

**PARALELISM HORMON STEROID HASIL KOLEKSI SECARA  
NON-INVASIVE PADA KUKANG  
(*Nycticebus coucang*)**

**[Parallelism of Steroid Hormone Through Non-Invasive  
Collection Method in Slow Loris (*Nycticebus coucang*)]**

**Wirdateti<sup>\*)</sup>, R. Taufiq P. Nugraha, G. Semiadi, dan Yulianto**

<sup>\*)</sup>Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI  
Jl. Raya Jakarta-Bogor KM 46, Cibinong 16911  
email: teti\_mzb@yahoo.com

**ABSTRAK**

Kajian profil hormon reproduksi memegang peranan kunci dalam upaya pemahaman fisiologi reproduksi suatu jenis satwaliar. Saat ini berbagai metoda praktis yang sesuai dengan sifat satwaliar terus dikembangkan diantaranya melalui pengembangan metoda *non invasive*. Salah satu metoda *non invasive* yang sedang berkembang adalah monitoring profil hormon hasil sekreta tubuh, seperti feses dan urin. Pada metoda ini sampel feses ataupun urin dipakai sebagai media yang mudah dikoleksi tanpa harus mengganggu satwaliar secara langsung. Tulisan ini memberikan gambaran awal dari beberapa kajian pengembangan metoda *non invasive* untuk monitoring hormon reproduksi pada satwaliar.

**Kata kunci:** satwaliar, metoda *non-invasive*, hormon reproduksi.

**ABSTRACT**

*Assessments on the reproductive hormones play a key role in understanding the reproductive physiology of any wildlife species. Several practical methods are being developed to suite the nature of the wildlife species, one of the methods is known as the "non invasive" method. In this method, hormonal profile can be assed through the collection of feces or urine without having to disturb the animal. This paper is discussing some methods being developed for non invasive hormonal assessments in wildlife species.*

**Key word:** *wildlife, non-invasive method, reproductive hormones.*

## PENDAHULUAN

Sejak beberapa tahun lalu, dipelihara untuk keperluan penelitian biologi dan biomedis dalam mempertahankan atau untuk perbanyak species terancam punah. Pada kondisi demikian kemampuan untuk memantau fisiologis, khususnya status hormonal (endokrin) berperan penting dalam perkembangbiakan dan kesejahteraan banyak spesies (Lasley and Savage, 2007). Selain itu pemantauan status endokrin memungkinkan mengevaluasi aspek kondisi hewan, dan juga manajemen penting dalam mempertahankan primata di penangkaran. Selanjutnya, monitoring endokrin dapat berguna untuk mengevaluasi dampak potensial status fisiologis individu (misalnya stres, siklus estrus) (Heistermann, 2010).

Hormon steroid merupakan turunan dari kolesterol dan memegang peranan yang penting dalam fisiologi tubuh satwa (Steimer 2004). Fungsi penting dari hormon steroid adalah untuk mengkoordinasi respons fisiologi dan perilaku dari suatu individu untuk kepentingan biologis seperti reproduksi. Dalam fungsi reproduksi, hormon steroid berperan pada diferensiasi seksual (penentuan jenis kelamin) dan otak (perilaku seksual), perkembangan karakteristik dan organ reproduksi sekunder pada saat dewasa kelamin, memelihara perkembangan organ reproduksi setelah dewasa kelamin dan mendorong perilaku reproduksi (Ganong 1977, Steimer 2004).

Estrogen, progesteron dan testosteron sebagai hormon steroid, memegang peranan kunci dalam siklus dan perilaku reproduksi pada semua satwa. Profil hormon estrogen dan progesteron dapat memberikan gambaran siklus estrus (Brown *et al.* 1998), profil estrogen dan progesteron juga telah lama digunakan untuk mendeteksi kebuntingan (konsepsi) pada satwa domestik (Čebulj-Kadunc *et al.* 2000, Karen *et al.* 2001, 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.* 2000) dan rusa (Hamasaki *et al.* 2000). Pada satwa jantan kandungan, androgen berperan dalam proses spermatogenesis. Beberapa jenis satwa liar jantan diketahui memiliki musim kawin, sehingga monitoring dari hormon tersebut dapat digunakan sebagai patokan penentuan siklus perkawinan (Hamilton *et al.* 2000, Hesterman *et al.* 2006, Morato *et al.* 2004, Velloso *et al.* 1998). Pengukuran level hormon reproduksi juga dapat dijadikan sebagai patokan untuk determinasi jenis kelamin jantan dan betina, dimana pada satwa-satwa tertentu tidak menunjukkan dimorfisme antara jantan dan betina seperti pada nokdiak moncong pendek (*Tachyglossus aculeatus*) (Oates *et al.* 2002). Selain bermanfaat untuk mengungkapkan data dasar biologi reproduksi, monitoring dari hormon reproduksi juga dapat bermanfaat untuk mengkaji ketidakberhasilan dan meningkatkan efisiensi reproduksi pada tingkat penangkaran (Brown *et al.* 1994, Morato *et al.* 2004, Wolf *et al.* 2000)

Metoda klasik yang digunakan dalam pengukuran level hormon secara invasif adalah melalui pengambilan sampel darah secara berseri. Pengukuran hormon dari darah mungkin paling informatif dan secara luas digunakan untuk memantau fungsi endokrin di banyak laboratorium hewan domestik dan juga digunakan dalam studi primata di laboratorium (Lasley and Savage, 2007). Namun cara ini hanya mudah diterapkan pada satwa domestik yang cukup jinak untuk ditangani (Brown *et al.* 1994). Sedangkan pada satwa liar yang relatif sulit ditangani dan peka terhadap cekaman stress, cara ini menjadi tidak efektif dan sulit untuk diterapkan karena memerlukan proses penangkapan, *restraint* bahkan pembiusan yang diketahui dapat mempengaruhi gambaran kadar hormon pada saat pengambilan sampel (Hamasaki *et al.* 2000, Brown *et al.* 1994, Möstl *et al.* 2005, Swarzenberger *et al.* 1996). Selain itu stress yang terjadi pada waktu penanganan juga dapat berbahaya bagi keselamatan satwa tersebut. Cekaman waktu penanganan merupakan salah satu penyebab stress tertinggi pada satwaliar yang dapat menyebabkan biasanya data yang diperoleh (Möstl *et al.* 2005). Kalaupun akan dilakukan metoda konservatif tersebut, pada satwa liar seringkali harus dilakukan lewat periode pembesaran anak satwa sejak lahir dan diseleksi terhadap sifat yang jinak. Cara demikian biasanya hanya memberikan tingkat kesuksesan diperolehnya satwa yang sesuai dengan yang diinginkan sekitar 10-30%, tergantung jenis satwa liarnya (G.W Asher, komunikasi pribadi). Alternatif pemantauan lainnya adalah melalui monitoring level metabolit hormon steroid yang dieksresikan lewat urin atau feses (Brown *et al.* 1994, Milspaugh & Washburn 2004, Wasser *et al.* 1988), atau saliva (Smith 2004). Cara koleksi tersebut dikenal sebagai metoda koleksi *non invasive*. Berdasarkan koleksi *non-invasive* kontak langsung dengan species dapat dihindari. Pendekatan *non invasive* dapat memberikan opsi yang lebih sesuai untuk studi fisiologi dalam hubungannya dengan parameter lain seperti perilaku dan reproduksi (Hodges and Heistermann, 2011).

Tujuan dasar dari pengukuran kadar metabolit hormon steroid adalah untuk mengetahui gambaran kasar perubahan dari konsentrasi hormon dalam fisiologi tubuh, seperti pada siklus ovarium, kebuntingan, siklus estrus, pada saat musim kawin, akibat cekaman stress, dan lain sebagainya (Lynch *et al.* 2003, Brown *et al.* 1994, Milspaugh & Washburn 2004, Wasser *et al.* 1988). Pengukuran metabolit steroid dari sampel kotoran memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan metoda konvensional. Metoda ini memungkinkan pengumpulan sampel dari satu individu secara terus menerus dan dapat dilakukan untuk waktu periode yang sangat panjang dengan gangguan seminimal mungkin pada aktifitas dan lingkungan sosial satwa tersebut (Hirschenhauser *et al.* 2005). Sedangkan melalui pengambilan sampel saliva, cara ini terasa kurang efektif karena tetap diperlukan kontak fisik dengan satwa (Smith 2004). Pada kajian ini pembahasan akan lebih memfokuskan pada penggunaan sampel feses.

## METODOLOGI

### Koleksi Sampel Feces

Koleksi dilakukan pada species kukang *Nycticebus coucang* betina di Pusat Rehabilitasi International Animal Rescue (IAR), Bogor, dari bulan Juli-September 2013. Koleksi sampel dilakukan pada tiga ekor betina dewasa dengan periode koleksi dua kali seminggu pada setiap pagi. Sampel feces di koleksi minimal 1 gram/koleksi/ individu. Total sampel yang digunakan untuk paralellims 12 sampel. Sampel disimpan di dalam freezer -20°C sampai digunakan.

### Ekstrak sampel

Ekstrak sampel feces dilakukan mengikuti metoda yang dikembangkan Deutsches Primatenzentrum (DPZ Gottingen Jerman) dan AIM-UZH dalam Nugraha (2012). Sampel yang sudah beku dithawing kemudian diambil kurang lebih 0.5 gram feces segar yang telah dihomogenkan menggunakan *stick* kayu, dimasukkan kedalam tabung *conical* 15 ml yang telah berisi 4 ml Alkohol 80 %. Sampel dan alkohol kemudian dihomogenkan dengan mengocok tabung secara horizontal selama 30 detik hingga tidak ada lagi bolus feces. Sampel kemudian disimpan di freezer dalam bentuk suspense alkohol-feces hingga saat analisa. Semua sampel tercatat di buku log sampel, yang meliputi pengumpulan tanggal, kolektor, penyimpanan, lokasi Untuk sampel yang disimpan beku, fluktuasi dari suhu penyimpanan juga dicatat.

### Enzyme Immunoassay Progesteron

Feces Progesteron dianalisa menggunakan DRG Progesteron Diagnostics kit (DRG Instruments GmbH, Germany) pada alat Elisa EIA MRX TC. Komponen KIT hormon yang digunakan dalam pengukuran hormon progesteron dengan teknik ELISA antara lain :

1. Microtitter Wells (sumuran) 12 x 8 (96 sumur) yang telah dilapisi dengan antibodi anti P4 (polyclonal).
2. Standart (0 – 6) 7 vial (1 mL).  
Konsentrasi (0; 0,3; 1,25; 2,5; 5; 15;40 ng/mL).
3. Conjugate enzyme (1 vial), 25 mL  
P4 berkonjugasi dengan horseradish peroxidase mengandung:  
0.03% proclin 300  
0.015% BND (5-bromo 5-nitro-1,3-dioxane)  
0.010% MIT (2-methyl-2H-isothiazol-3one).
4. Substrat solution 1 vial, 14 mL  
Tetramethylbenzidine (TMB)
5. Stop solution 1 vial 14 mL (0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
6. Wash solution 1 vial, 30 mL (concentrated 40 x).

Konsentrasi standar range adalah dari 0 ng sampai 40 ng per tube yaitu sebanyak 10 well (0, 0.15, 0.30, 0.625, 1.25, 2.50, 5, 10, 20, 40). Dua belas sampel feces dari kukang diencerkan dengan perbandingan 1:5; 1:10 dan tanpa pengenceran. Pengenceran menggunakan miliquid water (MQ). Pipet sebanyak 25 ul dari masing-masing larutan standar, control dan sampel ke dalam microtitreplate. Inkubasi pada temperatur ruang selama 5 menit, kemudian tambahkan enzim conjugate sebanyak 200 ul ke masing-masing well (sumur). Mix sebentar, ditutup menggunakan cliiping wrap dan aluminium foil, dan inkubasi selama 60 menit pada temperatur ruang.. Setelah inkubasi *microtitreplate* dicuci sebanyak tiga kali dengan *washing solution* (400 ul per well). Tambahkan 200 ul Substrate solution pada masing-masing well, inkubasi 15 menit pada temperatur ruang. Tambahkan 100 ul stop solution dan sesegera mungkin (tidak lebih dari 10 menit) dilakukan pembacaan hasil menggunakan Elisa Reader pada panjang gelombang 450 nm.

Uji ini diperlukan untuk membuktikan bahwa pengenceran berseri dari sampel adalah linear dari nilai assay dan paralel dengan kurva dari standar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hormon Progesteron

Sampel feces yang telah diekstraksi, selanjutnya dilakukan analisis hormon dengan metode ELISA untuk melihat profil metabolit hormon progesteron feces. Untuk melakukan analisis hormon progesteron terlebih dahulu dilakukan *parallelism test* untuk mengetahui apakah hasil analisis hormon sampel non-invasive yang dianalisis sebangun (*parallel*) atau tidak dengan kurva standart. Apabila hasil dari *parallelism test* tersebut sebangun (*parallel*) dengan kurva standart, maka dapat dilakukan analisis hormon pada sampel non-invasive yaitu feces yang telah dikoleksi.

Pengujian dilakukan dengan memilih beberapa contoh sampel feces kukang yang telah diekstraksi dengan menggunakan beberapa factor pengencer. Pengenceran dilakukan bertingkat dengan perbandingan 1:5, 1:10 dan 1:1. Hasil dari *parallelism test* hormon progesteron yang telah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil *parallelism test* hormon progesteron

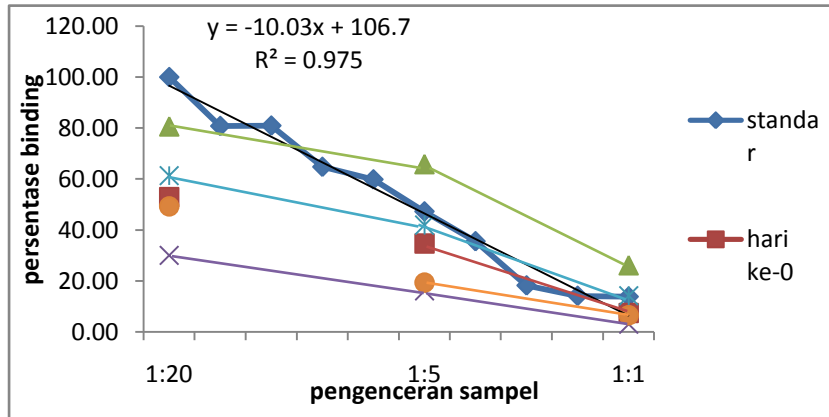
No.	ID	Konsentrasi (ng/mL)	Nilai OD	Persentase Binding (%)
1	Standar 0	0.000	1.298	100.00
2	Standar 1	0.150	1.049	80.82
3	Standar 2	0.300	1.051	80.97
4	Standar 3	0.625	0.841	64.79
5	Standar 4	1.250	0.777	59.86
6	Standar 5	2.500	0.614	47.30
7	Standar 6	5.000	0.462	35.59
8	Standar 7	10.000	0.237	18.26
9	Standar 8	20.000	0.184	14.18
10	Standar 9	40.000	0.180	13.87

Tabel 2. Data Koleksi Sampel, Berat basah, Berat kering, Konsentrasi Hormon dan Final Konsentrasi Pada kukang Sumatra (*Nycticebus coucang*).

No.	Hari ke-	pengenceran sampel	Nilai OD	persentase Binding (%)
1	0	20 X	0.687	52.93
		5 X	0.451	34.75
		1 X	0.097	7.47
3	14	20 X	1.047	80.66
		5 X	0.855	65.87
		1 X	0.340	26.19
6	35	20 X	0.389	29.97
		5 X	0.209	16.10
		1 X	0.039	3.00
9	56	20 X	0.796	61.33
		5 X	0.544	41.91
		1 X	0.184	14.18
12	77	20 X	0.640	49.31
		5 X	0.251	19.34
		1 X	0.085	6.55

Dari hasil yang diperoleh pada *parallelism test* hormon Progesteron (Tabel 1) diketahui bahwa konsentrasi OD tertinggi terdapat pada koleksi hari ke 14 dengan pengenceran 1:20 sebesar 1,047ng/ml sedangkan konsentrasi terendah terdapat pada koleksi hari ke 35 sebesar 0.034 ng/ml pada sampel tanpa pengenceran atau original. Berdasarkan nilai OD, sampel non-invasive feces

menunjukkan range yang sama atau di dalam OD standart yaitu diantara nilai 0.180-1.298. Untuk melihat apakah *parallelism test* hormon progesteron sebangun dengan kurva standart dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik hasil parallelism hormon progesteron

Berdasarkan grafik parallelism hormon progesteron menunjukkan bahwa kurva sampel feces sebangun dengan kurva standart. Kurva sampel terletak di dalam range kurva normal. Berdasarkan hasil parallelism sampel non-invasive dari feces maka dapat dilakukan analisa hormon ke tahap berikutnya.

### Analisis Hormon Progesteron

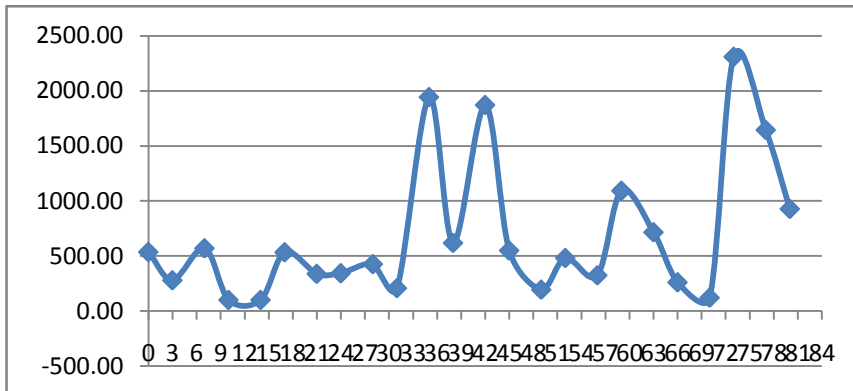
Setelah dilakukan parallelisms test dari beberapa sampel terkoleksi dan memberikan hasil sebangun dengan kurva standart, maka dapat dilakukan analisis lebih lanjut terhadap sampel feces dengan menggunakan pengenceran 1:5 dan sampel original. Ke dua perlakuan test parallelisms tersebut memberikan kurva sebangun dengan standart. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel. 3.

Tabel 3. Hasil Analisis hormon progesteron pada *Nicticebus coucang*

No	Hari ke-	Berat sampel kering (g)	Volume Ethanol (ml)	Konsentrasi Hasil (pg/ul)	Konsentrasi Akhir (pg/ 25 ul)
1	0	6.9216	3.9713	4.47	536.31
2	3	6.8966	4.0193	10.183*	279.38
3	7	6.9399	4.0622	4.73	569.46
4	10	6.9641	4.0238	5.351*	100.76
5	14	6.9152	4.0152	0.83	100.80
6	17	6.8922	4.1375	18.83*	533.62
7	21	6.9295	4.0650	2.36	337.60
8	24	6.9644	3.9822	16.695*	343.23
9	28	6.8535	4.0560	2.66	425.63
10	31	6.9308	4.0399	8.121*	208.18
11	35	6.9145	4.0473	18.48	1941.69
12	38	6.8342	4.0375	13.446*	618.31
13	42	6.9048	4.0427	15.19	1869.80
14	45	6.8789	4.0015	11.265*	549.05
15	49	6.9738	3.9860	2.04	194.44
16	52	6.932	4.0769	21.116*	481.48
17	56	7.0372	4.0282	3.06	324.42
18	59	6.9015	4.0428	37.6*	1092.02
19	63	6.9089	4.0842	5.24	715.21
20	66	6.8866	3.9734	9.407*	260.84
21	70	6.907	4.0736	3.21	121.22
22	73	6.9154	4.0207	18.722*	2307.68
23	77	6.9195	4.0426	13.00	1643.44
24	80	6.9325	4.0153	6.419*	927.13

Hasil analisis hormon progesteron pada kukang betina menunjukkan konsentrasi tertinggi pada sampel tanpa pengenceran yaitu 2037.69 pg/ul atau 2.037 ng/ml pada hari ke 77 dan terendah 100.76 pg/ul atau 0.107 ng/ml. Konsentrasi pada pengenceran 1:5 tertinggi pada hari ke 42 yaitu 1869.80 pg/ul atau 1.869 ng/ml dan terendah 100.80 pg/ul atau 0.108 ng/ml. Nilai konsentrasi tabel diatas menunjukkan fluktuasi peningkatan dan penurunan hormon progesteron dalam tiga bulan koleksi. Peningkatan konsentrasi hormon terjadi mulai pada minggu ke 6 koleksi sampai minggu ke -12. Rentang waktu dari minggu ke-6 sampai ke -12 adalah sekitar 36 hari-42 hari.





Gambar 2. Profil hormone progesterone pada kukang Sumatra dengan menggunakan sampel non invasive feces

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa pengukuran metabolit hormon progesteron dapat dilakukan dengan melakukan pendekatan *non-invasive* yaitu dengan menggunakan feses. Dari data profil hormon progesteron ini dapat diperoleh informasi yang berkaitan dengan status siklus kukang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Brown, J.L., Wasser, S.K., Wildt, D.E. and Graham.L.H. proteins based on their increased abundance in the (1994). Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non invasively in faeces of pregnant polar bears compared to pseudo- faeces. *Biol. Reprod.*, 51: 776-786.
- Brown, L. N., K. G. Odde, D. G. LeFever, M. E. King, and C. J. Neubauer.1988.Comparison of MGA-PGF<sub>2α</sub> to Syncro-Mate B for estrous synchronization in beefheifers. *Theriogenology* 30:1–12.
- Ganong, W.F. 1977. Nervous system in reproductive processes. In *Reproduction in Domestic Animals 3<sup>rd</sup> Edition*, eds. Cole, H.H. and Cupps P.T. 49-77. Academic Press.
- Hamilton, R.A., Stanton, P.G., O'Donnell, L., Steele, V.R., Taggart, D.A., and Temple-Smith P.D. 2000. Determination of seasonality in Southern Hairy-Nosed Wombats (*Lasiorhinus latifrons*) by analysis of fecal androgens. *Biol. Reprod.* 63:526–531.
- Hamasaki Y., Shinohara O., Ishida H., Hayashi Y., Nakazawa H. 2000. Decreased protein kinase C-epsilon expression in hypertrophied cardiac ventricles induced by triiodothyronine treatment in the rat. *Life Sci* 67: 1859-1868.

- Heistermann M, Palme R, Ganswindt A. 2006. Comparison of different enzyme immunoassays for assessment of adrenocortical activity in primates based on fecal analysis. *Am J Primatol* 68:257-273.
- Hirschenhauser, K., Kotrschal, K., and Möstl, E. 2005. Synthesis of measuring steroid metabolites in goose feces. *Ann. N.Y. acad. Sci.* 1046:1-16.
- Karen, A., Kovács, P., Beckers, J. F., Szenci, O. 2001. Pregnancy Diagnosis In Sheep: Review Of The Most Practical Methods. *Acta Vet. Brno.* 70: 115–126.
- Lasley, BL. and Savage A. 2007. Advances in the understanding of primate reproductive endocrinology. In: Campbell C, Fuentes A, KC M, Panger M, Bearder s (eds) *Primates in perspective*. New York: Oxford Univ Press. 356-369
- Lynch, J.W. Khan, M.Z., Altmann, J., Njahira, M.N. Rubenstein, N. 2003. Concentration of four fecal steroids in wild baboons: Short-term storage conditions and consequences for data interpretation. *Gen. Com. Endocrinol.* 13: 264-271.
- 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*, v.138, p.189-199.
- Morato, R.G. Verreschi, I.T.N., Guimarães, M.A.B.V., Cassaro, K., Pessuti, C., Barnabe, R. C. 2004. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology* 61:1273-1281.
- Möstl, E., Messmann, S., Bagu, E., Robia, C., and Palme, R. 1999. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Journal of Veterinary Medicine A* 46, 621-631.
- Oates, J.E., Bradshaw, F.J. Bradshaw, S.D., Lonsdale, R.A. 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* 50:395-406
- Ostner, J. and Heistermann, M. 2003. Endocrine characterization of female reproductive status in wild redfronted lemurs (*Eulemur fulvus rufus*). *Gen. Com. Endocrinol.* 131:274-283.
- 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., and Bamberg, E. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Reprod. Sci.* 42:515-526.
- Shideler, S.E., Ortuno, A.M., Moran, F.M., Moorman, E.A., and 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. *Biol. Reprod.* 48, 1290-1298
- Smith, T. 2004. *Zoo Research Guidelines : Monitoring Stress in Zoo Animal*. The Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland. London.
- Steimer, Th. 2004. Steroid hormone metabolism. [http://www.gfmer.ch/books/reproductive\\_health/steroid\\_hormone\\_metabolism.html](http://www.gfmer.ch/books/reproductive_health/steroid_hormone_metabolism.html) [11-09-2004].
- Velloso, A.L., Wasser, S.K., Monfort, S.L. and Dietz, J.M. 1998. Longitudinal fecal steroid excretion in Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *Gen. Com. Endocrinol.* 112 : 96-107.
- Wasser, S. K., Risler, L., and Steiner, R. A. (1988). Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction* 39, 862-872.
- Wolf, O.T., Preut, R., Hellhammer D.H., Kudielka, B. M., Scrumeyer. T. H., and Kirschbaum, C. 2000. Testosterone and cognition in elderly men: A single testosterone injection blocks the practice effect in verbal fluency, but has no effect on spatial or verbal memory. *Biol. Psych.* 47, 650-654.
- Ziegler, T., Hodges, K., Winkler, P., and Heistermann, M. (2000). Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female Hanuman langurs (*Presbytis entellus*). *American Journal of Primatology* 51, 119-134.