

GAMBARAN UMUM KAJIAN PROFIL HORMON STEROID MENGUNAKAN METODE NON-INVASIF DARI SAMPEL FESES

(GENERAL OVERVIEW ON STEROID HORMONES PROFILE USING NON INVASIVE ASSESSMENT FROM FECAL SAMPLE)

R. Taufiq Purna Nugraha¹, Bambang Purwantara², Iman Supriatna²,
Muhammad Agil², Gono Semiadi¹

¹Fakultas Kedokteran Hewan Insititut Pertanian Bogor, Bogor, Jawa Barat

²Bidang Zoologi Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong, Jawa Barat

e-mail : *tragulus@gmail.com*

(diterima Juni 2016, direvisi Juni 2016, disetujui Juli 2016)

ABSTRAK

Kajian terhadap profil hormon-hormon steroid merupakan kunci penting dalam upaya memahami aspek fisiologis satwa. Beberapa dekade terakhir telah dikembangkan metode alternatif untuk mengetahui profil hormon steroid, yaitu melalui pengukuran metabolit hormon steroid yang diekskresikan melalui ekskreta tubuh seperti feses. Metode tersebut dikenal sebagai metode non-invasif. Metode ini memungkinkan pengumpulan sampel secara terus menerus dalam jangka panjang dengan meminimalisasi gangguan terutama pada satwa liar. Kajian terhadap profil metabolit hormon steroid yang terukur dapat diaplikasikan antara lain untuk mengetahui status reproduksi, penentuan jenis kelamin, studi perilaku hingga monitoring tingkat stres satwa. Berbagai kajian dengan memanfaatkan metabolit hormon steroid telah berhasil diaplikasikan pada berbagai taksa vertebrata. Tulisan ini memberikan gambaran terkini mengenai aplikasi metode non-invasif untuk kajian profil metabolit hormon steroid dari sampel feses.

Kata kunci: non-invasif, homon steroid, metabolit hormon, feses, satwa liar

ABSTRACT

Assessments on the steroid hormones profile play an important role in understanding the physiology of species. In the last several decades an alternative method has been developed to monitor steroid hormones through measurements of steroid hormones metabolites excreted in feces, and known as non-invasive method. This method enables continues sample collection in longitudinal study with minimum disturbance especially on wildlife animals. Application of this method can be used to monitor reproductive status, determination of gender, behavioral study and monitoring of stress levels, and has been successfully applied on diverse vertebrate taxa. This paper is giving an overview of current non-invasive methods in assessing steroid hormones metabolites from fecal sample.

Keywords: non-invasive, steroid hormones, metabolite hormone, feces, wildlife

PENDAHULUAN

Kajian terkait profil hormon steroid merupakan hal yang menarik bagi para peneliti, karena kajian tersebut terlibat pada semua aspek fisiologis tubuh mulai dari regulasi, metabolisme, kesehatan reproduksi, perkembangan hingga ekspresi dari perilaku (Touma & Palme 2005). Metoda klasik yang digunakan selama ini dalam pengukuran kadar hormon steroid adalah menggunakan sampel darah yang dikoleksi secara berseri yang

dikenal dengan metode invasif. Metode invasif hanya mudah diterapkan pada satwa domestik yang cukup jinak untuk ditangani (Brown *et al.* 1994). Namun demikian, metode invasif menjadi tidak efektif dan sulit untuk diterapkan pada satwa liar yang relatif sulit ditangani dan peka terhadap cekaman stres. Stres yang muncul akibat, metode invasif karena proses penangkapan, *restraint*, bahkan pembiusan diketahui dapat mempengaruhi gambaran kadar hormon pada saat

pengambilan sampel (Brown *et al.* 1994; Hamasaki *et al.* 2001; Möstl *et al.* 2005; Schwarzenberger *et al.* 1996). Stres yang terjadi pada waktu penanganan juga dapat berbahaya bagi keselamatan satwa itu sendiri dan operator.

Beberapa dekade terakhir telah dikembangkan metode alternatif untuk mengkaji profil suatu hormon steroid melalui pengukuran metabolit hormon yang dieksresikan lewat ekskreta seperti melalui ekskreta (feses dan urin) (Brown *et al.* 1994; Millspaugh & Washburn 2004; Schwarzenberger *et al.* 1996; Wasser *et al.* 1988). Cara koleksi tersebut dikenal sebagai metoda non-invasif. Pengukuran metabolit hormon steroid dari sampel feses dan urin memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan metoda konvensional (invasif). Pengumpulan sampel dari suatu individu secara non invasif dapat dilakukan secara terus menerus dalam periode waktu yang lama (*longitudinal study*) dengan meminimalkan gangguan aktivitas dan lingkungan sosial satwa tersebut (Hirschenhauser *et al.* 2005). Kajian profil hormon secara non-invasif tersebut telah berhasil diterapkan pada berbagai *taxa* mulai dari primata (Murray *et al.* 2013; Shimizu 2005; Shutt *et al.* 2012), herbivora (Ashley *et al.* 2011; Hamasaki *et al.* 2001; Huber *et al.* 2003), karnivora (Brown & Wildt 1997; Goymann *et al.* 2001; Graham & Brown 1997), burung dan unggas (Hirschenhauser *et al.* 2005; Wasser *et al.* 2010), mamalia air (Burgess *et al.* 2013), hingga reptil dan amfibia (Ganswindt *et al.* 2014; Kummrow *et al.* 2011).

Pengukuran metabolit hormon dari sampel urin lebih sulit diterapkan karena

koleksi sampel urin lebih sulit dilakukan dan rentan terhadap kontaminasi (Schwarzenberger *et al.* 1996). Namun demikian, metode ini masih dapat dilakukan bahkan di habitat alami sekalipun (Habumuremyi *et al.* 2014; Heistermann & Hodges 1995; Knott 1997, 2005). Berbeda dengan sampel urin, kajian metabolit hormon steroid menggunakan sampel feses lebih disukai, karena sampel tersebut lebih mudah dikumpulkan, baik dalam kandang maupun di habitat alaminya. Tulisan ini memberikan gambaran terkini mengenai metode non-invasif untuk kajian metabolit hormon steroid dari sampel feses meliputi: a) metode pengumpulan, penyimpanan dan pengawetan sampel feses, b) ekstraksi dan analisis metabolit hormon, dan c) aplikasi metode non invasif untuk monitoring status reproduksi, penentuan jenis kelamin, studi perilaku hingga monitoring tingkat stres pada berbagai taksa vertebrata.

Metabolisme dan Eksresi Hormon Steroid

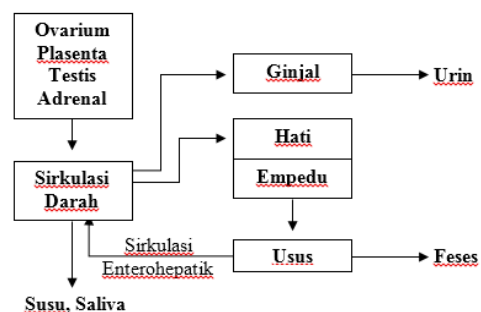
Hormon steroid diproduksi oleh kelenjar-kelenjar endokrin dan diedarkan melalui sistem sirkulasi darah. Hormon selanjutnya dimetabolisir di target organ, hati, dan ginjal yang kemudian dikeluarkan tubuh melalui saluran pencernaan, saluran urinaria, kelenjar saliva, dan kelenjar ambing (Hirschenhauser *et al.* 2005; Palme *et al.* 2005; Schwarzenberger *et al.* 1997). Setelah selesai digunakan, hormon akan mengalami inaktivasi oleh target organ, hati dan ginjal. Inaktivasi ini diperlukan untuk menghentikan dan mengontrol aktivitas hormon pada target organ dan fisiologi tubuh. Selain itu, hormon steroid

seperti estradiol dan testosteron mempunyai sifat bioaktif yang sangat tinggi dan dapat bersifat toksik jika dibiarkan tetap berada di lingkungan tubuh dalam konsentrasi yang tinggi sehingga tubuh melakukan proses deaktivasi, diantaranya dengan mengkonjugasi hormon tersebut dalam bentuk yang tidak aktif dan mudah larut dalam air (Möstl *et al.* 2005). Pada ekskresi metabolit hormon seperti urin, senyawa metabolit akan mengalami konjugasi dengan derivat sulfat atau glukoronida agar menjadi senyawa yang bersifat hidrofilik. Metabolit hormon yang sudah tidak aktif ini akhirnya dikeluarkan melalui urin dan feses. Namun, beberapa hormon tetap diekskresikan sebagai senyawa hormon utamanya (*parent compound*) (Norris 2007).

Berbeda dengan pengukuran hormon pada sampel darah yang dapat menggambarkan kadar hormon pada waktu pengambilan pengukuran metabolit steroid dari feses merupakan hasil akumulasi yang dikeluarkan pada waktu mengeluarkan kotoran (Hirschenhauser *et al.* 2005). Oleh karena itu, terdapat jeda antara kadar metabolit hormon pada feses dengan kadar hormon yang sebenarnya dalam sirkulasi darah (Schwarzenberger *et al.* 1996). Jarak waktu antara kadar hormon pada plasma darah dengan kadar pada feses ditentukan oleh *gut passage time* (GPT) yaitu waktu dari dilepaskannya ekskresi metabolisme hormon oleh hati melalui kantung empedu menuju saluran pencernaan hingga keluar bersama feses dan urin, yang juga sangat dipengaruhi oleh kecepatan metabolisme dari spesies satwa tersebut (Hirschenhauser *et al.* 2005; Palme 2005;

Schwarzenberger *et al.* 1996). Pada sampel feses metabolit steroid diekskresikan antara 30 menit sampai dengan beberapa hari bergantung pada spesies, aktifitas bahkan musim (Ashley *et al.* 2011; Millsbaugh & Washburn 2003; Palme 2005). Namun pada mamalia besar umumnya berkisar antara satu sampai dengan dua hari (Shutt *et al.* 2012; Weingrill *et al.* 2011).

Jalur ekskresi metabolit hormon steroid yang dikeluarkan melalui urin dan melalui feses dapat berbeda pada setiap jenis satwa, baik dari persentase volume maupun jenis metabolit hormon yang diekskresikan (Schwarzenberger *et al.* 1996). Analisis atau pengukuran hormon secara non-invasif terkadang harus menggunakan sampel urin karena volume persentase pengeluaran metabolit hormonnya tertinggi metabolit hormon yang diperiksa diekskresikan lewat urin. Sebagai contoh, metabolit hormon estrogen lebih dominan diekskresikan melalui urin pada ungulata sedangkan pada karnivora lebih dominan melalui feses (Millsbaugh & Washburn 2004; Schwarzenberger *et al.* 1996).



Gambar 1. Organ yang terlibat dalam produksi, metabolisme dan ekskresi hormon steroid (dimodifikasi dari Schwarzenberger *et al.* (1997)).

Pada babon (*Papio cynocephalus cynocephalus*), perbandingan proporsi ekskresi steroid melalui feses dan urin adalah 10% : 90% untuk estradiol dan 40% : 60% untuk progesteron (Wasser *et al.* 1994). Pada kucing domestik, perbandingan proporsi estradiol pada feses dan urin adalah 97% : 3% dan 96.7% : 2.6% untuk metabolit progesteron (Brown *et al.* 1994). Oleh karena itu, analisis metabolit hormon melalui feses tidak selalu dapat diterapkan karena sangat bergantung dari jenis satwa dan kelompok hormon steroid yang akan dianalisis.

METODE PENELITIAN

Metodologi Pengumpulan Sampel Feses Untuk Metode Non-Invasif

Untuk keperluan analisis hormon menggunakan metode non-invasif, sampel feses sebaiknya dikoleksi dalam keadaan segar yaitu segera setelah satwa defekasi. Koleksi sampel umumnya dilakukan pada pagi hari disertai pengamatan terhadap perilaku satwa (Velloso *et al.* 1998). Konsentrasi beberapa hormon di dalam sirkulasi tubuh pada berbagai jenis mamalia diketahui dapat bervariasi sepanjang hari, sehingga kadar metabolit hormon di dalam ekskreta diduga memiliki variasi yang sama (Millspaugh & Washburn 2004). Pada sampel feses gambaran hormon merupakan kompilasi dari periode waktu yang lebih lama akibat adanya GPT (Heistermann 2010). Pada mamalia besar dengan GPT lebih lama seperti pada ruminansia atau primata besar seperti orangutan perbedaan ini menjadi tidak terlihat (Millspaugh & Washburn 2004;

Weingrill *et al.* 2011). Untuk sampel feses pada mamalia kecil dengan GPT lebih singkat seperti mencit dan tikus, variasi dari kadar hormon sepanjang hari dapat terjadi (Millspaugh & Washburn 2004), sehingga akan menjadi lebih baik jika sampel selalu dikoleksi pada waktu yang sama (Heistermann 2010)

Sampel yang dikoleksi harus bebas dari kontaminan seperti debu, urin, dan kotoran lain. Feses yang terkontaminasi oleh urin dapat menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi dari progesteron (P₄) dan estrogen (E₂). Hal ini diduga karena terjadinya proses perubahan bentuk metabolit hormon pada urin dari terkonjugasi menjadi tidak terkonjugasi (Wasser *et al.* 1988). Satwa yang ditempatkan di dalam kandang individu atau yang tidak berkelompok, pengumpulan sampel dapat dilakukan dengan mudah. Namun pada satwa yang ditempatkan di dalam kandang kelompok atau berpasangan, identifikasi sampel menjadi lebih sulit. Oleh karena itu, untuk memudahkan identifikasi dapat ditambahkan bahan pewarna makanan pada ransum per individu satwa (Velloso *et al.* 1998, Hesterman *et al.* 2005). Selain menggunakan pewarna, dapat juga ditambahkan biji yang tidak dapat dicerna atau pemberian arang pada pakan satwa, sehingga feses dari tiap individu dapat dibedakan (Hirschenhauser *et al.* 2005, Hesterman *et al.* 2005).

Volume sampel feses yang diperlukan untuk analisis tidak terlalu banyak. Untuk analisis sampel feses segar (basah) hanya

dibutuhkan sampel sebanyak 0.5 g (Palme *et al.* 1996) sedangkan untuk sampel feses yang telah dikeringkan, Millspaugh & Washburn (2004) menyarankan jumlah sampel minimum adalah lebih dari 0.02 g berat feses kering. Dalam analisis hormon umumnya digunakan sampel feses sebanyak 0.05-0.1 g berat feses kering (Heistermann *et al.* 1995). Pengukuran kadar hormon dengan jumlah sampel feses yang lebih kecil dapat menyebabkan biasanya hasil pengujian (Palme 2005). Volume sampel yang terlalu kecil tersebut menyebabkan lonjakan hormon akibat ekstraksi yang berlebihan karena cairan pengeksktraksi (misalnya metanol) tidak proporsional dengan konsentrasi hormon dalam feses (Millspaugh & Washburn 2004). Pada jenis-jenis satwa tertentu dengan volume feses yang lebih sedikit, dapat dilakukan penggabungan sampel-sampel dalam periode waktu tertentu (pagi dan siang atau koleksi selama dua hari berturut-turut) yang akan memberikan gambaran konsentrasi hormon pada kurun waktu tersebut (Millspaugh & Washburn 2004).

Walaupun volume dari sampel yang diperlukan tidak banyak, pada mamalia metabolit hormon steroid pada feses tidak tersebar dengan merata di dalam matriks feses. Oleh karena itu, pada saat koleksi sampel feses perlu dihomogenkan dengan cara mencampur bagian dalam dan bagian luar secara merata (Brown *et al.* 1994; Millspaugh & Washburn 2004; Möstl *et al.* 2005). Demikian juga untuk feses dalam bentuk pelet, homogenasi perlu dilakukan untuk memastikan kandungan hormon yang merata

didalam feses saat analisis dilakukan (Millspaugh & Washburn 2004).

Penyimpanan dan Pengawetan Sampel Feses

Salah satu kendala penggunaan sampel feses untuk analisis metabolit steroid adalah tingginya kandungan mikroba yang terdapat di dalam feses tersebut. Enzim yang dihasilkan oleh bakteri dalam feses merupakan penyebab utama yang dapat mempengaruhi kondisi metabolit dalam feses (Palme 2005; Wasser *et al.* 1988). Proses degradasi oleh mikroba dan metabolit yang dihasilkannya akan memengaruhi konsentrasi kandungan metabolit hormon steroid dalam feses. Akibat proses tersebut dapat menyebabkan proses amplifikasi (peningkatan) jumlah hormon karena adanya reaksi silang antara antibodi dengan metabolit-metabolit baru yang terbentuk atau terjadi penurunan nilai akibat degradasi dari struktur metabolit hormon dalam feses menjadi bentuk yang kurang imunoreaktif sehingga tidak dikenali oleh antibodi (Terio *et al.* 2002; Wasser *et al.* 1988). Berbagai kajian telah dilakukan terkait metoda pengawetan sampel feses (Galama *et al.* 2004; Khan *et al.* 2002; Lynch *et al.* 2003; Terio *et al.* 2002). Secara garis besar terdapat tiga metoda dasar, yaitu :

1. Penyimpanan sampel feses pada suhu sangat rendah

Pada metoda pendinginan, sampel dibekukan dengan cara disimpan pada suhu di bawah 0°C. Sebagian besar literatur

mempergunakan suhu -20°C untuk penyimpanan sampel (Brown *et al.* 1994; Goymann *et al.* 1999; Hamasaki *et al.* 2001; Hirschenhauser *et al.* 2005; Shideler *et al.* 1993; Velloso *et al.* 1998). Beberapa peneliti juga menggunakan berbagai kisaran suhu seperti -7°C dan -10°C (Goymann *et al.* 1999; Schoenecker *et al.* 2004), -15°C (Oates *et al.* 2002), bahkan penyimpanan dalam nitrogen cair yang memungkinkan pembekuan pada suhu -196°C (Morato *et al.* 2004). Pembekuan sesegera mungkin setelah koleksi feses sangat direkomendasikan karena akan memperlambat bahkan menghentikan metabolisme mikroba (Hirschenhauser *et al.* 2005; Khan *et al.* 2002). Namun demikian, pembekuan sampel feses tidak akan menghancurkan enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang dapat memetabolisme steroid apabila enzim-enzim tersebut tidak diinaktivasi terlebih dahulu (dengan pengeringan, alkohol, atau pemanasan). Oleh sebab itu, metabolisme steroid pada feses dapat berlanjut setelah *thawing* (Möstl *et al.* 2005), sehingga pemerosesan sample feses pasca *thawing* harus dilakukan secara cepat.

2. Pengeringan sampel

Proses pengeringan sampel dapat menurunkan kadar air yang terdapat dalam sampel hingga tingkat terendah sehingga aktivitas mikroba menjadi terhenti. Metode pengeringan sampel adalah metode kering beku (liofilisasi) dengan menggunakan mesin *lyophilizer/freeze dryer* (Khan *et al.* 2002; Terio *et al.* 2002; Wasser *et al.* 1988). Pada

metoda kering beku, sampel akan didinginkan pada suhu yang sangat rendah (-40°C) dan diikuti oleh penurunan tekanan di dalam ruangan pembekuan. Hal ini akan menyebabkan air yang membeku di dalam sampel akan mengalami sublimasi dari fase padat menjadi fase gas. Metode ini juga dapat meminimalisasi kerusakan senyawa dalam sampel, terutama protein jika dibandingkan dengan pengeringan menggunakan pemanasan. Namun metode kering beku tersebut tidak memungkinkan diterapkan dalam kondisi lapang karena diperlukan peralatan yang khusus serta sumber listrik. Metode pengeringan lain adalah dengan pemanasan mempergunakan *oven* konvensional atau *oven* yang mempergunakan panas sinar matahari (*solar oven*) (Galama *et al.* 2004; Terio *et al.* 2002). Pada cheetah, pengeringan sampel feses menggunakan *oven* hanya dapat dilakuka untuk mengukur metabolit androgen, sedangkan untuk metabolit hormon lainnya menunjukkan hasil yang bervariasi dibandingkan dengan kontrol (Terio *et al.* 2002). Namun pada badak hitam, metabolit progesteron pada sampel feses yang dikeringkan dengan *solar oven* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan kontrol (Galama *et al.* 2004).

3. Penggunaan senyawa kimia untuk mematikan dan menekan pertumbuhan bakteri

Berbagai bahan kimia telah dicoba sebagai media pengawetan untuk sampel feses, diantaranya *sodium azide*, *asam ascorbat*, 1-4 *sacro lactone*, arang, dan NaCl

(Wasser *et al.* 1988). Penambahan asam dan alkohol/etanol pada sampel feses dapat dilakukan karena steroid tidak terpengaruh oleh bahan-bahan tersebut tidak berpengaruh terhadap steroid di dalam feses (Möstl *et al.* 2005). Bahan kimia yang umum dipergunakan sebagai media pengawetan adalah ethanol dan methanol (Lynch *et al.* 2003; Ostner *et al.* 2003; Weingrill *et al.* 2004). Berbagai konsentrasi etanol sudah digunakan, mulai dari konsentrasi 70% hingga kadar 99,9% (absolut) (Lynch *et al.* 2003; Weingrill *et al.* 2004). Penggunaan etanol menunjukkan hasil yang lebih baik jika dipadukan dengan penyimpanan pada suhu rendah (Khan *et al.* 2002; Lynch *et al.* 2003; Weingrill *et al.* 2004; Ziegler *et al.* 2000a). Terlepas dari metode pengawetan yang dipilih, setiap hewan memiliki komposisi metabolit hormon dan komposisi mikroba pada saluran cerna yang berbeda, sehingga diperlukan validasi terhadap metoda penyimpanan yang digunakan untuk setiap jenis sampel feses satwa dan jenis metabolit hormon yang akan diperiksa (Khan *et al.* 2002; Lynch *et al.* 2003; Palme 2005).

Ekstraksi Metabolit Hormon Steroid

Secara umum proses ekstraksi bertujuan untuk memekatkan atau meningkatkan konsentrasi dari substansi yang akan dianalisis, sekaligus menyingkirkan substansi-substansi lain yang dapat mempengaruhi proses analisis (Möstl *et al.* 2005). Terdapat berbagai macam metoda ekstraksi yang dapat dilakukan untuk

memisahkan steroid. Hal ini ditentukan oleh bentuk metabolit yang diekskresikan. Polaritas dari metabolit menentukan jenis pelarut yang akan digunakan, sebagai contoh, *diethylether* terlalu non polar untuk mengekstrak *tetra* atau *pentahydroxylated* steroid. Steroid dalam bentuk terkonjugasi juga tidak dapat diekstraksi, sedangkan metabolit dalam bentuk tidak terkonjugasi dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik (seperti ether, ethanol, methanol). Untuk metabolit terkonjugasi, harus terlebih dahulu dilakukan hidrolisis atau dilakukan saturasi kadar air dengan garam (NaCl, ammonium sulfat) dan menurunkan kadar pH (Möstl *et al.* 2005).

Salah satu uji yang dapat dilakukan untuk mengetahui polaritas metabolit steroid adalah dengan menggunakan uji difrensiasi antara ether dan air. Metabolit hormon dalam bentuk terkonjugasi akan terlarutkan dalam air (hidrofilik) dan yang tidak terkonjugasi akan larut dalam pelarut organik (ether) (Velloso *et al.* 1998). Untuk sampel feses dari burung dan unggas lainnya dimana feses dan urin bercampur, diperlukan metoda ekstraksi yang dapat mencakup steroid terkonjugasi dan tak terkonjugasi (Möstl *et al.* 2005). Metabolit steroid dari sampel feses umumnya berada dalam bentuk tidak terkonjugasi, maka kebanyakan penelitian mempergunakan jenis pelarut organik dalam proses ekstraksi. Pada saat ekstraksi sampel feses dapat diproses sebagai sampel kering maupun sampel basah. Hal ini akan menentukan perhitungan hasil akhir dimana konsentrasi hormon akan

dinyatakan dalam satuan berat kering fekes atau berat basah (Ziegler *et al.* 2000b). Brown *et al.* (2004) menyatakan bahwa hasil yang diperoleh akan lebih baik apabila sebelum analisis sampel dikeringkan terlebih dahulu, selanjutnya ditumbuk dan dicampur secara merata.

Analisis Metabolit Hormon

Analisis Kromatografi

Berbagai teknik analisis telah dikembangkan untuk dapat menghitung kuantitas dari hormon metabolit steroid. Secara klasik pengukuran dapat dilakukan dengan teknik kromatografi (Möstl *et al.* 2005; Ziegler & Wittwer 2005). Teknik kromatografi saat ini terus berkembang semakin modern sehingga lebih mudah dan praktis untuk dilakukan. Berbagai teknik kromatografi telah tersedia, tetapi yang umum digunakan adalah *Gas Chromatography* dan *High Pressure Liquid Chromatography*. Untuk analisis kuantitatif peralatan kromatografi umumnya disandingkan dengan detektor ultra violet (UV) atau *mass spectrometry* (MS) (Möstl *et al.* 2005; Ziegler & Wittwer 2005). Penggunaan kromatografi dengan detektor UV atau MS memiliki sensitifitas yang lebih tinggi dibandingkan teknik *immunoassay*, bahkan hingga konsentrasi 0,1 pg (Ziegler & Wittwer 2005). Keuntungan lain dari metoda ini adalah sekaligus dapat dilakukan separasi dan koleksi dari fraksi steroid yang sedang dianalisis (pemurnian). Walaupun memiliki banyak

keunggulan, metoda ini dirasa kurang praktis dan mahal untuk dilakukan pada jumlah sampel yang banyak. Selain itu diperlukan tenaga yang sangat terlatih karena pengoperasian alat yang rumit.

Analisis Immunoassay

Metoda lain yang digunakan adalah teknik *immunoassay* (Möstl *et al.* 2005). Sejak dikembangkan teknik *competitive protein binding assay* yang didasarkan pada pelabelan antigen secara radioaktif, teknik ini terus meluas dan berkembang pemakaiannya dalam analisis hormon. Berawal pada tahun 1959 untuk pengukuran kadar insulin dengan menggunakan antibodi yang spesifik terhadap insulin (Niswender & Nett 1977), teknologi *immunoassay* sejak saat itu mengalami revolusi yang sangat cepat. Salah satu aplikasinya adalah untuk analisis kuantitatif hormon steroid. Analisis yang dilakukan menggunakan prinsip kompetisi antara hormon yang telah dilabel dengan hormon pada sampel untuk berikatan pada tapak pengikat antibodi (*antibody binding site*) dengan jumlah yang terbatas (Möstl *et al.* 2005). Persentase hormon berlabel yang berikatan memiliki korelasi negatif dengan kadar hormon pada sampel, dengan artian pada sampel dengan konsentrasi hormon yang tinggi persentase hormon berlabel yang berikatan dengan tapak pengikat antibodi akan lebih sedikit. Sedangkan pada kondisi konsentrasi hormon sampel rendah, maka persentase hormon berlabel yang berikatan dengan tapak pengikat

antibody akan lebih banyak. Metoda analisis yang dilakukan umumnya berupa *radio immunoassay* (RIA, menggunakan label radioaktif) atau *enzyme immunoassay* (EIA, menggunakan label enzim) (Möstl *et al.* 2005).

Teknik RIA sudah lebih lama digunakan dan telah teruji kehandalan dan akurasi. Selain itu berbagai jenis kit analisis telah tersedia secara komersial dengan berbagai macam jenis antibodi dan label. Namun RIA juga memiliki kekurangan, selain karena penggunaan label radioaktif (walau dalam dosis yang rendah), kit analisis yang tersedia juga umumnya dibuat untuk pengujian hormon dalam darah, sehingga untuk sampel metabolit steroid terkadang memiliki reaksi silang yang cukup tinggi dengan hormon lainnya (Möstl *et al.* 2005; Ziegler & Wittwer 2005). Selain itu, pengujian hormon menggunakan RIA diperlukan peralatan dan izin khusus karena menggunakan bahan radioaktif.

Saat ini lebih banyak penelitian dan analisis hormon menggunakan teknik EIA. Teknik ini memiliki beberapa keuntungan dibanding RIA. Selain peralatan yang lebih sederhana, antibodi dan hormon berlabel dapat dibuat dan dikembangkan sendiri untuk disesuaikan pada kajian yang akan dilakukan tanpa memerlukan fasilitas khusus untuk penanganan limbah radioaktif. Selain itu untuk sampel dengan konsentrasi yang rendah teknik ini umumnya lebih sensitif dibanding RIA (Möstl *et al.* 2005; Ziegler & Wittwer 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aplikasi Kajian Hormon Secara Non-Invasif

Hormon steroid memiliki peranan yang penting dalam fisiologis verteberata (Touma & Palme 2005). Keunggulan dari kajian metabolit hormon steroid dengan metode non-invasif adalah memungkinkannya dilakukan studi jangka panjang pada satwa tanpa diperlukan kontak langsung yang dapat menyebabkan biasanya data penelitian (Brown *et al.* 1994; Hamasaki *et al.* 2001; Möstl *et al.* 2005; Schwarzenberger *et al.* 1996). Kajian hormon secara non invasif dapat digunakan untuk monitoring status reproduksi, penentuan jenis kelamin, studi perilaku hingga monitoring tingkat stres (Tabel 1.)

Kajian Status Reproduksi

Hormon steroid seperti estrogen, progesteron dan testosteron (androgen) memegang peranan kunci dalam regulasi siklus dan perilaku reproduksi pada semua satwa. Profil hormon estrogen dan progesteron dapat memberikan gambaran siklus estrus (Brown *et al.* 1995), mendeteksi kebuntingan (konsepsi) pada satwa domestik (Schwarzenberger *et al.* 1996) dan telah berhasil diaplikasikan pada beberapa satwa liar seperti pada domba liar (Schoenecker *et al.* 2004), primata (Ostner & Heistermann 2003; Shideler *et al.* 1993; Wasser *et al.* 1988; Ziegler *et al.* 2000a) dan rusa (Hamasaki *et al.* 2001). Pada satwa jantan, androgen berperan dalam proses spermatogenesis. Beberapa jenis

Tabel 1. Aplikasi Metode Non-Invasif Untuk Kajian Hormon.

| Species | Metabolit Hormon | Lokasi | Aspek Studi | Penulis |
|---|---|-------------------------|--|--|
| Kajian Status Reproduksi | | | | |
| Angsa (<i>Anser sp.</i>) | Testosteron metabolit 17 β -OH-androgen, 17-oxoandrogen | Eks- Situ | kajian steroid hormon pada angsa | Hirschenhauser <i>et al.</i> (2005) |
| Berbagai jenis Primata | Estrone conjugates (E1C) Pregnanediol-glucuronida (PdG) | Eks- Situ | status reproduksi | Shimizu (2005) |
| Beruag madu (<i>U. malayanus</i>) | Fecal testosteron | Eks- Situ | musim kawin jantan | Hesterman <i>et al.</i> (2005) |
| Beruk (<i>Macaca nemestrina</i>) Baboon (<i>Papio cynopcephalus</i>) | Estradiol-17 β Progesteron (P4) | Eks- Situ In-Situ | siklus reproduksi dan kebuntingan | Wasser <i>et al.</i> (1988) |
| Bighorn sheep (<i>Ovis canadensis</i>) | Pregnanediol-glucuronide (PdG) | Eks- Situ | deteksi kebuntingan | Schoenecker <i>et al.</i> (2004) |
| Bunglon (<i>Chamae leocalypratus</i>) | Estrogen (E2), Testosteron (T) Progesteron (P4) | Eks- Situ | siklus reproduksi | Kummrow <i>et al.</i> (2011) |
| Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>) | Epiandrosteron | Eks- Situ In-Situ | testosteron jantan | Pribbenow <i>et al.</i> (2016) |
| Duyung (<i>Dugong dugon</i>) | Progesteron (P4) Estradiol-17 β Metabolit testosteron | Eks- Situ | deteksi onset dewasa kelamin | Burgess <i>et al.</i> (2013) |
| Hairy-nosed Wombat (<i>Lasiorhinus latifrons</i>) | Testosteron (T) dihydrotestos-teron (DHT) 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (Adiol) | Eks- Situ | musim kawin jantan | Hamilton <i>et al.</i> (2000) |
| Himalayan musk deer (<i>Moschus chrysogaster</i>) | Pregnanediol-glucuronida (PdG) | Eks- Situ | deteksi kebuntingan | Mithileshwari <i>et al.</i> (2016) |
| Jaguars (<i>Panthera onca</i>) | Kortisol Testosteron | Eks- Situ | stress dan ktfitas testicular | Morato <i>et al.</i> (2004) |
| Kukang (<i>Nycticebus pygmaeus</i>) | Estron Konjugat (E1C) | Eks- Situ | siklus estrus dan kebuntingan | Jurke <i>et al.</i> (1997) |
| Langur Hanoman (<i>Presbytis entellus</i>) | Pregnanediol-glucuronida (PdG) | In-Situ | siklus reproduksi betina | Ziegler <i>et al.</i> (2000a) |
| Redfronted Lemurs (<i>Eulemur fulvus rufus</i>) | 5 α -pregnane-3 α -ol-20-one (5-P- 3OH) total estrogen (Et) | Eks- Situ | status reproduksi | Ostner & Heistermann (2003) |
| Macan dahan (<i>Neofelis nebulosa</i>) | Estrogen (E2), Progesteron (P4) | Eks- Situ | siklus reproduksi | Brown <i>et al.</i> (1995) |
| Maned Wolves (<i>Chrysocyon brachy- urus</i>) | Estradiol (E2) Testosteron (T) Progesteron (P4) | Eks- Situ | status reproduksi betina dan jantan | Velloso <i>et al.</i> (1998) |
| Rusa Sika (<i>Cervus nippon</i>) | Progesteron Testosteron | Eks- Situ | status reproduksi | Hamasaki <i>et al.</i> (2001) |
| Singa Asia, Harimau Bengal Jaguar | Prostaglandin Fecal Metabolit (13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α) | Eks- Situ | diagnosa kebuntingan | Dehnhard <i>et al.</i> (2015) |
| Two-toed sloths (<i>Choloepus didactylus</i>) | Estradiol-17 β Pregnanediol-glucuronida (PdG) Estron sulfat (E1S). | Eks- Situ | siklus ovarium | Troll <i>et al.</i> (2013) |

Lanjutan Tabel 1.

| Species | Metabolit Hormon | Lokasi | Aspek Studi | Penulis |
|--|--|---------------------|--|--|
| Penentuan Jenis Kelamin | | | | |
| <i>Cockatiels</i> (<i>Nymphicus hollandicus</i>) | Estron konjugat (E1C) | Eks-Situ | diferensiasi jantan dan betina | Tell & Lasley (1991) |
| Nokdiak (<i>Tachyglossus aculeatus</i>) | Estradiol-17 β Testosteron (T) | Eks-Situ | diferensiasi jantan dan betina | Oates <i>et al.</i> (2002) |
| Studi Perilaku | | | | |
| Assamese macaques (<i>Macaca assamensis</i>) | 11 β -hydroxyetiocholanolon (3 α ,11 β -dihydroxy-CM) | In-Situ | perilaku dominansi dan agresi | Ostner <i>et al.</i> (2008a) |
| Redfronted Lemurs (<i>Eulemur fulvus rufus</i>) | 11 β -hydroxyetiocholanolone (3 α ,11 β -dihydroxy-CM) | In-Situ | perilaku dominansi dan agresi | (Ostner <i>et al.</i> 2008b) |
| Lemur ekor cincin (<i>Lemur catta</i>) | Kortisol | In-Situ | dominansi dan hirarki betina | Cavigelli (1999) Cavigelli <i>et al.</i> (2003) |
| Lemur ekor cincin (<i>Lemur catta</i>) | Testosteron | Semi In-Situ | perilaku agresi dan musim kawin | Cavigelli & Pereira (2000) |
| KajianStres | | | | |
| Gorilla (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>) | 11 β -hydroxyetiocholanolon | In-Situ | stres | Shutt <i>et al.</i> (2012) |
| Ground caribou (<i>Rangifer tarandus granti</i>) Reindeer (<i>R. t. tarandus</i>) | Kortisol | Eks-Situ | stres | Ashley <i>et al.</i> (2011) |
| Hyna (<i>Crocota crocuta</i>) | Kortiskosteron | In-Situ | stres | Goymann <i>et al.</i> (2001) |
| Kelelawar (<i>Eptesicus isabellinus</i>) | Fecal Kortisol | In-Situ | stres | Kelm <i>et al.</i> (2016) |
| Meerkat (<i>Suricata suricatta</i>) | 11 β -hydroxyetiocholanolon | Eks-Situ | stres | Braga Goncalves <i>et al.</i> (2016) |
| Nile crocodiles (<i>Crocodylus niloticus</i>) | Kortiskosteron (11 β ,21-diol-20-one) 11-oxoetiocholanolon | Eks-Situ | stres | Ganswindt <i>et al.</i> (2014) |
| Orangutan kalimantan (<i>Pongo pygmaeus</i>) | 11 β -hydroxyetiocholanolon Epiandrosteron | In-Situ | stres dan bimaturisme jantan pada orangutan | Marty <i>et al.</i> (2015) |
| Orangutan sumatra (<i>Pongo abelii</i>) | 11 β -hydroxyetiocholanolon | Eks-Situ In-Situ | tingkat stres pada proses reintroduksi | (Nugraha <i>et al.</i> 2014) |
| Orangutan (<i>Pongo spp</i>) | 11 β -hydroxyetiocholanolon Epiandrosteron | Eks-Situ | stress dan androgen | Weingrill <i>et al.</i> (2011) |
| Rusa merah (<i>Cervus elaphus</i>) | 3 α -11-one Kortisol metabolit | Eks-Situ | Efek dari musim dan jenis kelamin terhadap stres | Huber <i>et al.</i> (2003) |
| Simpanse (<i>Pan troglodytes</i>) | Kortisol | In-Situ | Validasi stres | Murray <i>et al.</i> (2013) |
| Pengukuran fungsi Tiroid | | | | |
| Burung dan Mamalia | Triiodothyronine (T3) | Eks-Situ In-Situ | Kajian homon tiroid | Wasser <i>et al.</i> (2010) |

satwa liar jantan diketahui memiliki musim kawin, sehingga kajian dari hormon tersebut dapat digunakan sebagai patokan penentuan siklus perkawinan (Hamilton *et al.* 2000; Hesterman *et al.* 2005; Morato *et al.* 2004; Velloso *et al.* 1998). Kajian dari hormon reproduksi selain bermanfaat untuk mengungkapkan data dasar biologi reproduksi, juga dapat digunakan untuk mendeteksi adanya gangguan reproduksi sehingga dapat meningkatkan efisiensi reproduksi pada tingkat penangkaran (Brown *et al.* 1999; Brown *et al.* 1994; Morato *et al.* 2004).

Penentuan Jenis Kelamin

Pengukuran kadar hormon reproduksi juga dapat dijadikan sebagai patokan untuk determinasi jenis kelamin jantan dan betina, dimana pada satwa-satwa tertentu tidak menunjukkan dimorfisme yang jelas antara jantan dan betina. Hal ini telah dilaporkan oleh Oates *et al.* (2002) pada nokdiak moncong pendek (*Tachyglossus aculeatus*). Pada nokdiak moncong pendek, rasio antara hormon estradiol berbanding androgen dikombinasikan dengan pengukuran konsentrasi androgen dapat membedakan antara jantan dan betina. Betina memiliki rasio estradiol berbanding androgen yang jauh lebih tinggi dibandingkan jantan, dan jantan memiliki konsentrasi androgen yang jauh lebih tinggi dibandingkan betina (Oates *et al.* 2002). Penelitian lain juga pernah dilaporkan sebelumnya untuk identifikasi jenis kelamin pada beberapa jenis burung (Tell & Lasley 1991).

Kajian Tingkat Stres

Glukokortikoid merupakan salah satu hormon yang paling banyak disekresikan pada saat terjadi cekaman/stres yang tinggi (Palme *et al.* 2005). Pengukuran kadar hormon glukokortikoid telah umum digunakan sebagai parameter dari respon satwa terhadap stress (Millspaugh & Washburn 2004; Möstl & Palme 2002; Palme *et al.* 2005; Sheriff *et al.* 2011; Wasser *et al.* 2000). Pengukuran hormon glukokortikoid dari sampel feses memberikan keuntungan terutama data yang diperoleh tidak bias karena tidak adanya gangguan/*restraint* terhadap satwa. Oleh karena itu, kajian rutin dari kadar hormon steroid (adrenal dan gonadal) dapat memberikan informasi penting yang berkaitan dengan kondisi fisiologis, kesehatan, status reproduksi dan tingkat stres dari suatu satwa (Möstl & Palme 2002; Möstl *et al.* 2005; Nugraha *et al.* 2014; Weingrill *et al.* 2011).

Studi Perilaku

Perubahan kadar hormon steroid diketahui dapat menyebabkan perubahan perilaku pada suatu individu. Pada jantan, tingkat testosteron sering dikaitkan dengan agresivitas jantan pada saat musim kawin dimana peningkatan dari kadar hormon ini mendorong peningkatan agresi pada saat menjaga teritori atau penjagaan pasangan (Cavigelli & Pereira 2000; Ostner *et al.* 2008a; Ostner *et al.* 2008b). Hormon lain yang juga sering digunakan pada studi perilaku adalah glukokortikoid. Pada hewan sosial, konsentrasi hormon ini sering dikaitkan

dengan status dominansi dan hirarki pada beberapa jenis hewan (Cavigelli 1999; Cavigelli *et al.* 2003; Ostner *et al.* 2008a).

Kajian Hormon Lainnya

Selain digunakan untuk pengukuran metabolit hormon steroid, sampel feses juga dapat digunakan untuk mengukur beberapa metabolit hormon lain seperti metabolit dari hormon golongan asam amino dan asam lemak. Pengukuran metabolit hormon protein telah dilaporkan oleh Wasser *et al.* (2010) yaitu hormon tiroid. Dehnhard *et al.* (2015) berhasil melakukan mengukur metabolit hormon golongan asam lemak yaitu prostaglandin pada beberapa kucing besar.

KESIMPULAN

Penggunaan metode non-invasif untuk pemeriksaan metabolit hormon steroid merupakan suatu metoda yang memiliki banyak keuntungan dan sangat potensial untuk diterapkan pada satwa liar. Kajian dari metabolit hormon steroid dapat diaplikasikan untuk kajian status reproduksi, penentuan jenis kelamin, studi perilaku hingga kajian dari tingkat stres suatu satwa. Metoda ini memungkinkan untuk dilakukannya studi jangka panjang (*longitudinal studi*) pada satwa tanpa mempengaruhi fisiologi satwa akibat perlakuan dan cekaman pada saat pengambilan sampel. Tergantung pada jenis metabolit hormon yang akan diteliti, perlu diperhatikan rute ekskresi dan validasi dari metode penyimpanan sampel feses karena setiap hewan memiliki rute ekskresi dan komposisi

metabolit hormon serta komposisi mikroba saluran pencernaan yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashley, N. T., Barboza, P. S., Macbeth, B. J., Janz, D. M., Cattet, M. R. L., Booth, R. K., & Wasser, S. K. (2011). Glucocorticosteroid concentrations in feces and hair of captive caribou and reindeer following adrenocorticotrophic hormone challenge. *General and Comparative Endocrinology*, 172(3), 382-391.
- Braga Goncalves, I., Heistermann, M., Santema, P., Dantzer, B., Mausbach, J., Ganswindt, A., & Manser, M. B. (2016). Validation of a fecal glucocorticoid assay to assess adrenocortical activity in meerkats using physiological and biological stimuli. *PLoS ONE*, 11(4), e0153161.
- Brown, J. L., Hildebrandt, T. B., Theison, W., & Neiffer, D. L. (1999). Endocrine and ultrasound evaluation of a non-cycling african elephant: Identification of an ovarian follicular cyst. *Zoo Biology*, 18, 223-232.
- Brown, J. L., Walker, S. L., & Moeller, T. (2004). Comparative endocrinology of cycling and non-cycling asian (*elephas maximus*) and african (*loxodonta africana*) elephants. *General and Comparative Endocrinology*, 136, 360-370.
- Brown, J. L., Wasser, S. K., Wildt, D. E., & Graham, L. H. (1994). Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biology of Reproduction*, 51, 776 - 786.
- Brown, J. L., & Wildt, D. E. (1997). Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal steroid monitoring. *International Zoo Yearbook*, 35, 173-191.
- Brown, J. L., Wildt, D. E., Graham, L. H., Byers, A. P., Collins, L., Barrett, S., & Howard, J. (1995). Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*neofelis nebulosa*) assessed

- by fecal steroid analysis. *Biology of Reproduction*, 53, 93-102.
- Burgess, E. A., Blanshard, W. H., Barnes, A. D., Gilchrist, S., Keeley, T., Chua, J., & Lanyon, J. M. (2013). Reproductive hormone monitoring of dugongs in captivity: Detecting the onset of sexual maturity in a cryptic marine mammal. *Animal Reproduction Science*, 140(3-4), 255-267.
- Cavigelli, S. A. (1999). Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *lemur catta*. *Animal Behaviour*, 57(4), 935-944.
- Cavigelli, S. A., Dubovick, T., Levash, W., Jolly, A., & Pitts, A. (2003). Female dominance status and fecal corticoids in a cooperative breeder with low reproductive skew: Ring-tailed lemurs (*lemur catta*). *Hormones and Behavior*, 43, 166-179.
- Cavigelli, S. A., & Pereira, M. E. (2000). Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (*lemur catta*). *Hormones and Behavior*, 37(3), 246-255.
- Dehnhard, M., Kumar, V., Chandrasekhar, M., Jewgenow, K., & Umopathy, G. (2015). Non-invasive pregnancy diagnosis in big cats using the pgfm (13,14-dihydro-15-keto-pgf2alpha) assay. *PLoS ONE*, 10(12), e0143958.
- Galama, W. T., Graham, L. H., & Savage, A. (2004). Comparison of fecal storage methods for steroid analysis in black rhinoceroses (*diceros bicornis*). *Zoo Biology*, 23, 291-300.
- Ganswindt, S. B., Myburgh, J. G., Cameron, E. Z., & Ganswindt, A. (2014). Non-invasive assessment of adrenocortical function in captive Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 177, 11-17.
- Goymann, W., East, M. L., Wachter, B., Höner, O. P., Möstl, E., van't Hof, T., & Hofer, H. (2001). Social, state-dependent and environmental modulation of faecal corticosteroid levels in free-ranging female spotted hyenas. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 268(1484), 2453-2459.
- Goymann, W., Möstl, E., van't Hof, T., East, M. L., & Hofer, H. (1999). Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *crocuta crocuta*. *General and Comparative Endocrinology*, 114(3), 340-348.
- Graham, L. H., & Brown, J. L. (1997). Non-invasive assessment of gonadal and adrenocortical function in felid species via faecal steroid analysis. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 62, 78-82.
- Habumuremyi, S., Robbins, M. M., Fawcett, K. A., & Deschner, T. (2014). Monitoring ovarian cycle activity via progestagens in urine and feces of female mountain gorillas: A comparison of eia and lc-ms measurements. *Am J Primatol*, 76(2), 180-191.
- Hamasaki, S., Yamauchi, K., Ohki, T., Murakami, M., Takahara, Y., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2001). Comparison of various reproductive status in sika deer (*cervus nippon*) using fecal steroid analysis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 63(2), 195-198.
- Hamilton, R. A., Stanton, P. G., O'Donnell, L., Steele, V. R., Taggart, D. A., & Temple-Smith, P. D. (2000). Determination of seasonality in southern hairy-nosed wombats (*lasiorhinus latifrons*) by analysis of fecal androgens. *Biology of Reproduction*, 63, 526-531.
- Heistermann, M. (2010). Non-invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: Methods, guidelines and applications. *Advances in Science and Research*, 5, 1-9.
- Heistermann, M., Finke, M., & Hodges, J. K. (1995). Assessment of female reproductive status in captive-housed Hanuman langurs (*Presbytis entellus*) by measurement of urinary and fecal steroid excretion patterns. *American Journal of Primatology*, 37(4), 275-284.
- Heistermann, M., & Hodges, J. K. (1995). Endocrine monitoring of the ovarian cycle and pregnancy in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*) by

- measurement of steroid conjugates in urine. *American Journal of Primatology*, 35(2), 117-127.
- Hesterman, H., Wasser, S. K., & Cockrem, J. F. (2005). Longitudinal monitoring of fecal testosterone in male malayan sun bears (*u. Malayanus*). *Zoo Biology*, 24, 1-15.
- Hirschenhauser, K., Kotschal, K., & Möstl, E. (2005). Synthesis of measuring steroid metabolites in goose feces. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 138-153.
- Huber, S., Palme, R., & Arnold, W. (2003). Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*cervus elaphus*). *General and Comparative Endocrinology*, 130(1), 48-54.
- Jurke, M. H., Czekala, N. M., & Fitch-Snyder, H. (1997). Non-invasive detection and monitoring of estrus, pregnancy and the postpartum period in pygmy loris (*nycticebus pygmaeus*) using fecal estrogen metabolites. *American Journal of Primatology*, 41, 103-115.
- Kelm, D. H., Popa-Lisseanu, A. G., Dehnhard, M., & Ibanez, C. (2016). Non-invasive monitoring of stress hormones in the bat *eptesicus isabellinus* - do fecal glucocorticoid metabolite concentrations correlate with survival? *General and Comparative Endocrinology*, 226, 27-35.
- Khan, M. Z., Altmann, J., Isani, S. S., & Yu, J. (2002). A matter of time: Evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *General and Comparative Endocrinology*, 128(1), 57-64.
- Knott, C. D. (1997). Field collection and preservation of urine in orangutans and chimpanzees. *Tropical Biodiversity*, 4(1), 95-102.
- Knott, C. D. (2005). Radioimmunoassay of estrone conjugates from urine dried on filter paper. *American Journal of Primatology*, 67(1), 121-135.
- Kummrow, M. S., Gilman, C., Mackie, P., Smith, D. A., & Mastro Monaco, G. F. (2011). Noninvasive analysis of fecal reproductive hormone metabolites in female veiled chameleons (*chamaeleo calyptratus*) by enzyme immunoassay. *Zoo Biology*, 30(1), 95-115.
- Lynch, J. W., Khan, M. Z., Altmann, J., Njahira, M. N., & Rubenstein, N. (2003). Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: Short-term storage conditions and consequences for data interpretation. *General and Comparative Endocrinology*, 132(2), 264-271.
- Marty, P. R., van Noordwijk, M. A., Heistermann, M., Willems, E. P., Dunkel, L. P., Cadilek, M., . . . Weingrill, T. (2015). Endocrinological correlates of male bimaturism in wild bornean orangutans. *American Journal of Primatology*, 77(11), 1170-1178.
- Millspaugh, J. J., & Washburn, B. E. (2003). Within-sample variation of fecal glucocorticoid measurements. *General and Comparative Endocrinology*, 132(1), 21-26.
- Millspaugh, J. J., & Washburn, B. E. (2004). Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: Considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology*, 138(3), 189-199.
- Mithileshwari, C., Srivastava, T., Kumar, V., Kumar, A., & Umapathy, G. (2016). Non-invasive assessment of fecal progestagens and pregnancy detection in himalayan musk deer (*moschus chrysogaster*). *Theriogenology*, 85(2), 216-223.
- Morato, R. G., Bueno, M. G., Malmheister, P., Verreschi, I. T. N., & Barnabe, R. C. (2004). Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*panthera onca*) in response to stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 1903 - 1907.
- Möstl, E., & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2), 67-74.
- Möstl, E., Rettenbacher, S., & Palme, R. (2005). Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 17-34.

- Murray, C. M., Heintz, M. R., Lonsdorf, E. V., Parr, L. A., & Santymire, R. M. (2013). Validation of a field technique and characterization of fecal glucocorticoid metabolite analysis in wild chimpanzees (*pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*, 75 (1), 57-64.
- Niswender, G. D., & Nett, T. M. (1977). Biological and immunological assay of gonadotropic and gonadal hormones. *Reproduction in Domestic Animals*, 119-42.
- Norris, D. O. (2007). *Vertebrate endocrinology*: Academic Press.
- Nugraha, T. P., Agil, M., Purwantara, B., Supriatna, I., Singleton, I., Heistermann, M., . . . Weingrill, T. (2014, 11-16 August). *Preliminary results on non-invasive stress monitoring in sumatran orangutans during rehabilitation and reintroduction*. Paper presented at the XXVth Congress of the International Primatological Society, Hanoi, Vietnam.
- Oates, J., Bradshaw, F., Bradshaw, S., & Lonsdale, R. (2002). Sex identification and evidence of gonadal activity in the short-beaked echidna (*tachyglossus aculeatus*) (monotremata: Tachyglossidae): Non-invasive analysis of faecal sex steroids. *Australian Journal of Zoology*, 50(4), 395-406.
- Ostner, J., & Heistermann, M. (2003). Endocrine characterization of female reproductive status in wild redfronted lemurs (*eulemur fulvus rufus*). *General and Comparative Endocrinology*, 131(3), 274-283.
- Ostner, J., Heistermann, M., & Kappeler, P. M. (2003). Intersexual dominance, masculinized genitals and prenatal steroids: Comparative data from lemurid primates. *Naturwissenschaften*, 90(3), 141-144.
- Ostner, J., Heistermann, M., & Schülke, O. (2008a). Dominance, aggression and physiological stress in wild male assamese macaques (*macaca assamensis*). *Hormones and Behavior*, 54, 613-619.
- Ostner, J., Kappeler, P. M., & Heistermann, M. (2008b). Androgen and glucocorticoid levels reflect seasonally occurring social challenges in male redfronted lemurs (*eulemur fulvus rufus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 627-638.
- Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 75-80.
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H., & Ismail, M. N. (1996). Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*, 43, 43-63.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S. M., & Möstl, E. (2005). Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040(Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology), 162-171.
- Pribbenow, S., Wachter, B., Ludwig, C., Weigold, A., & Dehnhard, M. (2016). Validation of an enzyme-immunoassay for the non-invasive monitoring of faecal testosterone metabolites in male cheetahs (*acinonyx jubatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 228, 40-47.
- Schoenecker, K. A., Lyda, R. O., & Kirkpatrick, J. (2004). Comparison of three fecal steroid metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Journal of wildlife diseases*, 40(2), 273-281.
- Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R., & Bamberg, E. (1996). Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science*, 42, 515-526.
- Schwarzenberger, F., Palme, R., Bamberg, E., & Möstl, E. (1997). A review of faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring

- of reproductive function in mammals. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 62, 214-221.
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166(4), 869-887.
- Shideler, S. E., Ortuno, A. M., Mor n, F. M., Moorman, E. A., & Lasley, B. L. (1993). Simple extraction and enzyme immunoassays for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *macaca fascicularis* during non-conceptive and conceptive ovarian cycles. *Biology of Reproduction*, 48, 1290-1298.
- Shimizu, K. (2005). Studies on reproductive endocrinology in non-human primates: Application of non-invasive methods. *Journal of Reproduction and Development*, 51, 1-13.
- Shutt, K., Setchell, J. M., & Heistermann, M. (2012). Non-invasive monitoring of physiological stress in the western lowland gorilla (*gorilla gorilla gorilla*): Validation of a fecal glucocorticoid assay and methods for practical application in the field. *General and Comparative Endocrinology*, 179(2), 167-177.
- Tell, L. A., & Lasley, B. L. (1991). An automated assay for fecal estrogen conjugates in the determination of sex in avian species. *Zoo Biology*, 10, 361-367.
- Terio, K. A., Brown, J. L., Moreland, R., & Munson, L. (2002). Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. *Zoo Biology*, 21, 215-222.
- Touma, C., & Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, 54-74.
- Troll, S., Gottschalk, J., Seeburger, J., Ziemssen, E., Hafner, M., Thielebein, J., & Einspanier, A. (2013). Characterization of the ovarian cycle in the two-toed sloths (*choloepus didactylus*): An innovative, reliable, and noninvasive method using fecal hormone analyses. *Theriogenology*, 80(3), 275-283.
- Velloso, A. L., Wasser, S. K., Monfort, S. L., & Dietz, J. M. (1998). Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolves (*chrysocyon brachyurus*). *General and Comparative Endocrinology*, 112(1), 96-107.
- Wasser, S. K., Azkarate, J. C., Booth, R. K., Hayward, L., Hunt, K., Ayres, K., ... & Rodríguez-Luna, E. (2010). Non-invasive measurement of thyroid hormone in feces of a diverse array of avian and mammalian species. *General and comparative endocrinology*, 168(1), 1-7.
- Wasser, S. K., Hunt, K. E., Brown, J. L., Cooper, K., Crockett, C. M., Bechert, U., ... & Monfort, S. L. (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and comparative endocrinology*, 120(3), 260-275.
- Wasser, S. K., Monfort, S. L., Southers, J., & Wildt, D. E. (1994). Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 213 - 220.
- Wasser, S. K., Risler, L., & Steiner, R. A. (1988). Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, 39, 862-872.
- Weingrill, T., Gray, D. A., Barrett, L., & Henzi, S. P. (2004). Fecal cortisol levels in free-ranging female chacma baboons: Relationship to dominance, reproductive state and environmental factors. *Hormones and Behavior*, 45 (4), 259-269.
- Weingrill, T., Willems, E. P., Zimmermann, N., Steinmetz, H., & Heistermann, M. (2011). Species-specific patterns in fecal glucocorticoid and androgen levels in zoo-living orangutans (*pongo* spp.). *General and Comparative Endocrinology*, 172(3), 446-457.
- Ziegler, T., Hodges, J. K., Winkler, P., & Heistermann, M. (2000a). Hormonal correlates of reproductive seasonality

- in wild female hanuman langurs (*presbytis entellus*). *American Journal of Primatology*, 51(2), 119-134.
- Ziegler, T. E., Carlson, A. A., Ginther, A. J., & Snowdon, C. T. (2000b). Gonadal source of testosterone metabolites in urine of male cotton-top tamarin monkeys (*saguinus oedipus*). *General and Comparative Endocrinology*, 118(2), 332-343.
- Ziegler, T. E., & Wittwer, D. J. (2005). Fecal steroid research in the field and laboratory: Improved methods for storage, transport, processing, and analysis. *American Journal of Primatology*, 67(1), 159-174.