

Pola Diurnal Metabolit Testosteron dan Kortisol di dalam Feses Owa Jawa (*Hylobates moloch*) di Penangkaran

Diurnal Patterns of Testosterone and Cortisol Metabolites in Fecal of Javan Gibbons (Hylobates moloch) in Captivity

PUDJI ASTUTI^{1*}, TUTY LASWARDI YUSUF², ERIC HAYES³, HERA MAHESHWARI²,
LUTHFIRALDA SJAHFIRDI⁴, DONDIN SAJUTHI⁵

¹Bagian Fisiologi, FKH, Universitas Gadjah Mada, Jalan Olah Raga, Karang Malang, Yogyakarta 55281

²Departemen Fisiologi dan Reproduksi, FKH, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

³Washington National Primates Research Center, University of Washington, Seattle, USA

⁴Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Indonesia, Kampus Depok, Depok 16424

⁵Rumah Sakit Hewan, Institut Pertanian Bogor dan Pusat Studi Satwa Primata, LPPM IPB, Jalan Lodaya II/5, Bogor 16151

Diterima 27 Juli 2005/Disetujui 6 April 2006

The aims of this research were to determine diurnal patterns of testosterone and cortisol metabolites to predict the testis functional status. In this study, fecal testosterone and cortisol were quantified in 77 samples from three male *Hylobates moloch* during a course of three months period. These data showed that the highest concentration of fecal testosterone occurred at 18.00-06.00 (23.61 ng/g dried feces), then declined gradually. The lowest concentration was in the evening (5.54 ng/g dried feces). Our tests showed that there was a decrease in the mean testosterone concentration from 06.00-10.00 to 10.00-14.00 to 14.00-18.00. For cortisol, the highest concentration occurred at 06.00-10.00 (597.84 ng/g dried feces), then decline gradually in the evening (225.73 ng/g dried feces).

Key words: *Hylobates moloch*, feces, testosterone, cortisol, diurnal pattern

PENDAHULUAN

Berdasarkan *Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES), Owa Jawa (*Hylobates moloch*) merupakan salah satu jenis primata dengan status *critically endangered* (Asquith 2001). Berbagai macam teknologi reproduksi telah dilakukan untuk meningkatkan populasi satwa tersebut. Meskipun demikian, perkawinan secara alami di penangkaran juga merupakan cara yang tidak kalah penting dalam upaya konservasi melalui pencarian bibit unggul. Bagi pejection, fungsi testis merupakan suatu hal yang mutlak untuk dikaji demi keberhasilan penangkaran. Kondisi tersebut dapat diketahui dengan mengamati pola diurnal testosteron. Pada tikus dan beberapa mamalia, sekresi testosteron berfluktuasi secara diurnal dan mempunyai fungsi antara lain untuk menimbulkan libido serta berperan dalam proses perpanjangan bentuk spermatid (Guyton & Hall 1996; Mingoti *et al.* 2003). Oleh karena itu, pola diurnal yang berfluktuasi dan tingginya kadar testosteron merupakan salah satu indikasi aktivitas testis dan spermatogenesis yang optimal.

Deteksi hormon testosteron maupun kortisol dapat dilakukan secara *invasive* (menggunakan serum/plasma), maupun *non-invasive* (menggunakan urine, saliva, dan feses). Untuk satwa liar yang sangat mudah stres seperti *H. moloch*,

cara kedua merupakan metode yang paling tepat digunakan. Dibandingkan saliva dan urine, pengambilan contoh feses mempunyai beberapa keuntungan antara lain lebih mudah dikoleksi dan lebih stabil terhadap gangguan tingkah laku (Whitten *et al.* 1998). Namun, jumlah contoh/hari yang diperoleh dari hewan yang sama sangat terbatas karena satwa hanya berdefekasi satu hingga dua kali/hari.

Fluktuasi hormon testosteron terjadi karena adanya mekanisme umpan balik hormon LH dari hipofisis serta GnRH dari hipotalamus (Muller & Lipson 2003). Dalam waktu 24 jam, testis pada manusia akan melepaskan denyutan testosteron sebanyak 12 hingga 24 kali (Cauter 1990). Pada hormon kortisol, denyutan terjadi antara tujuh hingga sembilan kali selama 24 jam akibat adanya stimulan ACTH secara episodik (Liotta & Krieger 1990). Dengan adanya denyutan-denyutan hormon akan timbul suatu pola harian dengan fluktuasi tertentu.

Sebagai penanda stres (Clarke *et al.* 1996), kajian tentang pola sekresi kortisol manusia di dalam plasma telah diketahui secara pasti yakni tertinggi pada jam 8-10 pagi (50-230 ng/ml), sedangkan kadar terendah dicapai pada sore hingga malam hari (92.113 ± 20.82 ng/ml) (Cauter *et al.* 1996). Kadar tertinggi testosteron di dalam plasma manusia dicapai pada malam hari (Houmard *et al.* 1990). Pada sebagian besar hewan (ikan, reptilia, burung, dan mamalia) kondisi tersebut sangat berhubungan dengan tingkah laku, pola kawin, dan sistem

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-274-882384,
E-mail: pastuti2001@yahoo.com

sosial. Khusus primata, kadar kortisol dan testosteron dipengaruhi oleh status sosial (Smith & French 1997), transportasi (Sutian 2005), dan umur (Robbins & Czekala 1997).

Pejantan muda *Gorilla gorilla beringei* memiliki kadar testosteron rendah dan kortisol tinggi, sedangkan pada dewasa, kadar testosteron cenderung meningkat namun kortisol menurun. Dalam bidang reproduksi, tingginya kadar kortisol dapat menekan sekresi testosteron (Virgins & Sapolsky 1997). Pernyataan tersebut diperkuat oleh Smith dan French (1997) yang melaporkan bahwa primata dengan status subordinat mempunyai kemampuan untuk menghasilkan keturunan yang lebih rendah dibandingkan dengan monyet dominan (α -male) terutama pada monyet Dunia Lama dan *Hominoid* (Czekala et al. 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pola diurnal ekskresi steroid (testosteron dan kortisol) feses pada *H. moloch* sebagai indikator aktivitas testis. Hal ini berarti bahwa adanya ekskresi steroid yang berfluktuasi menunjukkan aktivitas testis yang optimal.

BAHAN DAN METODE

Satwa Penelitian dan Manajemen Pemeliharaan.

Penelitian ini menggunakan adalah 77 contoh feses yang berasal dari tiga ekor owa Jawa (*H. moloch*) jantan dewasa. Satu ekor dipelihara di Pusat Studi Satwa Primata (PSSP), dan dua ekor di Kebun Binatang Ragunan, Jakarta. Dua dari tiga ekor owa Jawa tersebut diletakkan dalam kandang individu yakni owa yang dipelihara di PSSP dan Karantina Ragunan (Kebun Binatang Ragunan) sedangkan satu ekor lainnya dipelihara secara berpasangan. Pakan yang diberikan merupakan pakan standar yang terdiri dari buah, sayuran dan *monkey chow* 10 buah/hari sedangkan air minum diberikan secara *ad libitum*. Berdasarkan analisis proksimat, pakan dari ketiga satwa mempunyai nilai energi kalori/g yang sedikit berbeda yakni: 4077 En.kal/g untuk owa I; 3939 En.kal/g untuk owa II, dan 3996 En.kal/g owa III.

Koleksi Contoh Feses. Koleksi contoh feses dilakukan setiap hari selama lebih kurang tiga bulan, antara pukul 18.00 sampai dengan pukul 18.00 hari berikutnya. Karena metabolit hormon pada feses bagian luar dan dalam tidak sama, maka untuk mendapatkan homogenitas yang tinggi setiap pengambilan feses dilakukan secara keseluruhan kemudian dilakukan pencampuran supaya lebih merata. Selanjutnya, feses disimpan dalam suhu -20 °C sampai dilakukan proses berikutnya. Pengambilan contoh dilakukan empat jam sekali/24 jam, dimulai dari pukul 06.00. Mulai pukul 18.00-22.00; 22.00-02.00 semua satwa tidak pernah berdefekasi, oleh karena itu interval waktu pengambilan menjadi tidak sama 12 jam (18.00-06.00). Adanya perbedaan waktu untuk berdefekasi setiap hari serta kondisi kandang yang berbeda-beda pada setiap satwa, mengakibatkan jumlah replikasi contoh untuk masing-masing satwa juga menjadi tidak sama.

Ekstraksi Feses. Feses yang telah disimpan di dalam suhu -20 °C diambil kemudian masing-masing dipindahkan ke dalam tabung plastik untuk selanjutnya dilakukan liofilisasi dan pulverisasi. Liofilisasi dikerjakan dengan menggunakan *freeze*

dryer 3 x 24 jam berturut-turut. Serbuk yang telah terbentuk diambil 50 mg berat kering kemudian diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol 80% sebanyak 3 ml. Selanjutnya, campuran dimasukkan ke dalam tabung polipropilen berukuran 15 ml, dan dicampur menggunakan vorteks selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 500 g selama 10 menit (Monfort et al. 1998) dan dilakukan segera setelah larutan dicampur menggunakan vorteks. Supernatan dituang ke dalam tabung mikro 1.5 ml dan disimpan di dalam suhu -20 °C sampai dilakukan asai menggunakan *Enzyme Link Immunosorbent Assay* (ELISA).

Asai Hormon Testosteron dan Kortisol. Dalam penelitian ini, digunakan dua kit *Testosteron Enzyme Immuno Assay* (EIA) produk Biocheck, Inc, Faster city, CA dan dua kit Kortisol EIA produk DRG Instrument GmbH, German. Prosedur kerja dari analisis hormon yang digunakan adalah prinsip kompetitif yaitu testosteron/kortisol di dalam contoh akan berkompetisi dengan testosteron/kortisol-konjugat *Horse Raddish Peroxidase* (HRP).

Reaksi Silang Testosteron dan Kortisol pada ELISA.

Hormon testosteron yang digunakan mempunyai reaksi silang dengan beberapa derivat antara lain: testosteron 100%, dihidrotestosteron 0.86%, androstenedion 0.89%, androsteron 1.0%, 17 β estradiol 0.05%, progesteron \leq 0. Reaksi silang pada hormon kortisol adalah: kortisol 100%, kortikosteron 45%, progesteron 9%, deoksikortisol \leq 2%, deksametason \leq 2%, estriol \leq 0.01%, estron \leq 0.01%, testosteron \leq 0.01%. Persamaan kurva standar untuk hormon testosteron adalah: $y = -0.144 \ln(x) + 0.4871$; $y = -0.1447 \ln(x) + 0.4766$, dengan r^2 sebesar 0.998, sedangkan hormon kortisol diperoleh persamaan $Y = -0.4107 \ln(x) + 2.8643$ dan $y = -0.2463 \ln(x) + 1.7821$ dengan r^2 : 0.989.

Analisis Data. Untuk mengevaluasi apakah ekskresi steroid berfluktuasi secara nyata digunakan analisis statistik ANOVA 2 faktor tanpa replikasi. Faktor pertama adalah satwa percobaan, sedangkan waktu pengambilan contoh feses merupakan faktor kedua (18.00-06.00, 06.00-10.00, 10.00-14.00, dan 14.00-18.00). Apabila terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji Tukey. Dalam penelitian ini, rataan konsentrasi kortisol/testosteron dari setiap sel digunakan sebagai variabel dalam ANOVA.

HASIL

Konsentrasi Metabolit Testosteron di dalam Feses. Rataan konsentrasi metabolit testosteron adalah 23.617 ± 10.11 ; 19.900 ± 4.001 ; 11.346 ± 5.251 ; 5.544 ± 3.421 ng/g feses kering berdasarkan pengambilan waktu secara berurutan pada pukul 18.00-06.00; 06.00-10.00; 10.00-14.00; dan 14.00-18.00 (Gambar 1a). Secara umum, rataan konsentrasi metabolit testosteron menurun secara sangat nyata ($p < 0.0001$). Konsentrasi puncak hormon testosteron dalam feses terjadi pada pengambilan antara jam 18.00-06.00 kemudian menurun sampai titik terendah pada jam 14.00-18.00. Bila penurunan konsentrasi dikaji lebih rinci, tampak bahwa penurunan dari pukul 18.00-06.00 sampai 06.00-10.00 tidak berbeda nyata ($p = 0.1439$), sedangkan dari

06.00-10.00 sampai 10.00-14.00 dan 14.00-18.00 menunjukkan perbedaan yang nyata.

Konsentrasi Metabolit Kortisol di dalam Feses. Rataan konsentrasi metabolit kortisol diperoleh dengan waktu pengambilan yang sama yakni: 18.00-06.00, 06.00-10.00, 10.00-14.00, dan 14.00-18.00 berturut-turut adalah 452.76 ± 117.75 , 597.83 ± 107.85 , 280.50 ± 117.59 , 210.01 ± 102.27 ng/g feses kering. Dengan demikian, tampak bahwa terdapat perbedaan penurunan konsentrasi yang sangat nyata ($p < 0.001$) antar waktu (Gambar 1b). Rataan konsentrasi kortisol tertinggi terjadi pada pengambilan pukul 06.00-10.00 ($p < 0.005$) dan kadar terendah dicapai pada pengambilan pukul 14.00-18.00 ($p < 0.004$).

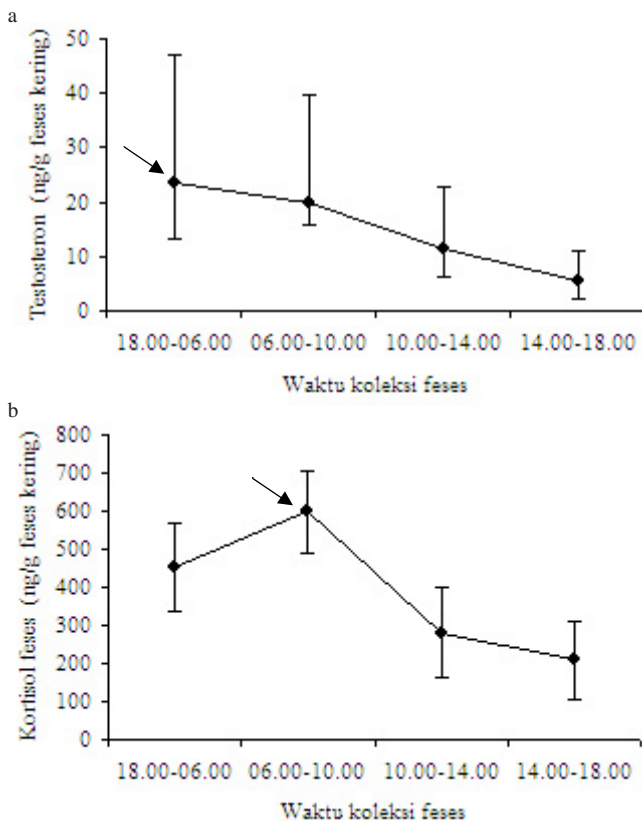
PEMBAHASAN

Pola diurnal untuk metabolit hormon testosteron dan kortisol pada *H. moloch* menunjukkan pola yang berfluktuasi secara sangat nyata ($p < 0.0001$) untuk metabolit testosteron dan nyata ($p < 0.001$) untuk metabolit kortisol. Dengan ditemukannya pola tersebut dapat ditunjukkan bahwa pada *H. moloch*, metabolit testosteron dan kortisol diekskresikan melalui feses. Hau *et al.* (2004) melaporkan bahwa persentase ekskresi kortisol pada berbagai hewan adalah berbeda. Pada babi dan kanguru sebagian besar kortisol diekskresikan melalui urine (92-93%), sedangkan sisanya (7-8%) melalui feses; sebaliknya pada kucing, metabolit kortisol dalam urine hanya

18%, pada feses 82%. Fluktuasi hormon timbul sebagai akibat adanya denyutan yang terjadi secara berulang sehingga akan membentuk pola tertentu. Pada hormon testosteron, adanya rangsangan LH maupun GnRH secara fluktuatif (Guyton & Hall 1996) terjadi 12 sampai 24 kali dalam waktu 24 jam (Cauter 1990) sedangkan pada hormon kortisol rangsangan ACTH secara episodik sebanyak tujuh hingga sembilan kali selama 24 jam (Liotta & Krieger 1990). Pola ini sama dengan hasil plasma maupun urine pada simpanse (Muller & Lipson 2003), gorila (Czekala & Sutherland-Smith 1994), *squirrel monkey* (Coe & Levine 1995), dan manusia (Cauter *et al.* 1996). Sesuai dengan hasil penelitian ini, beberapa monyet Dunia Lama juga menunjukkan sekresi puncak testosteron pada pukul 21.00-24.00 (Moudgal *et al.* 1993), dan antara pukul 02.00-06.00 (Heistermann *et al.* 2001, data tidak dipublikasikan). Uji ekskresi radioaktivitas testosteron dalam urine marmoset, monyet ekor panjang, dan simpanse adalah dua jam setelah injeksi, sedangkan untuk feses, uji ekskresi yakni 4, 22, dan 2 jam, berturut-turut untuk marmoset, simpanse dan monyet ekor panjang (Mohle *et al.* 2002). Pada primata jenis tertentu termasuk *H. moloch*, tingginya kadar testosteron tidak berkaitan langsung dengan tingkah laku seksual serta kopulasi meskipun salah satu fungsi testosteron adalah untuk menimbulkan libido. Kadar tertinggi testosteron dalam plasma maupun feses terjadi pada malam hari sampai pukul 06.00, namun aktivitas seksual serta kopulasi dilakukan pada siang hari. Jhonson dan Everrit (1996) menjelaskan bahwa berbeda dengan mamalia lain, tingkah laku seksual pada primata sangat tergantung kepada, status sosial, dan aktivitas harian.

Meskipun konsentrasinya kecil, kortikoid imunoreaktif yang terdapat di dalam feses dapat digunakan sebagai penentu indeks stres pada berbagai satwa primata (Czekala *et al.* 1994). Pada kortisol, ekskresi metabolit terjadi beberapa jam setelah hormon tersebut beredar di dalam darah yaitu 8-24, 22, dan 26 jam berturut-turut untuk marmoset, monyet ekor panjang, dan simpanse (Bahr *et al.* 2000). Pendapat tersebut sedikit berbeda dengan Whitten *et al.* (1998) yang menyatakan bahwa pada simpanse, respon stres akibat anasthesia dapat diketahui melalui pemeriksaan feses dua hari setelah perlakuan, sedangkan pada urine hanya satu hari setelah perlakuan. Dalam bidang reproduksi, tingginya kadar kortisol yang terus menerus dapat menekan sekresi testosteron. Hal itu karena selama stres, tubuh akan menyekresikan β -endorfin ke otak khususnya ke daerah nukleus arkuatus. Daerah nukleus arkuatus menginervasi saraf pada area preoptik, yakni pusat reseptor testosteron di otak, maka testosteron menjadi ikut terhambat (Jhonson & Everrit 1996).

Berdasarkan hasil penelitian ini serta didukung pernyataan terakhir, dapat diduga bahwa ekskresi kortikoid pada *H. moloch* adalah 48 jam, mengingat keduanya (simpanse dan owa Jawa) berasal dari superfamili yang sama yakni Hominoidea. Terdapat hubungan yang sangat erat antara pola pakan dengan waktu ekskresi metabolit steroid. Pakan dengan kandungan serat yang rendah menyebabkan transit ke gastrointestinal membutuhkan waktu yang lebih lama, sehingga waktu ekskresi metabolit hormon dari dalam tubuh juga menjadi lebih lama (Whitten *et al.* 1998). Kadar hormon



Gambar 1. a. Pola diurnal testosteron di dalam feses owa (ng/g feses kering), sekresi tertinggi terjadi pada jam 18.00-06.00; b. Pola diurnal hormon kortisol di dalam feses (ng/g feses kering), sekresi tertinggi terjadi pada pukul 06.00-10.00.

di dalam urine maupun feses merupakan refleksi status endokrin beberapa jam sebelum pengambilan contoh (Whitten *et al.* 1998). Ditinjau dari perilaku sosial, ada kecenderungan kera atau monyet dengan status sosial dominan mempunyai kadar testosteron yang lebih tinggi dibandingkan dengan subdominan (Robbins & Czekala 1997).

Dari hasil yang didapat serta dari beberapa perbandingan antar primata diketahui bahwa pola diurnal ekskresi testosteron dan kortisol imunoreaktif pada feses mempunyai pola yang serupa dan konsisten. Untuk hormon testosteron, kadar maksimum dicapai pada pengambilan sampel pukul 18.00-06.00 sedangkan hormon kortisol kadar tertinggi pada pukul 06.00-10.00 kemudian mencapai titik terendah pada pukul 14.00-18.00. Waktu sekresi kortikoid sampai dieskresikan ke dalam feses (*time lags*) diduga membutuhkan waktu 48 jam. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa adanya pola diurnal yang berfluktuasi secara nyata merupakan indikasi normalnya fungsi testis secara endokrin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala PSSP-LPPM IPB, Bogor dan Direktur Kebun Binatang Ragunan atas izin penggunaan satwa, Diah Iskandriati atas izin pemakaian ELISA, Juhaeri untuk analisis statistik, Silmy Mariya dan Uus Saepulloh atas bantuan kerja di Laboratorium Imunologi dan Mikrobiologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Asquith NM. 2001. Misdirections in conservation biology. *Cons Biol* 15:346-350.
- Bahr NI, Palme R, Mohle U, Hodges JK, Heistermann M. 2000. Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. *Gen Com Endocrinol* 117:427-438.
- Cauter EV. 1990. Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine function: a minireview. *Horm Res* 34:45-53.
- Cauter EV, Leproult R, Kupfer DJ. 1996. Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Met* 7:2468-2473.
- Clarke MR, Harrison RM, Didier ES. 1996. Behavioral, immunological and hormonal responses associated with social change in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol* 39:223-233.
- Coe CL, Levine S. 1995. Diurnal and annual variation of adrenocortical activity in the squirrel monkey. *Am J Primatol* 35:282-292.
- Czekala NM, Lance VA, Sutherland-Smith M. 1994. Diurnal urinary corticoid excretion in the human and gorilla. *Am J Primatol* 34:29-34.
- Czekala NM, Sutherland-Smith M. 1994. Preliminary investigation of fecal testosterone and cortisol levels in wild male Mountain Gorillas. *Am J Primatol* 35:300-306.
- Guyton AC, Hall JE. 1996. *Textbook of Medical Physiology*. Ed ke-9. Philadelphia: WB saunders.
- Hau J, Abelson KS, Carlsson H-E, Royo F. 2004. Stress-assessed by quantification of non-invasive stress markers. *J Endocrinol* 1:145-153.
- Heistermann M, Uhrigshardt J, Husung A, Kaumanns W, Hodges JK. 2001. Measurement of fecal steroid metabolites in the lion-tail macaque (*Macaca silenus*): a non-invasive tool for assessing female ovarian function. *Primate Report* 59:27-42.
- Houmard JA *et al.* 1990. Testosterone, cortisol and creatine kinase levels in male distance runners during reduced training. *Intl J Sports Med* 1:41-45.
- Jhonsen MH, Everitt BJ. 1996. *Essential Reproduction*. Ed ke-4. London: Blackwell Science.
- Liotta AS, Krieger DT. 1990. ACTH and related peptide. Di dalam: Baulieu EE, Kelley PA (ed). *Hormones: from Molecules to Disease*. New York: Champman and Hall. hlm 465-478.
- Mingoti GZ, Pereira RN, Monteiro CMR. 2003. Fertility of male adult rats submitted to forced swimming stress. *Braz J Med Biol Res* 36:677-682.
- Mohle U, Heistermann M, Palme R, Hodges JK. 2002. Characterization of urinary and fecal metabolites of testosterone and their measurement for assessing gonadal endocrine function in male nonhuman primates. *Gen Comp Endocrinol* 129:135-145.
- Monfort SL, Mashburn BS, Brewer BA, Creel R. 1998. Evaluation adrenal activity in African Wild Dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *J Zoo Wildl Med* 292:129-133.
- Moudgal NR, Ravindranath N, Rao AJ, Aravindan GR. 1993. The regulation of testosterone secretion in Bonnet Monkeys (*Macaca radiata*). Di dalam: Matano S, Goodman M (ed). *Evolutionary Biologi, Reproductive Endocrinology and Virology*. hlm 365-373.
- Muller MN, Lipson SF. 2003. Diurnal patterns of urinary steroid excretion in wild Simpanes. *Am J Primatol* 60:161-166.
- Robbins MM, Czekala NM. 1997. A Preliminary investigation of urinary testosterone and cortisol levels in wild male Mountain Gorillas. *Am J Primatol* 43:51-64.
- Smith TE, French JA. 1997. Social and reproductive conditions modulate urinary cortisol excretion in black Tufted-Ear Marmosets (*Callithrix kuhli*). *Am J Primatol* 42:253-267.
- Sutian W. 2005. Respon stres dengan penanda kortisol dalam urin monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) setelah mengalami transportasi [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Virgins CE, Sapolsky RM. 1997. Styles of male social behavior and their endocrine correlates among low-ranking baboons. *Am J Primatol* 42:25-39.
- Whitten PL, Stavisky R, Aurelli F, Russel E. 1998. Response of fecal cortisol to stress in captive simpanes (*Pan troglodytes*). *Am J Primatol* 44:57-69.