

Efek Suplementasi Tepung Tulang Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) dengan Metode *Freeze Dry* terhadap Performa Otot Ayam Bangkok (*Gallus gallus domesticus*)

Effect of Supplementation of Milkfish Bone Flour (Chanos chanos) with Freeze Dry Method on Muscle Performance of Bangkok Chicken (Gallus gallus domesticus)

Pudji Astuti^{1*}, Rizki Fitrawan Yuneldi², Adelia Lintang Divani³, Nafisa Az Zahra³, Jayanti Astridya Rochmah³,
Claude Mona Airin¹, Sarmin Sarmin¹

¹Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Program *Post-Doctoral*, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

³Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta, Indonesia

*Email: pastuti2@ugm.ac.id

Naskah diterima: 14 Juni 2023 , direvisi: 4 Juli 2024 , disetujui: 25 Juli 2024

Abstract

This study aims to determine the effect of the administration of milkfish bone flour (*Chanos chanos*) which is using freeze-dry on testosterone levels in the pectoralis muscle, pectoralis muscle weight (PMW), and chest circumference (CC) in bangkok chickens (*Gallus gallus domesticus*). This study used 10 male bangkok chickens aged 3-4 months which were divided into two treatment groups, namely P0 (control) and P1 (milkfish bone flour of 3.3 g/bird/day). Prior to the study, acclimatization was carried out for 7 days and then milkfish bone flour was given orally every day for 35 days. Measurement of the CC of bangkok chickens was carried out on days 7, 14, 21, 28, and 35. At the end of the treatment the chickens were necropsied, then the pectoralis muscles were weighed and the pectoralis muscle homogenate samples were cold centrifuged. Then the supernatant was collected and analyzed using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method to determine testosterone levels in the pectoralis muscles. The data obtained were then analyzed using an independent sample T-Test with the help of SPSS version 26. The results showed that there was a significant difference ($P < 0.05$) in pectoralis muscle testosterone hormone levels, PMW, and CC in bangkok chickens. Based on the results of the study it can be concluded that administration of milkfish bone flour using the freeze-dry method at a dose of 3.3 g/bird/day orally for 35 days can improve testosterone levels in the pectoralis muscle, PMW, and CC in bangkok chickens.

Keywords: bangkok chicken; freeze-dry; milkfish bone flour; pectoralis muscle; testosterone

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung tulang ikan bandeng (*Chanos chanos*) yang dikeringbekukan menggunakan *freeze-dry* terhadap kadar testosteron pada otot *pectoralis*, bobot otot *pectoralis*, dan lingkaran dada pada ayam bangkok (*Gallus gallus domesticus*). Penelitian ini menggunakan 10 ekor ayam bangkok jantan dengan umur 3-4 bulan yang terbagi menjadi dua kelompok perlakuan yaitu P0 (kontrol) dan P1 (tepung tulang ikan bandeng sebanyak 3,3 g/ekor/hari). Sebelum dilakukan penelitian dilakukan aklimatisasi selama 7 hari kemudian tepung tulang ikan bandeng diberikan setiap hari secara oral selama 35 hari. Pengukuran lingkaran dada ayam bangkok dilakukan pada hari ke 7, 14, 21, 28, dan 35. Pada

akhir penelitian ayam dinekropsi, kemudian dilakukan penimbangan otot *pectoralis* dan sampel homogenat otot *pectoralis* disentrifugasi dingin. Selanjutnya supernatan dikoleksi dan dianalisis menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk mengetahui kadar testosteron pada otot *pectoralis*. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *independent sample T-Test* dengan bantuan SPSS versi 26. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) pada kadar hormon testosteron otot *pectoralis*, bobot otot *pectoralis* dan lingkaran dada ayam bangkok. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian tepung tulang ikan bandeng dengan metode *freeze-dry* dengan dosis 3,3 g/ekor/hari secara oral selama 35 hari dapat meningkatkan kadar testosteron pada otot *pectoralis*, bobot otot *pectoralis* dan lingkaran dada pada ayam bangkok.

Kata kunci: ayam bangkok; *freeze-dry*; otot *pectoralis*; tepung tulang ikan bandeng; testosteron

Pendahuluan

Ayam bangkok merupakan ayam yang berasal dari Thailand dan banyak dikembangkan di Indonesia (Zahra, 2023). Ayam tersebut juga berhasil dikembangkan sebagai bibit unggul, dan juga untuk mencukupi kebutuhan protein hewani, maupun untuk sekedar hobi atau kepentingan bisnis (Budi *et al.*, 2023; Zahra, 2023). Keunggulan ayam bangkok terletak pada postur tubuh yang gagah, dan memiliki otot yang kuat (Endo *et al.*, 2021; Sidiqi *et al.*, 2023). Organ otot berperan dalam metabolisme tubuh dan sebagai penyimpanan protein (Puspita *et al.*, 2016; Endo *et al.*, 2021). Selain dipengaruhi oleh protein, performa ayam bangkok khususnya performa otot dipengaruhi juga oleh hormon testosteron (Astuti *et al.*, 2021; Yuneldi *et al.*, 2021a; Yuneldi *et al.*, 2023). Hormon testosteron merupakan hormon yang vital pada performa otot ayam (Astuti *et al.*, 2020; Yuneldi *et al.*, 2021d). Untuk meningkatkan performa otot ayam bangkok membutuhkan biaya yang tidak murah, dan apabila menggunakan bahan sintesis yang instan dapat menyebabkan *down-regulation* (Pomara *et al.*, 2016), namun ada alternatif yang murah dan aman yaitu protein yang dihasilkan dari tulang ikan bandeng yang diinovasi menjadi tepung tulang ikan bandeng.

Tulang ikan bandeng memiliki kadar protein dan mineral yang melimpah (Toppe *et al.*, 2007; Bechtel *et al.*, 2019; Wulandari & Kusumasari, 2019; Sidiqi *et al.*, 2023). Protein yang terkandung dapat mempengaruhi aktivitas testosteron karena protein terlibat dalam proses enzimatik dalam sintesis hormon (Hanai & Esashi, 2012; Zamir *et al.*, 2021). Perbesaran massa otot muncul karena

testosteron memacu sintesis protein di dalam otot. Peningkatan absorpsi asam amino yang dilanjutkan dengan sintesis protein terjadi pada otot yang terstimulasi testosteron (Schiaffino *et al.*, 2013). Tulang ikan bandeng dapat menjadi sumber asam amino untuk sintesis protein di dalam otot (Sidiqi *et al.*, 2019). Menurut Saragih *et al.* (2019) bahwa pemberian protein berperan penting dalam pertumbuhan otot *pectoralis*. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kandungan protein dalam pakan ayam memiliki pengaruh yang cukup besar terhadap pertumbuhan ayam dan juga meningkatkan efisiensi sistem pencernaan (Ravidran *et al.*, 2013; Beski *et al.*, 2015; Saragih *et al.*, 2019). Namun, dikhawatirkan kadar protein dapat labil dalam proses pemanasan sehingga perlu dilakukan pengeringbekuan menggunakan *freeze-dry* selama pembuatan tepung tulang ikan bandeng. Pemberian bubuk cangkang kerang darah (*Anadara granosa* [Linnaeus, 1758]) dengan dosis 0,9 mg/kg BB dapat meningkatkan lingkaran dada ayam pelung (Yuneldi *et al.*, 2023). Menurut Saragih *et al.* (2017), ayam broiler dan ayam pelung yang diberikan pakan berprotein tinggi dapat meningkatkan luas area *myofiber* pada hari ke-7 dan ke-14 dibandingkan dengan ayam broiler dan ayam pelung yang diberi pakan rendah protein. Menurut Sidiqi *et al.* (2023), pemberian tepung tulang ikan bandeng (*Chanos chanos*) 3,3 g dicampurkan dengan bubuk cangkang kerang darah (*Anadara nodifera*) 6,6 g dapat meningkatkan kadar testosteron pada otot *pectoralis* dan serum, serta performa otot pada ayam bangkok jantan. Namun, penggunaan tepung tulang ikan bandeng dengan metode *freeze-dry* belum diteliti.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh tepung tulang ikan bandeng dengan metode *freeze-dry* terhadap kadar hormon testosteron otot *pectoralis*, bobot otot *pectoralis*, dan lingkaran dada pada ayam bangkok.

Materi dan Metode

Semua prosedur penelitian telah mendapat persetujuan tim *ethical clearance* dari laboratorium pengujian dan penelitian terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada dengan nomor 00009/04/LPPT/III/2021. Sepuluh ekor ayam bangkok jantan umur 3-4 bulan ditempatkan dalam kandang individu yang terbagi menjadi dua kelompok perlakuan yaitu P0 (kontrol: pakan standar tanpa tepung tulang ikan bandeng) dan P1 (pakan standar dan tepung tulang ikan bandeng sebanyak 3,3 g/ekor/hari). Sebelum diberi perlakuan dilakukan aklimatisasi selama 7 hari dan selanjutnya suplemen tepung tulang ikan bandeng sebanyak 3,3 g diberikan secara oral (dicekok) setiap hari selama 35 hari, serta pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*.

Pembuatan tepung tulang ikan bandeng dilaksanakan di Laboratorium Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Pembuatan tepung tulang ikan bandeng dilakukan sesuai dengan modifikasi metode Wulandari & Kusumasari (2019), dan hanya direbus dengan air (Sidiqi *et al.*, 2023). Pada proses pengeringan dimodifikasi dengan menggunakan *freeze-dry* selama 3 hari dengan suhu -81°C agar tulang lebih lunak. Selanjutnya tulang ikan bandeng dihancurkan menggunakan mesin penggiling di pusat antar universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada agar menjadi tepung (Divani, 2023; Rochmah, 2023; Zahra, 2023).

Pengambilan sampel lingkaran dada dilakukan pada hari ke 7, 14, 21, 28, dan 35 dengan menggunakan pita ukur. Pengambilan sampel dengan cara melingkarkan pita ukur pada dada, tepat pada *carina sterni*, kemudian memutar hingga bawah sayap ayam (Modifikasi Abdel & Lattif, 2019; Santoso *et al.*, 2010; Sitanggang *et al.*, 2016). Pada hari ke-35, ayam bangkok dinekropsi dengan cara penyembelihan secara halal. Setelah itu, dibedah pada bagian abdomen menggunakan gunting dan pisau

bedah. Selanjutnya otot dada sebelah kiri ditimbang untuk mengetahui bobot otot *pectoralis* ayam tersebut (Saragih *et al.*, 2019). Proses selanjutnya otot *pectoralis* dipotong untuk kebutuhan analisis kadar testosteron. Sebelum dilakukan pengujian, 100 mg otot *pectoralis* yang telah ditumbuk dihomogenisasi ke dalam tabung *ependorf* 1,5 mL yang berisi 1 mL *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Sampel kemudian dilakukan siklus beku-cair sebanyak dua kali untuk memecah membran sel dengan memasukkan sampel ke dalam *freezer* selama semalam hingga membeku. Proses dilanjutkan dengan melakukan *thawing* pada sampel yang beku supaya kembali pada keadaan semula. Sampel yang sudah mencair dimasukkan ke dalam *freezer* selama 4-5 jam, kemudian dikeluarkan lagi untuk didiamkan pada suhu ruangan agar mencair dan disebut sampel homogenat. Sampel homogenat disentrifugasi dingin selama 8 menit pada kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C . Selanjutnya sampel diambil supernatannya dan dipisahkan dari homogenat awal, kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan pengujian kadar testosteron dengan ELISA (Yuneldi *et al.*, 2021b; Yuneldi *et al.*, 2021c; Sidiqi *et al.*, 2023). Analisis ELISA dengan metode kompetitif dilakukan sesuai dengan petunjuk pabrikan dalam KIT (Calbiotech) (Astuti *et al.*, 2018; Astuti *et al.*, 2019; Yuneldi *et al.*, 2021d).

Semua parameter dianalisis secara statistik menggunakan *independent sample T-Test*. Apabila memiliki nilai $P < 0,05$ menunjukkan data yang diujikan berbeda signifikan. Analisis dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 26 (Yuneldi *et al.*, 2023).

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengujian kadar Nitrogen (N) pada tepung tulang bandeng memperoleh hasil sebagai berikut (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil analisis kadar protein tepung tulang ikan bandeng dari Laboratorium Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP)

No	Parameter Uji	Satuan	Tepung Ikan TH 23,05	Metode
1	N Total	%	3,88	Kjeldahl

Pada pembuatan tepung tulang bandeng dilakukan analisis protein menggunakan metode kjeldahl yang didapatkan hasil kandungan protein pada tepung tulang ikan bandeng yaitu 24,25%. Menurut Rosaini *et al.* (2015), hasil tersebut diperoleh dari perhitungan dengan rumus kadar protein total (%) = %Kadar Nitrogen x Faktor Konversi (6,25). Pada penelitian didapatkan kadar nitrogen total sebanyak 3,88%, sehingga penentuan kadar protein dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Kadar protein total (\%)} &= \% \\ \text{Kadar Nitrogen x Faktor Konversi (6,25)} \\ \text{Kadar protein total (\%)} &= 3,88\% \times 6,25 \\ \text{Kadar protein total (\%)} &= 24,25\% \end{aligned}$$

Tabel 2. Rerata kadar hormon testosteron otot *pectoralis* (ng/100 mg) pada ayam bangkok kelompok kontrol (P0) dan kelompok perlakuan yang diberi suplementasi tepung tulang ikan bandeng (P1) selama 35 hari

P0	P1
1,88 ± 0,81 ^b	3,78 ± 0,25 ^a

^{a,b} Huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (P < 0,05)

Hasil penelitian rerata kadar hormon testosteron pada otot *pectoralis* menunjukkan bahwa P1 (diberi tepung tulang ikan bandeng) berbeda signifikan dengan P0 (kontrol) (P < 0,05) (Tabel 2). Peningkatan kadar testosteron pada otot *pectoralis* karena pemberian tambahan tepung tulang ikan bandeng yang mengandung protein sebesar 24,25%. Protein tersebut dapat menstimulasi dan mengaktifkan enzim-enzim yang berperan dalam sintesis testosteron. Menurut Shidiqi *et al.* (2023), protein yang terkandung di dalam tepung tulang ikan bandeng dapat menambahkan protein yang dibutuhkan tubuh untuk menjaga ketersediaan enzim dalam proses biosintesis dan pensinyalan testosteron. Menurut Wang *et al.*, (2017) dan Hanai & Esashi (2012), kekurangan protein dapat mengurangi enzim 3β-hidroksisteroid dehidrogenase (3β-HSD; HSD3B), 17α-hidroksilase/17,20 liase (CYP17A1) dan tipe 3 17β-hidroksisteroid dehidrogenase (17β-HSD3, HSD17B). Enzim tersebut berperan dalam proses biosintesis testosteron (Wang *et al.*, 2017). Defisiensi 17β-hidroksisteroid dehidrogenase tipe 3 (17βHSD3) dapat menyebabkan gangguan

perkembangan seksual karena terhambatnya konversi androstenedion menjadi testosteron (Grimbly *et al.*, 2016). Hasil tersebut sesuai dengan Sidiqi *et al.* (2023), yang menjelaskan bahwa tepung tulang ikan bandeng yang dicampurkan dengan bubuk cangkang kerang (*Anadara nodifera*) dapat meningkatkan kadar testosteron otot *pectoralis*. Hasil tersebut berbeda dengan yang hanya diberikan tepung tulang ikan bandeng, walaupun lebih tinggi dari pada kontrol tetapi tidak berbeda signifikan (Sidiqi *et al.*, 2023).

Tabel 3. Rerata bobot otot *pectoralis* (g) pada ayam bangkok kelompok kontrol (P0) dan kelompok perlakuan yang diberi suplementasi tepung tulang ikan bandeng (P1) selama 35 hari

P0	P1
128 ± 23,03 ^b	261,2 ± 20,93 ^a

^{a,b} Huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (P < 0,05)

Hasil penelitian rerata bobot otot dada menunjukkan bahwa P1 (diberi tepung tulang ikan bandeng) berbeda signifikan dengan P0 (kontrol) (P < 0,05) (Tabel 3). Penambahan protein dari tepung tulang bandeng sebesar 24,25% dapat meningkatkan bobot otot dada ayam bangkok. Menurut Saragih & Daryono (2012), bobot otot *pectoralis*, luas otot *pectoralis* dan diameter myofiber otot *pectoralis* pada ayam broiler dan pelung yang diberi ransum tinggi protein berbeda signifikan dengan ayam broiler dan pelung yang diberi ransum rendah protein. Protein diketahui juga dapat merangsang proliferasi sel satelit dalam meregenerasi *myofiber* untuk pertumbuhan otot yang lebih baik (Saragih *et al.*, 2019). Testosteron yang mengalami peningkatan dan asupan gizi yang seimbang (protein yang cukup) dapat mempengaruhi massa dan kekuatan otot (Fu *et al.*, 2021).

Hasil penelitian rerata lingkaran dada pada hari ke-35, 28, 21, 14 menunjukkan bahwa P1 (diberi tepung tulang ikan bandeng) berbeda signifikan dengan P0 (kontrol) (P < 0,05) (Tabel 4). Peningkatan lingkaran dada pada ayam bangkok disebabkan karena penambahan tepung tulang ikan bandeng yang mengandung protein sebesar 24,25%. Menurut Kurniasih *et al.* (2017) dan

Tabel 4. Rerata lingkaran dada (cm) pada ayam bangkok kelompok kontrol (P0) dan kelompok perlakuan yang diberi suplementasi tepung tulang ikan bandeng (P1) selama 35 hari

Perlakuan (P)	Rerata lingkaran dada (cm), hari ke-				
	7	14	21	28	35
P0	32,13 ± 5,04 ^a	32,51 ± 5,07 ^b	33,50±5,64 ^b	35,43±4,65 ^b	36,23 ± 3,33 ^b
P1	40,20 ± 6,91 ^a	43,40 ± 5,48 ^a	45,20±5,93 ^a	47,80±5,10 ^a	48,80 ± 4,44 ^a

^{a,b} Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$)

Mahari (2017), bahwa bubuk cangkang kerang mengandung 3-4% protein. Pemberian bubuk cangkang kerang darah (*Anadara granosa* Linnaeus, 1758]) dengan dosis 0,9 mg/kg BB selama 56 hari dapat meningkatkan lingkaran dada ayam pelung (Yuneldi *et al.*, 2023). Hasil peningkatan lingkaran dada bersesuaian dengan hasil kadar testosteron otot *pectoralis* dan bobot otot *pectoralis* pada ayam bangkok yang mengalami peningkatan.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa pemberian tepung tulang ikan bandeng dengan metode pengeringbekuan menggunakan *freeze-dry* sebanyak 3,3 g/ekor/hari secara oral selama 35 hari dapat meningkatkan kadar testosteron pada otot *pectoralis*, bobot otot *pectoralis* dan lingkaran dada pada ayam bangkok.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih disampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada yang telah memberi dukungan finansial melalui Hibah Penelitian Pengembangan Departemen Tahun 2023 dengan nomor kontrak: 1142/UN.1/FKH/HK4/2023.

Daftar Pustaka

- Abdel-Lattif, F. H. (2019). The linear association between live body weight and some body measurements in some chicken strains. *Plant Archives*. 19(1): 595–599.
- Astuti, P., Airin, C. M., Hana, R. A., & Yuneldi, R. F. (2021). The Effect of Natural Aromatase Blockers on the Testicle Weight, Size of Wattle and Histopathological of Testis In Bangkok. In *BIO Web of Conferences*. 33: 1–5.
- Astuti, P., Airin, C. M., Nurrurozi, A., Aidi, R., Hana, A., Hadi, S., & Harimurti, H. (2020). Potential natural aromatase blockers on enhance the frequency and sound quality of male Canaries. In *E3S Web of Conferences*. 151: 1–3.
- Astuti, P., Airin, C. M., Sarmin, S., Nururrozi, A., & Harimurti, S. (2019). Effect of shell as natural testosterone boosters in Sprague Dawley rats. *Veterinary world*. 12(10): 1677-1681.
- Astuti, P., Airin, C. M., & Nururrozi, A. (2018). PCS-8 Oyster Shell Powder as Alternatives Macromineral for Synthetic Testosterone. *Prosiding FAVA ke-20 & KIVNAS ke-15 PDHI 2018*. 2018: 164–165.
- Astuti, P., Putra, M. N. P., Shiddiq, M. F. A., Yuneldi, R. F., Airin, C. M., & Sarmin, S. (2022). The Potency of *Anadara nodifera* Shell as Natural Testosterone Booster for Male Canary (*Seriunus canaria*). *HAYATI Journal of Biosciences*. 29(1): 107–113.
- Bechtel, P. J., Watson, M. A., Lea, J. M., Bett-Garber, K. L., Bland, J. M. (2019). Properties of bone from Catfish heads and frames. *Food Science & Nutrition*, 7(4): 1396–1405.
- Beski, S. S., Swick, R. A., & Iji, P. A. (2015). Specialized protein products in broiler chicken nutrition: A review. *Animal Nutrition*. 1(2):47–53.
- Budi, M. H. S., & Gushairiyanto, G. (2023). Phenotypic Performance and The Characterization of Growth Hormone (GH|AluI) in Bangkok Chicken Breed. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan (Indonesian Journal of Animal Science)*. 33(1): 98–108.

- Divani, A. L., (2023). Efektivitas Pemberian Tepung Tulang Bandeng (*Chanos chanos*) dengan Metode *Freeze Dry* terhadap Bobot Otot Dada (*Galus domesticus*) Jantan. Skripsi. Universitas Gadjah Mada.
- Endo, H., Tsunekawa, N., Kudo, K., Oshida, T., Motokawa, M., Sonoe, M., Wanghongsa, S., Tirawattanawanich, C., Phimpachanhvongshod, V., Sasaki, T., Yonezawa, T., & Akishinonomiya, F. (2022). Comparative morphological study of skeletal muscle weight among the red jungle fowl (*Gallus gallus*) and various fowl breeds (*Gallus domesticus*). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 338(8): 542–551.
- Fu, S., Lin, X., Yin, L., & Wang, X. (2021). Androgen receptor regulates the proliferation of myoblasts under appropriate or excessive stretch through IGF-1 receptor mediated p38 and ERK1/2 pathways. *Nutrition & Metabolism*. 18: 1–14.
- Grimbly, C., Caluseriu, O., Metcalfe, P., Jetha, M. M., & Rosolowsky, E. T. (2016). 46, XY disorder of sex development due to 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency: a plea for timely genetic testing. *International Journal of Pediatric Endocrinology*. 2016(12): 1–5.
- Hanai, M., & Esashi, T. (2012). Effect of dietary protein levels on sex hormones in growing male rats kept under constant darkness. *Experimental animals*, 61(5), 555–561.
- Pomara, C., Barone, R., Marino Gammazza, A., Sangiorgi, C., Barone, F., Pitruzzella, A., & Turillazzi, E. (2016). Effects of nandrolone stimulation on testosterone biosynthesis in leydig cells. *Journal of Cellular Physiology*. 231(6): 1385-1391.
- Puspita, U. E., Utomo, R. T., Perdamaian, A. B. I., Lesmana, I., Arijuddin, H., Erwanto, Y., Daryono, B. S., & Saragih, H. T. S. G. 2017. Effect of Varying Levels of Protein and Energy in Pre-starter Feeds on Pectoralis Muscle Development of Kampung Super Chicks (*Gallus gallus gallus*). *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 12(1): 31–37.
- Ravindran, V. (2013). Poultry feed availability and nutrition in developing countries. *Poultry development review*. 2: 60–63.
- Rochmah, J.A. (2023). Pengaruh Pemberian Tepung Tulang Bandeng (*Chanos chanos*) Metode *Freeze Dry* terhadap Lingkar Dada Ayam Bangkok (*Gallus domesticus*). Skripsi. Universitas Gadjah Mada.
- Rosaini, H., Rasyid, R., & Hagramida, V. (2017). Penetapan kadar protein secara kjeldahl beberapa makanan olahan kerang remis (*corbiculla moltipkiana prime*.) dari Danau Singkarak. *Jurnal Farmasi Higea*. 7(2): 120–127.
- Santoso, M. S., Tana, S., Mardiaty, S. M., Biologi, L., Hewan, F., Biologi, J., Matematika, F., Alam, P., Diponegoro, U., Soedharto, J. P., & Diponegoro, K. U. (2010). Efek Penambahan Virgin Coconut Oil (VCO) terhadap Perkembangan Jengger dan Bobot Testis Ayam (*Gallus sp.*). *Efek Penambahan Virgin Coconut Oil (VCO) Terhadap Perkembangan Jengger Dan Bobot Testis Ayam (Gallus sp.)*. 18(1): 20–27.
- Saragih, H. T. S. S. G., & Daryono, B. S. (2012). Effect of high-protein diet on body weight and pectoralis thoracicus muscle performance on pelung and broiler chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Animal Production*, 14(3): 199-204
- Saragih, H. T., Muhamad, A. A. K., Alfianto, A., Viniwidihastuti, F., Untari, L. F., Lesmana, I., Widyatmoko, H., & Rohmah, Z. (2019). Effects of Spirogyra jaoensis as a dietary supplement on growth, pectoralis muscle performance, and small intestine morphology of broiler chickens. *Veterinary World*. 12(8): 1233–1239.
- Saragih, H. T. S. G., Roosdianto, I., & Daryono, B. S. (2017). Pectoralis thoracicus muscle performance of hybrid chicken (f1)

- derived from crossbreed between broiler and pelung (*Gallus gallus gallus*). *Jurnal Kedokteran Hewan*. 11(2): 62–64.
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS journal*. 280(17): 4294–4314.
- Sidiqi, A. A. A., Airin, C. M., Sarmin, S., & Astuti, P. (2023). A Combination of *Anadara nodifera* Shell and Milkfish Thorns Powder Effectively Promote Springiness Index, Serum Testosterone, and Breast Muscle Testosterone in Bangkok Rooster. *HAYATI Journal of Biosciences*. 30(4): 701–710.
- Sitanggang, E. N., Hasnudi, & Hamdan. (2016). *Keragaman Sifat Kualitatif dan Morfometrik Antara Ayam Kampung, Ayam Bangkok, Ayam Katai, Ayam Birma, Ayam Bagon dan Magon Di Medan*. 3(2): 167–189.
- Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B., & Aksnes, A. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 146(3): 395–401.
- Wang, Y., Chen, F., Ye, L., Zirkin, B., & Chen, H. (2017). Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction*. 154(4): 1–21.
- Wulandari, P., & Kusumasari, S. (2019). Effect of extraction methods on the nutritional characteristics of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) bone powder. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 383: 1–5.
- Yuneldi, R. F., Airin, C. M., Saragih, H. T., Sarmin, S., Astuti, P., & Alimon, A. R. (2023). Growth, pectoralis muscle performance, and testis of pelung cockerels (*Gallus gallus gallus* [Linnaeus, 1758]) supplemented with blood clam shell powder (*Anadara granosa* [Linnaeus, 1758]). *Veterinary World*. 16(3): 474–482.
- Yuneldi, R. F., Airin, C. M., Saragih, H. T., & Astuti, P. (2021a). Application of natural aromatase blocker towards the level of testosterone in rooster layer [*Gallus gallus gallus* (Linn., 1758)]. In *Key Engineering Materials*. 884: 251–255.
- Yuneldi, R. F., Airin, C. M., Saragih, H. T. S. S. G., & Astuti, P. (2021b). Profile of thyroid hormone in male Layer chickens given by testosterone. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 686: 1–5.
- Yuneldi, R. F., Airin, C. M., Saragih, H. T., & Astuti, P. (2021c). Efficiency of testosterone administration on the performance of day old chick (DOC) Layer: Cockscomb size, T3/T4 ratio, and histopathological description of bursa fabricius. In *Atlantis Press*. 12: 35–39.
- Yuneldi, R. F., Astuti, P., Saragih, H. T., & Airin, C. M. (2021d). *Anadara granosa* shell powder improves the metabolism, testosterone level, and sound frequency of Pelung chickens. *Veterinary World*. 14(6): 1564–1571.
- Zahra, N.A. (2023). Pengaruh Pemberian Tepung Tulang Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Freeze-dry terhadap Kadar Testosteron Dada Ayam Bangkok (*Gallus domesticus*) Jantan. Skripsi. Universitas Gadjah Mada.
- Zamir, A., Ben-Zeev, T., & Hoffman, J. R. (2021). Manipulation of dietary intake on changes in circulating testosterone concentrations. *Nutrients*. 13(10): 1–22.