jantan (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Pakan) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	57372,32	1	57372,32	3008,036	0,000000
Perlakuan	532,85	4	133,21	6,984	0,005958
Error	190,73	10	19,07		



### Uji Duncan Persentase Jantan (%) dengan pemberian ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan

Duncan test; variable Jantan (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Pakan) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 19,073, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - 50,407	{2} - 63,923	{3} - 66,972	{4} - 65,861	{5} - 62,063
1	NH					
2	SPB1	0,004593				
3	SPB2	0,001618	0,433589			
4	SPB3	0,002299	0,598736	0,762098		
5	SST	0,008589	0,613602	0,228105	0,333354	

### Anova Persentase Ikan Intersex (%) dengan pemberian ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan

Univariate Tests of Significance for Intersex (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Pakan) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	771,7907	1	771,7907	142,3909	0,000000
Perlakuan	210,7703	4	52,6926	9,7215	0,001783
Error	54,2022	10	5,4202		

### Uji Duncan Persentase Ikan Intersex (%) dengan pemberian ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan

Duncan test; variable Intersex (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Pakan) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,4202, df = 10,000

	Perlakuan	{1} - 0,0000	{2} - 7,3780	{3} - 8,2520	{4} - 9,7590	{5} - 10,476
1	NH					
2	SPB1	0,003205				
3	SPB2	0,001969	0,655675			
4	SPB3	0,000741	0,259436	0,446513		
5	SST	0,000494	0,159463	0,290205	0,713993	

Lampiran 15. Data dan uji statistik jumlah dan prosentase jenis kelamin ikan nila melalui pakan dengan penambahan Ekstrak Kolom Stigmasterol tumbuhan Pasak Bumi.

Perlakuan	Ulangan	Pertambahan Berat (g)	SGP (%)	Kelangsungan Hidup (%)
EPB1	1	7,241	0,121	82
	2	7,890	0,131	80
	3	7,904	0,132	82
<b>TOTAL</b>		<b>23,035</b>	<b>0,383</b>	<b>244,00</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>7,678</b>	<b>0,128</b>	<b>81,33</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,379</b>	<b>0,006</b>	<b>1,155</b>
EPB2	1	7,187	0,120	82
	2	7,765	0,129	80
	3	7,986	0,133	80
<b>TOTAL</b>		<b>22,938</b>	<b>0,382</b>	<b>242,00</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>7,646</b>	<b>0,127</b>	<b>80,67</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,413</b>	<b>0,007</b>	<b>1,155</b>
EPB3	1	7,542	0,126	82
	2	8,014	0,133	84
	3	7,675	0,128	80
<b>TOTAL</b>		<b>23,231</b>	<b>0,387</b>	<b>246,00</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>7,744</b>	<b>0,129</b>	<b>82,00</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,243</b>	<b>0,004</b>	<b>2,000</b>
K+	1	7,543	0,126	80
	2	7,608	0,127	84
	3	8,013	0,133	84
<b>TOTAL</b>		<b>23,164</b>	<b>0,385</b>	<b>248,00</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>7,721</b>	<b>0,128</b>	<b>82,67</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,255</b>	<b>0,004</b>	<b>2,309</b>
K-	1	7,234	0,120	80
	2	7,544	0,126	84
	3	7,804	0,130	82
<b>TOTAL</b>		<b>22,582</b>	<b>0,376</b>	<b>246,00</b>
<b>RATA-RATA</b>		<b>7,527</b>	<b>0,125</b>	<b>82,00</b>
<b>STDEV</b>		<b>0,285</b>	<b>0,005</b>	<b>2,000</b>

**Anova Kelangsungan hidup Ikan nila (%) dengan pemberian ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan**

Univariate Tests of Significance for SR Diakhir (%) (Stigmasterol Pasak Bumi Pakan)

Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	100205,1	1	100205,1	31314,08	0,000000
Perlakuan	6,9	4	1,7	0,54	0,709085
Error	32,0	10	3,2		



**Anova Pertambahan berat ikan nila (gram) dengan pemberian ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan**

Univariate Tests of Significance for Berat Akhir (gram) (Stigmasterol Pasak Bumi Pakan) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	878,3073	1	878,3073	8448,602	0,000000
<b>Perlakuan</b>	0,0860	4	0,0215	0,207	0,928840
<b>Error</b>	1,0396	10	0,1040		

**Anova Pertumbuhan spesifik Harian (SGP) dengan pemberian ekstrak Kolom Stigmasterol akar tumbuhan pasak bumi melalui pakan**

Univariate Tests of Significance for SGP (Stigmasterol Pasak Bumi Pakan) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition; Std. Error of Estimate: 0,0053737

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,243974	1	0,243974	8448,602	0,000000
<b>Perlakuan</b>	0,000024	4	0,000006	0,207	0,928840
<b>Error</b>	0,000289	10	0,000029		