

DISKRIMINASI KELAMIN PADA IKAN TUNA SIRIP KUNING, Yellowfin tuna MENGGUNAKAN ANALISIS DOT BLOT DAN ELISA

Gusti Ngurah Permana^{*)}, Jhon Harianto Hutapea^{*)}, dan Gavin Patridge^{)}**

^{*)} Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut
Jl. Br. Gondol Kec. Gerokgak Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja, Bali 81101
E-mail: gustipermana@gmail.com

^{**)} Senior Research Scientist of Aquaculture Research and Development at
Challenger Institute of Technology Centre for Applied Aquaculture Research
Australia

(Naskah diterima: 14 April 2013; Disetujui publikasi: 3 Maret 2014)

ABSTRAK

Pemahaman tentang penentuan jenis kelamin dalam populasi induk merupakan hal yang sangat penting bagi keberhasilan program pembenihan. Pengukuran reaksi antibodi dan aktivitas hormon testosterone, serta estradiol adalah metode dengan potensi yang secara akurat dapat menentukan jenis kelamin ikan tanpa mematikan ikan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui akurasi metode dot blot dan ELISA dengan 11-ketotestosterone (11-KT) yang tersedia secara komersial EIA-kit untuk membedakan jenis kelamin ikan tuna sirip kuning. Hasil analisis menunjukkan bahwa metode dot blot menghasilkan ekspresi vitelogenin tampak jelas pada individu betina dan efek plasma terlihat transparan, jika dibandingkan dengan individu jantan. Interpretasi dari metode ini memerlukan pengalaman dan keahlian dalam akurasi pembacaan hasil. Aktivitas hormon 11-KT dengan sampel klip sirip dan plasma memberikan hasil yang baik dengan aktivitas hormon terlihat jelas.

KATA KUNCI: dot blot, vitelogenin, ketotestosteron, estradiol, ikan tuna sirip kuning

ABSTRACT: *Sex discrimination of yellowfin tuna by using dot blot and elisa analysis. By: Gusti Ngurah Permana, Jhon Harianto Hutapea, and Gavin Patridge*

Understanding of sex differentiation of fish population is importance to support breeding program. Parameters of antibody reaction and hormone activity of testosterone and estradiol are usefull tools to detect sex discrimination of fish. The study was conducted to determine the accuracy of dot blot and ELISA method with a 11-ketotestosterone and estradiol hormone available EIA-kit commercially. The results of dot blot produced apparent vitellogenin expression in female individuals and the effect of plasma was transparent, when it was compared to male individuals. Interpretation of this method requires an experience and expertise in reading accuracy. Activity of the hormone 11-KT with fin clips and plasma samples had a good results.

KEYWORDS: dot blot, vitelogenin, ketotestosteron, estradiol, yellowfin tuna

PENDAHULUAN

Secara sepintas untuk membedakan ikan jantan dan betina memang mudah, tetapi pada kenyataannya tidaklah demikian. Beberapa spesies ikan di perairan pantai dapat secara jelas terlihat perbedaan secara morfologi antara individu jantan dan betina. Pada spesies ikan tertentu seperti ikan tuna (*Thunnus* sp.), ikan bandeng (*Chanos chanos*), dan kelompok ikan kerapu (*Epinephelus* spp., *Cromileptes altivelis*) sangat sulit dibedakan jenis kelaminnya. Kajian ini sangat penting nantinya diterapkan dalam pembenihan sehingga para pembudidaya ikan tahu benar bahwa ikan yang dibenihkan mempunyai perbandingan yang optimum antara jantan dan betina. Lebih lanjut menurut Suhendrata & Wahyono (1987), diketahui bahwa rasio kelamin ikan cakalang jantan dan betina adalah 1,07:1,00. Nilai tersebut secara umum hampir sama dengan ikan tuna di alam pada umumnya.

Pemahaman tentang rasio jenis kelamin dalam populasi induk merupakan hal yang sangat penting bagi keberhasilan program manajemen induk ikan tuna sirip kuning yang dipelihara di tangki beton. Metode konvensional dengan pengamatan morfologi yang digunakan untuk penentuan jenis kelamin induk tidak cocok untuk ikan tuna karena ukurannya yang besar dan kesulitan dalam penanganan dan anestesi ikan. Penentuan status reproduksi merupakan persyaratan utama untuk setiap pengelolaan program pembenihan.

Vitelogenin (VTG) telah luas digunakan dalam budidaya perikanan sebagai indikator kematangan seksual (Bon *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1998). Pengukuran reaksi antibodi dan aktivitas hormon testosteron dan estradiol adalah alat dengan potensi besar untuk menentukan jenis kelamin ikan tanpa mematikan ikan. Metode ini berpotensi dapat digunakan pada ikan khususnya bagi induk *yellowfin tuna*, yang ditangkap dengan ukuran (< 10 kg) atau dilakukan pengambilan sampel sebelum ditransfer ke tangki pemeliharaan induk.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis kelamin pada ikan tuna sirip kuning yang dipelihara di tangki beton dengan metode dot blot, serta aktivitas hormon 11-ketotestosterone dan estradiol. Selain itu, untuk mengetahui akurasi ketiga metode tersebut untuk membedakan jenis kelamin ikan tuna kuning.

BAHAN DAN METODE

Sampel yang dipergunakan untuk analisis menggunakan ikan mati yang sudah diketahui atau dikenali jenis kelaminnya berdasarkan keragaan gonad dengan analisis visual dan histologi. Sampel yang diambil adalah darah, klip sirip, dan otot punggung. Plasma dipisahkan dari sel-sel darah merah melalui sentrifugasi sebelum dianalisis. Sampel otot daging diambil dengan menggunakan '*genetag biopsy hook*'. Pada hari yang sama, enam ikan kecil mulai ukuran 6,6-12,0 kg yang ditransfer dari tangki aklimasi ke tangki induk diambil sampel klip sirip dan biopsi otot kecil dengan menggunakan '*hook genetag biopsy*'.

Dot Blot

Antibodi primer untuk analisis dot blot yang digunakan sama dengan anti blue fin tuna Zrp (*zona radiata protein*) (Bonn *et al.*, 2002). Metode ini diperkenalkan oleh Profesor Christopher Bridges dari Institute for Zoology, Heinrich Heine University Dusseldorf, Jerman di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol. Persiapan *tube* reaksi dengan memasukkan 200 μ L buffer (Tris HCL 0,1 mol/L; pH 6,8) ke dalam setiap *tube* dan ditambahkan 1 mL Pefabloc (1 mM). Selanjutnya ekstraksi sampel dengan menimbang sebanyak 0,2 g klip sirip, dimasukkan ke dalam *tube* reaksi tadi, dan dihancurkan pakai pistol. Inkubasi selama 60 menit kemudian sentrifuse kecepatan 14.000 rpm, 4°C selama 15 menit. Supernatan merupakan sampel yang dipergunakan untuk analisis. Pengenceran dari sampel hasil ekstraksi menggunakan Tris HCL. *Loading* sampel dilakukan dengan menambahkan 1 μ L sampel, 1 μ L standar dan 1 μ L Tris HCL pada kertas *Nitrocellulosemembrane* membran dan dikeringkan selama 15 menit. *Blocking* dilakukan dengan memasukkan 1,5 mL *blocking solution* (*rotiblock* 1:10) dan diinkubasi selama 30 menit. Antibodi primer (1st *antibody/rabbit- α -tuna*), antibodi Vtg (vitelogenin) 1:7.500 dan antibodi Zrp 1:15.000, keduanya diencerkan dengan PBS dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang. Selanjutnya pencucian (*washing*) menggunakan buffer pencuci (*washing buffer*) terdiri PBS (*phosphate buffer saline*) + 0,05% Triton X + 0,1% Tween-20. *Washing buffer* dibuang dan diulang 2-3 kali. Pada proses ini dilakukan *shaker* sehingga tercuci sempurna. Kemudian ditambahkan antibodi sekunder (2nd *antibody/goat- α -rabbit*); 1:15.000 diencerkan dengan PBS +

Tween-20 diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruangan dan selanjutnya cuci dengan *miliQ water*. Pewarnaan (*coloration*) menggunakan Nitro blue tetrazolium (NBT) diinkubasi selama lima menit dalam kondisi gelap, setelah selesai dicuci dengan *miliQ water*. Kontrol negatif terdiri atas buffer (0,1 M PBS; pH 7,4; 0,05% Tween-20; dan 27 mM KCL), sedangkan positif kontrol dari vitelogenin standar atau Zrp pada konsentrasi 100 µg mL⁻¹. Pembacaan pola gambar hasil *staining* diinterpretasikan sebagai +++ (sangat jelas/cerah), ++ (jelas), + (kurang jelas), ± (tipis), dan - (tidak aktif).

ELISA Hormon

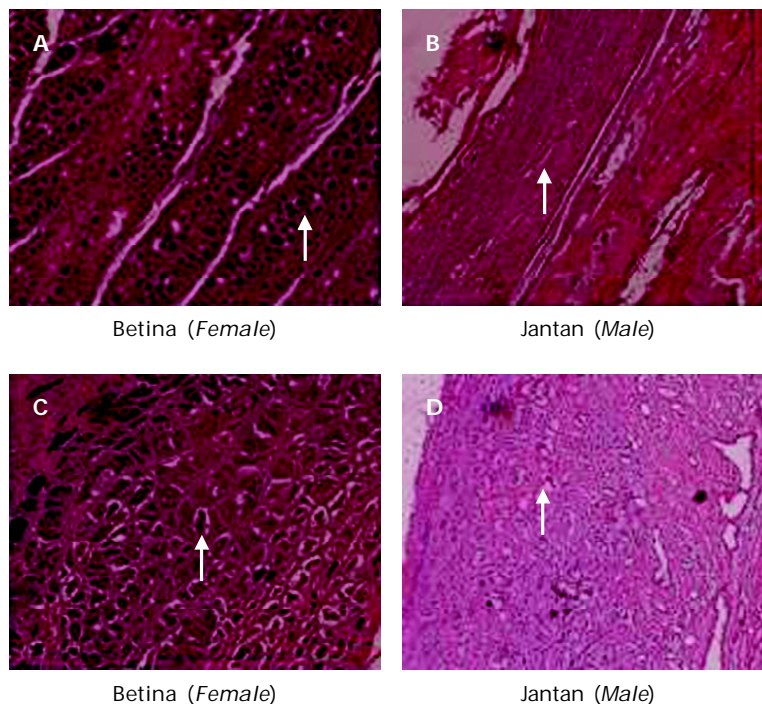
Ekstraksi hormon dari klip sirip, daging, dan plasma dilakukan dengan dietil eter. Hormon dalam plasma diukur secara langsung dalam sampel yang diencerkan dengan buffer EIA pada rasio 10:490, 50:450, dan 100:400. Kadar hormone 11-ketotestosterone dan estradiol diukur menggunakan ELISA *reader* yang tersedia secara komersial (Cayman Chemical Company, katalog No. 582751). Prosedur preparasi reaksi mengikuti manual yang ada dalam *kit*.

HASIL DAN BAHASAN

Karakter Histologi Gonad

Pengamatan jenis kelamin pada awalnya dilakukan berdasarkan analisis histologi gonad ikan yang mati (Gambar 1). Pada Gambar 1A teridentifikasi ikan tuna dengan jenis kelamin betina di mana oocytes primer (*germ cells*) terlihat dan perkembangan lipatan ovigerous dari gonad. Ikan tuna sirip kuning teridentifikasi jantan di mana terlihat *granular cells* yang menyerupai spermatogonia yang berkembang (Gambar 1B). Sedangkan Gambar 1C adalah betina di mana ovary dengan oocytes pada chromatin nucleolus dan fase peri-nucleolus, pewarnaan yang agak gelap adalah nucleus yang dikelilingi oleh sitoplasma. Histologi sampel pada Gambar 1D adalah jantan di mana terlihat *granular cells* pada bagian kiri menyerupai spermatogonia yang berkembang.

Berdasarkan hasil analisis histologi pada Tabel 1, terlihat bahwa pada sampel 1A secara visual dari gonad terlihat adalah jantan, namun demikian pada kenyataannya adalah betina yang ditunjukkan dari oocytes primer (*germ*



Gambar 1. Irisan histologi gonad induk ikan tuna sirip kuning (pembesaran 200x)
Figure 1. Histology section of broodstock candidate of yellowfin tuna (200x magnification)

Table 1. Bobot badan dan panjang cagak sampel yang dipergunakan untuk analisis histologi
 Table 1. *Body weight dan fork length of samples used to histology analysis*

Kode sampel Sample code	Tanggal kematian Date at death	Bobot badan Body weight (kg)	Panjang cagak Fork length (cm)	Hati Liver (g)	Gonad Gonad (g)	Jenis kelamin saat mati Sex at death	Histologi Known of histology
1A	23/1/2010	9.25	78.5	62.98	9.32	Jantan (Male)	Betina (Female)
1B	23/1/2010	4.35	61	32.59	0.92	Jantan (Male)	Jantan (Male)
1C	23/1/2010	8.95	77	60.5	31.14	Betina (Female)	Betina (Female)
1D	23/1/2010	4.1	58.5	26.12	1.93	Jantan (Male)	Jantan (Male)

Keterangan (Note):

Identifikasi secara morfologi dari gonad jantan (putih susu) dan betina (kuning keputihan dengan tekstur lebih kasar) (*Identification morphologically from male gonad (white milk) and female (yellow with texture more rugged)*)

cells) terlihat dan perkembangan lipatan ovigorous dari gonad. Pada sampel yang lain hasil identifikasi saat mati sesuai dengan hasil histologi.

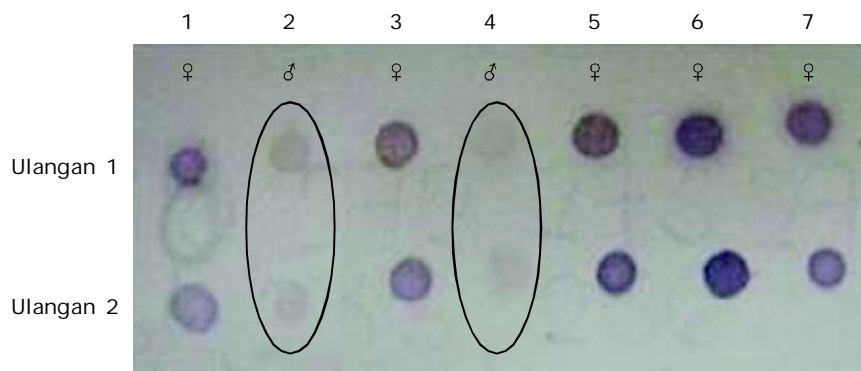
Dot Blot

Penentuan jenis kelamin berdasarkan reaksi antibodi ini dapat digunakan pada ikan yang telah menunjukkan aktivitas hormon dan pembentukan vitelogenin (Sauca *et al.*, 2001). Antibodi primer untuk dot blot analisis yang digunakan sama dengan *rabbit anti blue fin tuna Zrp (zona radiata protein)* (Bonn *et al.*, 2002; Desantis *et al.*, 2005). Metode dot blot mengikuti prosedur yang dikembangkan oleh Sauca *et al.* (2001). Ekspresi vitelogenin akan

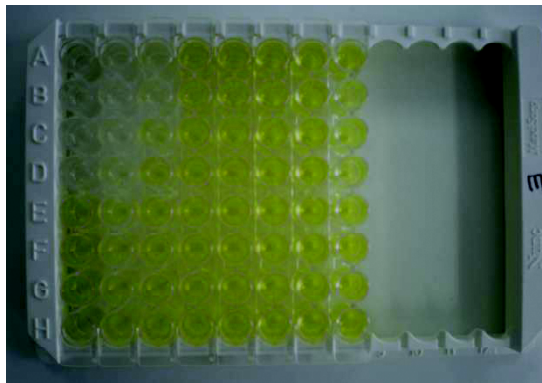
nampak jelas terekspresi pada individu betina dan efek plasma terlihat transparan jika dibandingkan pada individu jantan (Gambar 2).

Estradiol

Aktivitas hormon estradiol pada ikan tuna sirip kuning memperlihatkan hasil yang kurang baik. Dari semua sampel aktivitas hormon ini tidak terlihat jelas (Gambar 3). Hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi Estradiol-17 β dalam induk betina masih sedikit, artinya pembentukan vitelogenin belum sempurna. Selain itu, menurut Zairin (2000), menyatakan bahwa pola konsentrasi estradiol-17 β pada ikan akan meningkat sesuai dengan pola pemijahannya.



Gambar 2. Perbedaan ekspresi warna pada individu jantan dan betina menggunakan analisis dot blot dengan antibodi *rabbit anti bluefin tuna*
 Figure 2. *Different colouration of female and male of yellowfin tuna using dot blot analysis with antibody rabbit anti bluefin tuna*



Form sampel plate untuk analisis estradiol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk = Blank; NSB = Non specific binding; B₀ = Maximum binding; TA = Total activity; S1-S8 = Standars 1-8; 1-24 = Samples

Gambar 3. Reaksi warna pada plate sampel aktivitas hormon estradiol

Figure 3. Colouration pattern of estradiol activity

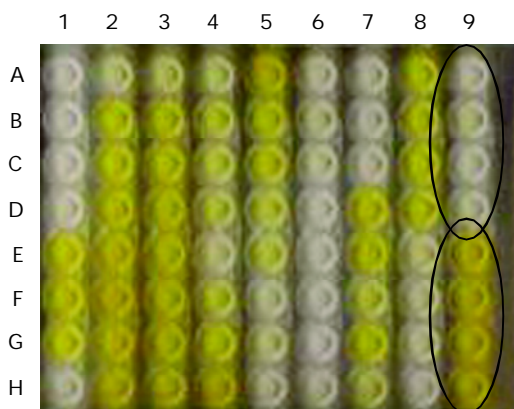
11-Ketotestosteron

Hasil uji 11-KT pada biopsi otot, klip sirip, dan darah diketahui memberikan hasil yang berbeda. Aktivitas hormon 11-KT dalam sampel otot yang diambil dengan kait biopsi *gene tag* mempunyai akurasi yang rendah. Hal ini dapat disebabkan karena jumlah otot daging yang diambil melalui metode ini tidak cukup untuk mengekstrak 11-KT, sehingga hasilnya tidak mendapatkan nilai positif. Lain halnya aktivitas 11-KT yang diekstrak dari sampel plasma darah ternyata dapat mengidentifikasi kelamin jantan yang diencerkan 50:450, tetapi pengenceran dengan 10:490 terlalu encer untuk mendeteksi 11-KT (Gambar 4).

Hasil analisis hormon 11-KT menggunakan klip sirip memberikan hasil yang baik dengan

aktivitas hormon terlihat jelas. Semua calon induk yang akan dipindah ke tangki induk telah diberi *tagging* dan diambil *fin* klip untuk analisis 11-KT dan mt-DNA. Namun demikian belum dapat disimpulkan ukuran minimum ikan yang dapat terdeteksi hormonal 11-KT secara akurat. Hasil analisis hormon 11-KT yang diekstrak dari *fin* klip pada ikan tuna sirip kuning yang dipelihara di tangki induk terlihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil analisis ELISA (Tabel 2), perkiraan jumlah induk betina yang ada di tangki pemeliharaan adalah 11 ekor, sedangkan jumlah induk jantan yang teridentifikasi adalah 15 ekor. Hasil kajian ini sangat penting diterapkan dalam *breeding* dengan mengetahui perbandingan yang optimum antara jantan dan betina pada tangki pemeliharaan induk.



Form sampel plate untuk analisis testosteron

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk = Blank; NSB = Non specific binding; B₀ = Maximum binding; TA = Total activity; S1-S8 = Standars 1-8; 1-24 = Samples

Gambar 4. Reaksi warna pada plate sampel aktivitas hormon 11-ketotestosterone

Figure 4. Colouration of samples 11 Ketotestosterone activity

Tabel 2. Data analisis ELISA induk ikan tuna sirip kuning selama pemeliharaan
 Table 2. *Elisa samples of yellowfin tuna broodstock in captivity*

Transfer (<i>Alive</i>)				Data kematian (<i>Dead data</i>)				Jenis kelamin berdasarkan ELISA <i>Sex determination by ELISA</i>
Tanggal <i>Date</i>	Penandaan <i>Tag</i>	Panjang cagak Fork <i>Fork length (cm)</i>	Bobot badan <i>Body weight (kg); n = 20</i>	Tanggal <i>Date</i>	Panjang cagak Fork <i>Fork length (cm)</i>	Bobot badan <i>Body weight (kg)</i>	Jenis kelamin saat mati <i>Sex at death</i>	
7/10/2009	420B583546	79.0	8.693	12/10/2009	80	8.200	Jantan (<i>Male</i>)	Jantan (<i>Male</i>)
ELISA	420B535867	65.5	4.993	5/7/2010	73.0	8.620	Jantan (<i>Male</i>)	Jantan (<i>Male</i>)
	420B5C4B26	71.0	6.338	12/12/2010	127.0	40	Jantan (<i>Male</i>)	Jantan (<i>Male</i>)
	420B516615	82.0	9.707					Jantan (<i>Male</i>)
	420B711C74	70.0	6.078	1/8/2010	95.0	16.650	Betina (<i>Female</i>)	Betina (<i>Female</i>)
19/11/2009	420B4D196D	45	1.644					Jantan (<i>Male</i>)
	420B5E4856	54	2.820	3/8/2010	85	11.85	Jantan (<i>Male</i>)	
	421354577F	43	1.437					Jantan (<i>Male</i>)
	420B664B6D	52	2.522					Jantan (<i>Male</i>)
7/1/2010	42103A444F	75	7.454	8/1/2010	73	6.650	Betina (<i>Female</i>)	
13/2/2010	4210486E	66	5.107					Betina (<i>Female</i>)
	42135A035E	80	9.023					Betina (<i>Female</i>)
	42103E2D48	81	9.360	20/11/2010	114	23	Jantan (<i>Male</i>)	Jantan (<i>Male</i>)
	42137A0567	80	9.023					Jantan (<i>Male</i>)
1/3/2010	420B6F491A	59	3.665	15/5/2010	65	4.600	Tidak diketahui <i>Unknown</i>	
	42137C6455	67	5.339					Jantan (<i>Male</i>)
	420B462F1A	53	2.668					Betina (<i>Female</i>)
	42104E4354	67	5.339					Jantan (<i>Male</i>)
	420C1D104A	66	5.107					Jantan (<i>Male</i>)
	421038516F	67	5.339					Jantan (<i>Male</i>)
	420B47187E	59	3.665	10/3/2010	59	4.100	Jantan (<i>Male</i>)	
	420B712261	57	3.309					Betina (<i>Female</i>)
	42103B4C1D	56	3.140					Betina (<i>Female</i>)
	421046506A	54	2.820	21/5/2010	58	3.500	Tidak diketahui <i>Unknown</i>	
	42104A5954	58	3.484					Jantan (<i>Male</i>)
	4210353463	84	10.424					Jantan (<i>Male</i>)
	27/4/2010	420B676431	58	3.484				
420B462934		59	3.665					Jantan (<i>Male</i>)
4210444247		69	5.824					Jantan (<i>Male</i>)
42137A734D		58	3.484					Betina (<i>Female</i>)

Lanjutan Tabel 2 (Table 2 continued)

Transfer (<i>Alive</i>)				Data kematian (<i>Dead data</i>)				Jenis kelamin berdasarkan ELISA Sex determination by ELISA
Tanggal Date	Penandaan Tag	Panjang cagak Fork length (cm)	Bobot badan Body weight (kg); n = 20	Tanggal Date	Panjang cagak Fork length (cm)	Bobot badan Body weight (kg)	Jenis kelamin saat mati Sex at death	
	42102A4617	63	4.450	10/8/2010	82	11.5	Jantan (<i>Male</i>)	
	4210550F39	66	5.107					Betina (<i>Female</i>)
	42104D7B1C	72	6.606	13/6/2010	72	7.35	Jantan (<i>Male</i>)	
	420B545A2C	65	4.881					Betina (<i>Female</i>)
	42104F3D2C	57	3.309					Jantan (<i>Male</i>)
	420B48514A	60	3.852					Betina (<i>Female</i>)
	420B75460D	60	3.852	29/10/2010	73	7.8	Betina (<i>Female</i>)	
	420B4B530D	60	3.852					Jantan (<i>Male</i>)
	420B5C5009	61	4.045	20/6/2010	65	5.2	Jantan (<i>Male</i>)	
	4210405122	67	5.339	19/11/2010	85	13.6	Betina (<i>Female</i>)	Betina (<i>Female</i>)
	42103B0F73	69	5.824					Betina (<i>Female</i>)

Keterangan (*Note*):

Induk yang sudah mati di tangki pemeliharaan (*Death broodstock in the tank*)

Induk yang masih hidup dan teridentifikasi kelamin berdasarkan hasil analisis (*Alive broodstock and sex identified*)

KESIMPULAN

Dari hasil analisis dot blot menghasilkan ekspresi vitelogenin tampak jelas pada individu betina dan efek plasma terlihat transparan. Analisis hormon 11-KT menggunakan klip sirip memberikan hasil yang baik dengan aktivitas hormon terlihat jelas. Induk ikan tuna sirip kuning yang teridentifikasi di tangki pemeliharaan adalah 11 ekor betina dan 15 ekor jantan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Haryanti atas masukan dan bantuannya di Laboratorium Bioteknologi pada BBPPBL Gondol. Miss. Ursulla Hoeder dari Heinrich Heine University Dusseldorf atas metode dan bantuan selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR ACUAN

Bonn, J.P., van Zanden, J.J., Lewis, W.E., Zegers, B.N., Goksøyr, A., & Arukwe, A. 2002. The expression of CYP1A, vitellogenin and zona radiata proteins in Atlantic salmon (*Salmo*

salar) after oral dosing with two commercial PBDE flame retardant mixtures: absence of short-term responses. *Mar. Environ. Res.*, 54: 719-724.

Bon, E., Barbe, U., Núñez Rodrigues, J., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpter, J.P., & Le Menn, F. 1997. Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Establishment and Validation of an ELISA. *Comparative Biochemistry*, 117B(1): 75-84.

Desantis, S., Corriero, A., Cirillo, F., Deflorio, M., Brill, R., Griffiths, M., Lopata, A.L., de la Serna, J.M., Bridges, C.R., Kime, D.E., & De Metrio, G. 2005. Immunohistochemical localization of CYP1A, vitellogenin and zona radiata proteins in the liver of swordfish (*Xiphias gladius* L.) taken from the Mediterranean Sea, South Atlantic, South Western Indian and Central North Pacific Oceans. *Aquatic toxicology*, 71: 1-12.

Mosconi, G., Carnevali, O., Carletta, R., Nabissi, M., & Polzonetti-Magni, A.M. 1998. Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Vitellogenin: Purification, Partial Characterization, and

- Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *General and Comparative Endocrinology*, 110: 252-261.
- Sauca, V., Corriero, A., Bridges, V, & De Metrio, G. 2001. Study of the sexual maturity of female bluefin tuna (*Thunnus thynnus*): purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Fish. Biol.*, 58: 815-831.
- Suhendrata, T. & Wahyono, M.M. 1987. Kematangan gonada dan perbandingan kelamin ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) di perairan teluk Pelabuhan Ratu dan sekitarnya. *Jurnal Penelitian Perikanan Laut*, (44):9-16.
- Zairin, M.Jr. 2000. Annual changes in ovarian maturity of female Thai catfish, *Pangasius hypophthalmus* reared in a culture pond. *Biotropia*, 15: 48-57.