

Penelitian

## Validasi Analitik Kit ELISA Komersial untuk Mengukur Metabolit Estrogen dan Progesteron pada Feses *Tarsius (Tarsius spectrum)*

(Analytical Validation of Commercial ELISA kit for Measuring Fecal Estrogen and Progesterone Metabolites of *Tarsius (Tarsius spectrum)*)

Nanik Hidayatik<sup>1</sup>, Tuty Lasuardi Yusuf<sup>1,3</sup>, Muhammad Agil<sup>3</sup>, Entang Iskandar<sup>1,2</sup>, Dondin Sajuthi<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Primatologi, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Pusat Studi Satwa Primata-Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

\*Penulis untuk korespondensi: nanikhidayatik@gmail.com

Diterima 11 Agustus 2017, Disetujui 14 November 2017

### ABSTRAK

Penentuan status reproduksi pada satwa liar atau satwa yang ditangkarkan merupakan faktor yang sangat penting dalam manajemen pengembangbiakan satwa. Evaluasi metabolit hormon estrogen dan progesteron secara *non-invasive* dari sampel feses untuk memonitor fungsi reproduksi telah dilakukan sejak lama pada beberapa spesies mamalia. Validasi asai pada *Tarsius* belum pernah dilaporkan sehingga validasi asai merupakan hal yang sangat penting sebelum digunakan dalam studi karena metabolit steroid bersifat spesifik spesies. Tujuan penelitian ini adalah melakukan validasi analitik kit *enzyme linked immunoassay* (ELISA) komersial untuk menganalisis metabolit hormon estrogen dan progesteron pada feses *T. spectrum*. Uji paralelisme dilakukan pada asai DRG<sup>®</sup> estradiol (E<sub>2</sub>), estron (E<sub>1</sub>), dan progesteron (P<sub>4</sub>) dengan pengenceran bertingkat (1:2–1:128) ekstrak feses dari beberapa status reproduksi yang berbeda pada *Tarsius* yang dibandingkan dengan kurva standar dari masing-masing asai. Hasil uji paralelisme terhadap kit DRG<sup>®</sup> estron menunjukkan hasil yang tidak paralel. Dari uji paralelisme DRG<sup>®</sup> estradiol dan progesteron, didapatkan hasil kurva sampel dengan standar yang tidak konsisten. Hanya ditemukan satu dari lima kurva sampel yang diuji yang paralel dengan kurva standar asai DRG<sup>®</sup> estrogen dan progesteron. Berdasarkan hasil tes paralelisme tersebut, kit komersial ELISA DRG<sup>®</sup> estron, estradiol, dan progesteron tidak dapat digunakan untuk mengukur metabolit estrogen dan progesteron pada feses *T. spectrum*.

**Kata kunci:** estrogen, metabolit hormon, progesteron, *Tarsius spectrum*, validasi asai

### ABSTRACT

Assessment of reproductive status of wildlife or captivated animal is an important factor in breeding management. Measurements of fecal estrogen and progesterone metabolites for monitoring reproduction function had been done in several species of mammals. However measurements of fecal estrogen and progesterone metabolites have never been reported in *Tarsier*. Therefore, it is very important to validate the assay that will be used prior to the application in the study due to species specific of the metabolite steroid. The aim of this study was to validate enzyme linked immunoassay (ELISA) commercial kit for measuring fecal estrogen and progesterone metabolites in *Tarsius spectrum*. Parallelism tests were conducted using DRG<sup>®</sup> assay (estradiol (E<sub>2</sub>), estrone (E<sub>1</sub>), and progesterone (P<sub>4</sub>) with serial dilution (1:2–1:128) of fecal samples from different reproductive status of *Tarsius spectrum* compare to the standard curve of each assay. The parallelism test of DRG<sup>®</sup>-estrone did not show a parralel pattern with standard curve. Meanwhile, only one out of five sample curves tested was parallel with the standard curve of DRG<sup>®</sup>-estradiol and progesterone assays. Based on this parallelism test, DRG<sup>®</sup> ELISA commercial kit of estrone, estradiol, and progesterone could not be used for measuring estrogen and progesterone metabolite in the feces of *T. spectrum*.

**Keywords:** estrogen, hormone metabolite, progesterone, *Tarsius spectrum*, assay validation

## PENDAHULUAN

Famili *Tarsiidae* terdiri atas tiga genus yang tersebar di beberapa wilayah, yaitu genus *Tarsius* di Sulawesi, *Carlito* di Filipina, dan *Cephalopachus* di Sumatera dan Kalimantan (Groves & Shekelle, 2010; Roos *et al.*, 2014). Status konservasi *Tarsiidae* adalah *vulnerable* sampai *critically endangered* (IUCN). Pemerintah telah berusaha mengeluarkan undang-undang maupun peraturan menteri untuk menghalangi perdagangan semua spesies dalam famili *Tarsiidae*. Pemerintah juga telah melakukan program penangkaran secara *in-situ* maupun *ex-situ* untuk meningkatkan populasinya. Usaha penangkaran *ex-situ* sampai saat ini belum berhasil dengan baik. Kemungkinan, hal ini dikarenakan belum diketahui secara mendalam tentang biologi reproduksinya.

Penentuan status reproduksi pada satwa liar atau satwa yang ditangkarkan merupakan faktor yang sangat penting dalam manajemen pengembangbiakan satwa. Proses mempelajari hubungan reproduksi-endokrin sangat diperlukan melalui pengambilan sampel yang berkelanjutan untuk mendapatkan gambaran hormonal fisiologi reproduksi yang lengkap. Pengukuran endokrin pada satwa primata dapat dilakukan dengan menggunakan metode non-invasif (Hodges & Heistermann, 2011). Metode ini telah banyak digunakan untuk mempelajari endokrinologi yang berhubungan dengan psikologi satwa dan fisiologi di semua bidang primatologi, yang meliputi ekologi tingkah laku, biologi reproduksi, penelitian stres, dan konservasi. Prosedur endokrin *non-invasive* dilakukan berdasarkan prinsip bahwa hormon dapat diukur dalam materi biologi selain darah, misalnya urine, feses, air liur, dan rambut (Schwarzenberger, 2007; Heistermann, 2010; Hodges *et al.*, 2010).

Evaluasi metabolit hormon estrogen dan progesteron secara *non-invasive* menggunakan sampel feses untuk memonitor fungsi reproduksi telah dilakukan sejak lama pada beberapa spesies mamalia (Schwarzenberger *et al.*, 1996). Setiap asai dan teknik penanganan sampel feses harus divalidasi dengan baik menggunakan validasi analitik dan biologi (Brown, 2010). Analisis metabolit steroid dari sampel feses tarsius belum pernah dilakukan. Dengan demikian, untuk mendapatkan hasil yang tepat dan akurat perlu dilakukan validasi terlebih dahulu (Adkins-Regan, 2005; Heistermann, 2010). Validasi yang diperlukan untuk mengukur hormon adalah validasi analitik untuk menguji apakah asai yang digunakan dapat mengukur metabolit hormon yang terkandung di dalam ekstraksi feses *Tarsius* secara tepat dan akurat. Validasi biologi untuk menentukan apakah asai yang digunakan menggam-

barkan perubahan kondisi biologi yang terlihat pada satwa yang diamati (Palme, 2005). Asai komersial yang tersedia didesain untuk mengukur hormon di dalam darah, telah dapat berhasil digunakan untuk mengukur hormon dalam air ludah dan rambut, namun sangat terbatas untuk mengukur metabolit hormon dalam urine dan feses (Heistermann *et al.*, 2006; Heistermann, 2010). Hormon estrogen dan progesteron diekskresi dalam bentuk metabolit yang berbeda, hanya sedikit dalam bentuk murni progesteron ataupun estrogen (Wasser *et al.*, 1994). Kit untuk *chorionic gonadotropin* (hCG) dan *luteinizing hormone* (hLH) bekerja baik pada urine atau serum pada kebanyakan kera besar, namun secara umum tidak bekerja baik pada spesies lain. Dengan demikian kit komersial sebaiknya tidak digunakan apabila tidak dilakukan validasi terlebih dahulu atau hasil validasinya tidak baik (Hodges *et al.*, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi analitik melalui uji paralelisme terhadap metabolit hormon feses *T. spectrum* betina menggunakan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) estrogen, estron, dan progesteron komersial sebagai salah satu alat untuk menentukan status reproduksinya. Diharapkan dari penelitian ini didapatkan asai hormon yang tepat untuk mengukur metabolit estrogen dan progesteron dalam feses *T. spectrum*.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hormon, Unit Rehabilitasi Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor pada bulan Juni 2016.

### Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah methanol 80%, kit *ELISA hormone assay* komersial ®DRG (estradiol, estron, dan progesteron) untuk manusia. Alat yang digunakan untuk analisis hormon steroid antara lain adalah tabung gelas volume 5 dan 10 mL, tabung sentrifuse 15 mL, *micropipette tips* ukuran 20, 100, dan 1000 µL, mikropipet 10-100 µL, mikropipet 100-1000 µL, *micro-channel pipette*, *microplate washing machine*, dan *microplate reader*.

### Prosedur Penelitian

#### Persiapan Sampel

Sebelum dianalisis, sampel feses dikeringkan, dihaluskan, dan diekstraksi sesuai dengan prosedur yang dinyatakan oleh Heistermann *et al.* (1993).

Sebanyak 0.05 g serbuk feces diekstraksi dengan 2 mL methanol 80% dalam H<sub>2</sub>O dengan cara mengocok dengan menggunakan vorteks selama 10 menit, kemudian disentrifugasi pada 2200 x g selama 10 menit lalu supernatannya dikumpulkan. Hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu -20 °C sampai saat dianalisis dengan metode ELISA.

#### Validasi Asai

Validasi analitik dilakukan melalui uji paralelisme terhadap asai hormon komersial DRG<sup>®</sup> Instrument GmbH, German (estradiol (E<sub>2</sub>), estron (E<sub>1</sub>), dan progesteron (P<sub>4</sub>)). Uji paralelisme dilakukan dengan membandingkan kurva dari pengenceran bertingkat (1:2–1:128) ekstrak feces dari beberapa status reproduksi yang diketahui (pro-estrus (n=2), estrus (kopulasi), serta awal dan pertengahan kebuntingan) dengan kurva standar asai DRG<sup>®</sup> (E<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, dan P<sub>4</sub>). Uji akurasi (*standard recovery*) dilakukan dengan mengukur adanya *potential matrix interference*. Uji akurasi tersebut dilakukan dengan menghitung nilai konsentrasi yang terbaca (hasil analisis) dibandingkan dengan nilai konsentrasi standar yang tersedia di dalam produk kit ELISA (E<sub>2</sub>: 6,25-1000 pg/mL; E<sub>1</sub>: 13-1000 pg/mL; P<sub>4</sub>: 0,3-40 pg/mL).

Spesifisitas antibodi (*cross reactivity*) masing-masing asai telah tertera di dalam *leaflet* asli kit. Asai P<sub>4</sub> memiliki *cross reactivity* terhadap steroid lainnya < 1%, kecuali 11-Desoxycorticosterone (1,10%). Asai E<sub>2</sub> memiliki *cross reactivity* sebesar 2,27% terhadap estradiol dan 6,86% terhadap estron, sedangkan terhadap steroid lainnya berada dalam kisaran 0-0,003 %. Nilai *cross reactivity* yang dimiliki asai E<sub>1</sub> adalah 0% terhadap progesteron dan testosterone; 2,5% terhadap estradiol, dan 2,1% terhadap estradiol bebas.

#### Analisis Data

Data hasil validasi yang didapatkan disajikan dalam bentuk nilai rerata ± standar deviasi (SD), gambar grafik dan deskripsi.

## HASIL

Uji paralelisme dilakukan dengan membandingkan kurva yang dibentuk dari hasil analisis lima sampel dari status reproduksi yang berbeda (pro-estrus (n=2), estrus; awal, dan pertengahan kebuntingan) dengan kurva standar masing-masing asai. Hasil paralelisme menggunakan asai E<sub>1</sub> menunjukkan semua kurva sampel tidak paralel dengan kurva standar. Lima kurva sampel yang diuji pada asai E<sub>2</sub>, hanya satu kurva sampel yang paralel dengan pola kurva

standarnya. Hasil yang sama ditunjukkan asai P<sub>4</sub> (Gambar 1).

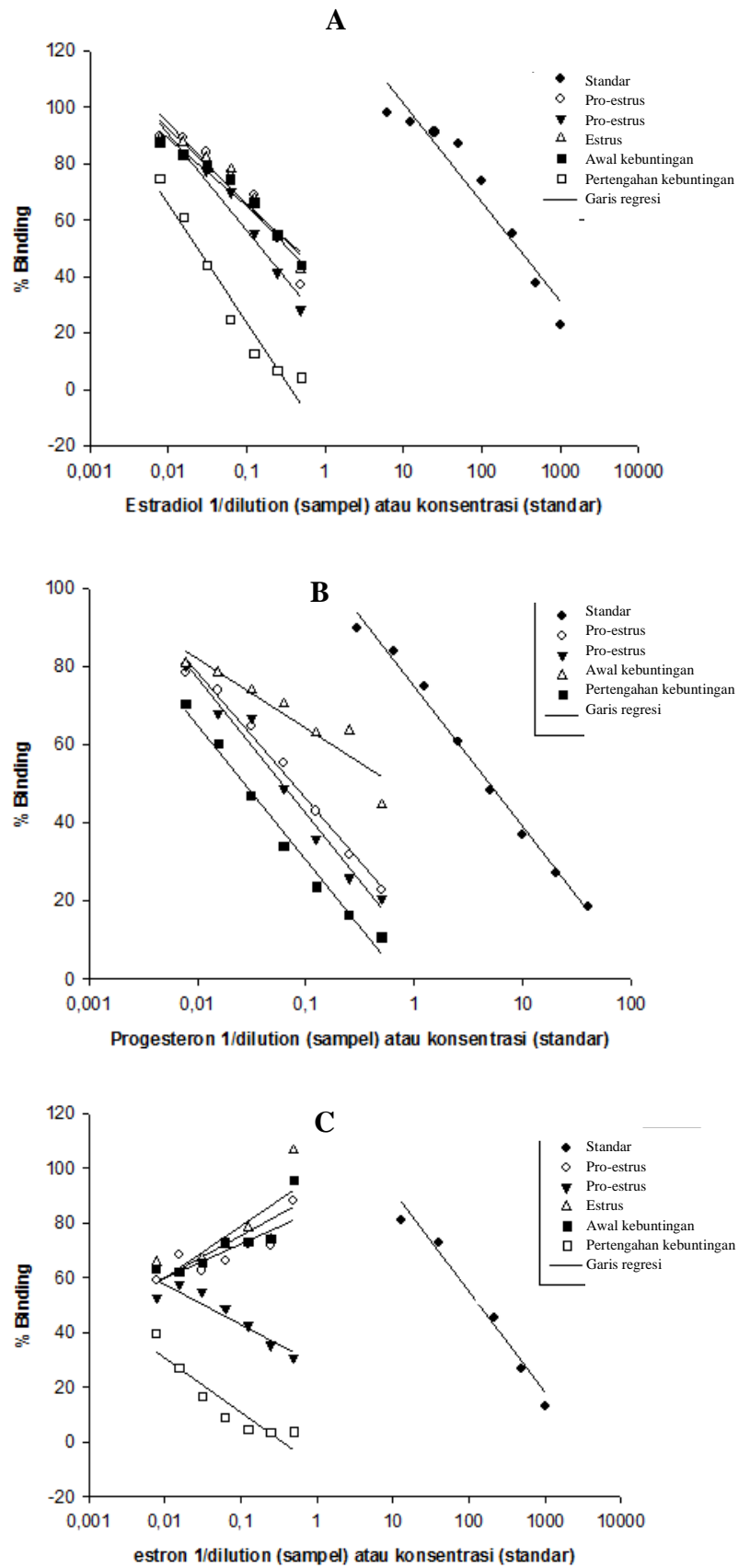
Nilai konsentrasi standar pada 50% *binding* masing-masing asai E<sub>2</sub> dan P<sub>4</sub> secara berturut-turut adalah 330 pg/mL dan 3,8 ng/mL. Kisaran limit konsentrasi yang akurat yang dapat digunakan dalam pembacaan hasil yang terendah (30% *binding*) adalah 130 pg/mL pada estradiol (E<sub>2</sub>) dan 1,8 ng/mL pada progesteron (P<sub>4</sub>) sampai yang tertinggi (70% *binding*) adalah 700 pg/mL pada estradiol (E<sub>2</sub>) dan 17 ng/mL pada progesteron (P<sub>4</sub>).

Garis linear kurva hormon standar asai E<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, dan asai P<sub>4</sub> ditentukan dengan berpusat pada titik 50% *binding* kemudian ditarik garis lurus dari pusat titik tersebut ke titik 30% *binding* dan 70% *binding*-nya. Hasil garis linear yang terbentuk antara standar hormon dengan sampel menunjukkan kurva yang tidak paralel.

## PEMBAHASAN

Sifat *enzyme-immunoassay* secara umum sangat sensitif dan spesifik sehingga penggunaannya untuk analisis sampel dari spesies yang belum pernah dilaporkan dalam penggunaan asai tertentu harus dilakukan secara hati-hati dan memenuhi standar validasi yang baik. Penggunaan kit komersial untuk *screening* konsentrasi hormon sex steroid memerlukan prosedur validasi (Simontacchi et al., 1999). Kriteria utama validasi ada empat, yaitu *sensitivity* (jumlah minimum hormon yang dapat dideteksi), *precision* (ulangan dalam- dan antar-asai), *accuracy* (kemampuan untuk mendeteksi jumlah hormon yang benar di dalam sampel), dan *specificity* (spesifik terhadap metabolit hormon tertentu) (Hodges et al., 2010). Tahap awal validasi untuk memilih apakah asai dapat digunakan lebih lanjut untuk analisis sampel dapat diketahui dengan melakukan validasi analitik, misalnya uji paralelisme dan uji akurasi (Brown et al., 2005).

Uji paralelisme adalah cara untuk menentukan bahwa hormon asai tersebut mengukur dengan akurat hormon target atau hormon yang diketahui, dan juga dapat menentukan pengenceran sampel yang tepat sesuai dengan status reproduksinya. Asai komersial DRG<sup>®</sup> estradiol, estron, dan progesteron menunjukkan pola kurva pengenceran sampel yang tidak paralel dari sampel feces tarsius yang dianalisis. Kurva sampel yang tidak paralel dengan kurva standar menunjukkan bahwa sampel tidak dapat dianalisis menggunakan hormon asai tersebut karena asai tidak dapat menunjukkan



Gambar 1 Kurva uji paralelisme kit komersial (A) Estradiol-DRG EIA 2693; (B) Progesteron-DRG EIA 1561; (C) Estron-DRG EIA 4174

immunoaktivitas antigen endogenus yang sama dengan asai standar (Brown et al., 2005). Berdasarkan hasil validasi tersebut, secara analitik asai DRG<sup>®</sup> E<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, dan P<sub>4</sub> tidak dapat digunakan untuk mengukur kadar metabolit hormon estrogen dan progesteron dalam sampel feses *T. spectrum*. Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan satu hormon asai yang sama tidak dapat secara otomatis dapat digunakan pada spesies lainnya. Beberapa studi melaporkan penggunaan hormon asai DRG untuk menganalisis hormon pada beberapa spesies hewan walaupun hormon asai tersebut dibuat untuk analisis hormon pada manusia. Asai tersebut telah digunakan dalam beberapa studi untuk menganalisis hormon dari sampel plasma darah hewan domestik (hewan ternak), hewan laboratorium, dan sampel feses satwa di kebun binatang, yaitu plasma darah dari *Capra hircus* (Setiadi, 2014), plasma darah dari tikus putih galur *Sprague Dawley* (Qamariah et al., 2015), dan feses dari *Acinonyx jubatus* (Borque et al., 2005).

Kurva pengenceran sampel tarsius pada ketiga asai DRG<sup>®</sup> yang diuji tidak paralel dengan kurva standarnya. Hal ini berhubungan dengan asai *specificity* (Hodges et al., 2010), yaitu antibodi yang terdapat pada kit DRG E<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, dan P<sub>4</sub> tidak spesifik terhadap metabolit hormon yang ada di dalam sampel feses *T. spectrum* (Brown et al., 2005). Antibodi tersebut tidak dapat mendeteksi hapten hormon steroid sehingga antibodi tidak dapat berikatan dengan hormon dalam sampel (Setiadi, 2014). Ukuran steroid sangat kecil sebagai *immunogen* sehingga perlu berikatan dengan sebuah protein yang dapat menimbulkan respons imun yang dikenali oleh antibodi sebagai hapten spesifik. Posisi hapten yang dikenali suatu antibodi spesifik tidak dapat dikenali antibodi lain yang dikembangkan berdasarkan posisi hapten yang berbeda (Kersey & Denhard, 2014).

Antibodi yang ideal untuk mengukur metabolit steroid sebaiknya adalah antibodi kelompok-spesifik (*group-specific*) yang dapat mengenali satu area dari struktur steroid yang sama (Möstl et al., 2005). Beberapa hormon asai terbaru telah dikembangkan untuk dapat digunakan pada multispesies dengan menggunakan antibodi kelompok-spesifik tersebut, seperti asai hormon dengan antibodi kelompok-spesifik 20-oxopregnane yang dapat digunakan untuk menganalisis sampel feses dari beberapa spesies, seperti *Loxodonta africana* (Ahlers et al., 2012), *Elaphas maximus* (Schwarzenberger et al., 1997), dan *Equus quagga chapmani* (Ncube et al., 2011).

Hasil analisis *enzyme immuno assay* menggambarkan adanya reaksi imunoreaktif antara antibodi dengan antigen (hormon/metabolit hormon) yang dikenali haptennya oleh antibodi tersebut. Penjelasan tersebut di atas menunjukkan bahwa hasil uji paralelisme dapat mendeteksi hormon/metabolit yang berbeda, namun memiliki hapten yang sama, yang dikenali antibodi asai tersebut. Dengan kata lain, uji paralelisme tidak dapat digunakan untuk menentukan jenis hormon/metabolit hormon tertentu.

Kurva sampel yang paralel dengan kurva standar dapat digunakan untuk menentukan pengenceran sampel yang tepat untuk mendapatkan hasil konsentrasi yang terbaca yang berada pada rentang titik-titik garis linear kurva standar. Hal ini mendukung asumsi bahwa konsentrasi hasil analisis hormon sampel berada pada rentang pembacaan hormon asai yang dapat dipercaya (akurat). Tanpa adanya uji paralelisme, estimasi yang tepat untuk menentukan tingkat pengenceran sampel pada beberapa status reproduksi yang berbeda tidak dapat dihitung (Plikaytis et al., 1994).

Apabila hormon asai yang digunakan menunjukkan paralelisme yang positif untuk sampel yang diuji, pengenceran sampel yang paling baik untuk dianalisis menggunakan suatu asai EIA adalah pada konsentrasi 50% *binding*-nya. Rentang konsentrasi yang dapat diukur dengan baik oleh suatu asai adalah konsentrasi yang masih berada pada rentang garis linear dari titik 50% *binding* tersebut sampai titik persentase *binding* lebih tinggi atau lebih besar dari 50% *binding*-nya. Jika konsentrasi sampel yang terukur berada di luar nilai rentang tersebut maka perlu dilakukan pengukuran ulang dengan pengenceran yang lebih rendah atau lebih tinggi bergantung pada nilai konsentrasinya (Heistermann, Komunikasi Personal).

Hasil validasi analitik (tes paralelisme) tersebut dapat disimpulkan bahwa kit ELISA DRG<sup>®</sup> untuk hormon estradiol, estron dan progesteron tidak dapat mendeteksi keberadaan metabolit hormon estrogen dan progesteron di dalam sampel feses *T. spectrum*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana, drh. Dedy R. Setiadi, MSi yang telah membantu melakukan analisis laboratorium, dan Dr. Gholib yang telah membantu proses menganalisis data.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adkins-Regan E. 2005. *Hormones and animal social behavior*. Princeton University Press. New Jersey. p1-34.
- Ahlers MJ, Ganswindt A, Münscher S, Bertschinger HJ. 2012. Fecal 20-oxo-pregnane concentrations in free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*) treated with porcine zona pellucida vaccine. *Theriogenology* 78: 77-85.
- Borque C, Perez-Garnello SS, Lopez M, Tavalera C, Delclaux M, de la Fuente J. 2005. Validating a commercially available enzyme immunoassay for the determination of 17 $\beta$ -estradiol and progestogens in the feces of cheetahs (*acinonyx jubatus*): a case report. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36(1):54-61. doi: <http://dx.doi.org/10.1638/03-068>
- Brown J, Walker S, Steinman K. 2005. *Endocrine Manual for Reproductive Assessment of Domestic and Non-Domestic Species*. Smithsonian National Zoological Park. Virginia. p1-69.
- Brown JL. 2010. Female reproduction cycles of wild female felids. *Animal Reproduction Science*. 124: 155–162
- Groves C, Shekelle M. 2010. The Genus and Species of Tarsiidae. *International Journal of Primatology* 31:1071-1082.
- Heistermann M, Tari S, Hodges JK. 1993. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae. *Journal of Reproduction and Fertility* 99:243-251.
- Heistermann M, Palme R, Ganswindt A. 2006. Comparison of different enzymeimmunoassays for assessment of adrenocortical activity in primates based on fecal analysis. *American Journal of Primatology* 68:257-273.
- Heistermann M. 2010. Non-invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: methods, guidelines and applications. *Advances Science and Research* 5:1-9.
- Hodges JK, Brown J, Heistermann M. 2010. Endocrine Monitoring of Reproduction and Stress. In: *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for Zoo Management*. Kleiman, D.G., Thompson, K.V., Kirk Baer, C. (eds). The University of Chicago Press. Chicago. p447-468.
- Hodges JK, Heistermann M. 2011. Field endocrinology: monitoring hormonal changes in free-ranging primates. In: *Field and Laboratory Methods in Primatology. A practical guide*.
- [IUCN] International Union for Conservation Nature and Natural Resources. 2008. *IUCN Red List of Threatened Species*. <http://www.iucnredlist.org>. Download: 13 Mei, 2017.
- Kersey DC, Denhard M. 2014. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *General and Comparative Endocrinology* 203:296-306.
- Möstl E, Rettenbacher S, Palme R. 2005. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Ann. New York Academy of Sciences* 1046:17–34.
- Ncube H, Duncan P, Grange S, Cameron EZ, Barnier F, Ganswindt A. 2011. Pattern of faecal 20-oxopregnane and oestrogen concentrations during pregnancy in wild zebra mares. *General and Comparative Endocrinology* 172: 358-362.
- Palme R. 2005. *Measuring fecal steroid: Guidelines for practical application*. New York Academy of Sciences. 1046:75-80.
- Plikaytis BD, Holdr PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL, Carlone GM. 1994. Determination of parallelism and nonparallelism in bioassay dilution curve. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (10):2441-2447.
- Qamariah N, Bahtiar A, Arsianti A. 2015. Pengaruh fraksi air kulit delima (*Punica granatum* Linn) terhadap kadar estradiol serum tikus ovariektomi. *Jurnal Surya Medika* 1(1):30-39.
- Roos C, Boonratana R, Supriatna J, Fellowes JR, Groves CP, Nash SD, Rylands AB, Mittermeier RA. 2014. An updated taxonomy and conservation status review of Asian primates. *Asian Primates Journal* 4(1):2-36.
- Schwarzenberger F, Möstl E, Palme R, Bamberg E. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitor& of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 42:515–526.
- Schwarzenberger F, Strauss G, Hoppen HO, Schafenaar W, Dieleman SJ, Zenker W, Pagan O. 1997. Evaluation of progesterone and 20-oxo-progestagens in plasma of Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants. *Zoo Biology* 16 (5): 403-413.
- Schwarzenberger F. 2007. Non-invasive endocrine monitoring using fecal steroid analysis: opportunities and challenges. *Reviste Brasileira de Zootecnia* 36:87-88.

- Setiadi DR. 2014. Validasi kit EIA Komersial untuk Analisa Hormon Estradiol dan Progesteron pada Kambing Kacang (*Capra hircus*) Betina. Tesis S2. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor. p14-17.
- Simontacchi C, Marinelli L, Gabai G, Bono G, Angelitti R. 1999. Accuracy in naturally occurring anabolic steroid assays in cattle and first approach to quality control in Italy. *Analyst* 124:307-312. doi: 10.1039/A89373C.
- Wasser SK, Monfort SL, Southers J, Wildt DE. 1994. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. *Journal of reproduction and Fertility* 101:213-220.