

## Pemanfaatan *Electronic Nose* sebagai Sensor Kimiawi Urin Guna Melacak Birahi Sapi

### (*ELECTRONIC NOSE AS URINARY CHEMICAL SENSOR FOR DETERMINING ESTROUS PHASE IN CATTLE*)

Pudji Astuti<sup>1</sup>, Claude Mona Airin<sup>1</sup>, Slamet Widiyanto<sup>2</sup>,  
Luthfiralda Sjahfirdi<sup>3</sup>, Hera Maheshwari<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan

<sup>2</sup>Departemen Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

<sup>3</sup>Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat

<sup>4</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi, Farmakologi,

Institut Pertanian Bogor, Bogor

Jln. Fauna No.2, Karang Malang, Yogyakarta, Indonesia

Email: pastuti2@ugm.ac.id.

### ABSTRAK

Salah satu keberhasilan program inseminasi buatan (IB) pada sapi adalah ketepatan dalam menentukan awal estrus. Permasalahan yang dihadapi adalah tidak semua sapi menunjukkan tanda-tanda estrus secara nyata, sehingga penghitungan waktu inseminasi menjadi tidak tepat sampai akhirnya persentase keberhasilan IB menjadi kurang dari 50%. Untuk memecahkan permasalahan tersebut dirintis suatu pembuatan alat detektor estrus menggunakan *Electronic Nose* (EN). Selama ini, penentuan kadar estradiol sebagai indikator estrus dilakukan dengan pengamatan tanda fisik dan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* ELISA. Kelebihan penentuan estrus dengan EN adalah lebih murah karena tidak perlu menggunakan bahan, dengan demikian cukup menggunakan sampel saja. Mekanisme kerja EN adalah menggunakan sensor yang bersifat menguap, sementara hewan yang estrus akan mengeluarkan feromon yang bersifat menguap. Tujuan jangka pendek dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah stadium awal estrus dapat dideteksi dengan menggunakan EN. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah urine dari sapi peranakan ongole (PO) betina dewasa yang memiliki *Body Condition Score* (BCS) 3, dipelihara di dusun Kuwang, Kecamatan Cangkringan, Sleman, Yogyakarta. Pengambilan urine dilakukan sesaat sebelum penyuntikan PGF2 alfa sebagai sarana penyerentakan birahi dan saat estrus. Dari delapan sensor yang digunakan, sampel urine sapi estrus menunjukkan kadar sensitif terhadap sensor metana, propana, butana, sedangkan pada sapi non-estrus, urine menangkap sensor metana, propana, butana dan hidrogen sulfida. Dengan demikian, *Electronic Nose* sangat prospektif digunakan sebagai alat detektor estrus pada sapi. Hidrogen disulfida kemungkinan dapat digunakan sebagai pembanding antara sapi estrus dan non-estrus.

Kata-kata kunci: sapi PO, *electronic nose* (EN), estrus, non-estrus

### ABSTRACT

The timing of artificial insemination relies largely on behavioral observation of estrus. The problem faced is that not all cattle shows signs of estrus significantly, which affect the accuracy of insemination, and therefore, the success rate of Artificial Insemination is less than 50%. Recently, the determination of estradiol levels as an indicator of estrus is done by observation of physical signs and doing ELISA test, which is expensive and provide longer time. In order to solve these problems, a tool estrus detector is made namely *Electronic Nose* (EN). Determination of estrus with EN is cheaper because it does not need to use complex materials, just only use the samples. Mechanism of action of EN is using a sensor that is vaporized, while animals estrus will emit pheromones that are vaporized. The aim of this study was to determine whether the stage of estrus can be detected by using EN. Urine of female Ongole Crossbred which maintained in Kuwang, district of Cangkringan, Yogyakarta, with BCS of 3 was used in this research. The sample was collected shortly before injection of dinoprost as estrus synchronization then it repeated when cattle got

estrus phase. The urinary sample of the estrus cattle was sensitive to methane, propane, butane, whereas in non-estrus cattle, besides the three of these component (methane, propane, butane), sensor was also captured hydrogen sulfide. Furthermore, our electronic nose had been able to distinguish estrus phase and non-estrus based on domain area. Thus, the Electronic Nose is very prospect used as a detector of estrus in cattle. Hydrogen disulfide could possibly be used as an indicator comparison between cow estrus and non-estrus.

Keywords: Ongole crossbred, *Electronic Nose* (EN), estrus, non-estrus

## PENDAHULUAN

Salah satu keberhasilan program inseminasi buatan (IB) pada sapi adalah ketepatan dalam menentukan awal estrus sehingga waktu optimal kawin dapat ditentukan. Permasalahan yang dihadapi adalah tidak semua sapi menunjukkan tanda-tanda berahi/estrus secara nyata, sehingga ketepatan waktu inseminasi buatan (IB) menjadi kurang tepat sampai akhirnya persentase keberhasilan IB menjadi rendah. Kerugian yang ditimbulkan oleh kegagalan IB adalah pemberian pakan yang sia-sia, kerugian ekonomi pedet, obat-obatan dan susu. Untuk memecahkan permasalahan tersebut akan dirintis suatu pembuatan alat detektor estrus menggunakan *electronic nose* (EN). Selama ini, penentuan kadar estradiol sebagai indikator estrus dilakukan dengan mengamati tanda fisik dan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), namun tidak semua sapi menunjukkan gejala estrus dan membutuhkan waktu yang relatif lama serta mahal. Oleh karena itu dicari metode alternatif yang lebih praktis dan murah. Sebagai langkah awal, telah dilakukan monitoring stadium estrus menggunakan EN.

Electronic nose merupakan alat yang mengkombinasikan rangkaian sensor gas dan analisis pola untuk pendeteksian, identifikasi, atau kuantisasi senyawa volatil (Sitohang, 2012). Alat tersebut terdiri dari berbagai jenis *sensor array* yang berbeda-beda sangat responsif terhadap berbagai kemungkinan analitik dan memiliki sejumlah keunggulan dibanding dengan instrumen analitik klasik (Patel dan Kunpara, 2011).

Sesuai dengan prinsip kerja *electronic nose* yakni mengenali zat yang bersifat menguap, maka dalam penelitian ini dicobakan beberapa sensor antara lain metana, butana, propana, hidrogen sulfat, amonia, alkohol, SnO<sub>2</sub>, air kontaminan dalam berbagai panjang gelombang.

Hasil penelitian awal menunjukkan bahwa EN dapat digunakan sebagai alat untuk mendeteksi sapi yang estrus (Astuti *et al.*, 2015,

*tidak dipublikasikan*). Selanjutnya, dilakukan pengujian sensor melalui berbagai komponen kimiawi yang dapat terdeteksi melalui EN. Dengan terciptanya detektor estrus yang baru, diharapkan kondisi estrus pada hewan dapat diketahui dengan cepat dan tepat, sehingga kerugian akibat ketidaktepatan IB dapat dihindari. Detektor estrus juga dapat diaplikasikan bagi hewan dalam kepentingan konservasi, mengingat ketidaktepatan dalam penentuan estrus juga sangat mengganggu keberhasilan reproduksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan EN dalam melakukan pengukuran terhadap stadium estrus pada ternak.

## METODE PENELITIAN

Penelitian menggunakan sapi yang berada di Dusun Kuwang, Kecamatan Cangkringan, Sleman, Yogyakarta, sedangkan pengujian EN dilakukan di Laboratorium MIPA jurusan Fisika, Universitas Gadjah Mada.

Ternak yang digunakan dalam penelitian adalah sebanyak 10 ekor sapi PO dengan nilai rata-rata tiga pada *Body Condition Score* (BCS) dan berumur sekitar tiga tahun dengan bobot badan 300-350 kg, dengan siklus estrus normal. Kandang yang digunakan berupa kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan air minum yang terpisah. Pakan yang diberikan berupa hijauan dan konsentrat. Pemberian air minum diberikan *ad-libitum*.

Sebelum dilakukan sinkronisasi estrus, dilakukan eksplorasi rektal untuk menentukan sapi dalam fase luteal. Dengan demikian, sinkronisasi estrus hanya dilakukan pada sapi yang dalam kondisi fase luteal. Sinkronisasi dilakukan dengan injeksi Dinoprost tromethamine (Lutalyse™, Upjohn Pharmacia, Kalamazo, Michigan USA), suatu preparat prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) dengan dosis 25 mg/ekor secara intramuskuler. Selanjutnya dilakukan pengamatan estrus pada 24, 48, 72 dan 96 jam setelah penyuntikan.

Gejala estrus yang dapat diamati pada sapi-sapi betina meliputi perilaku menaiki dan diam saat dinaiki sesama sapi dara lainnya, sapi gelisah, nafsu makan turun, dan perubahan kondisi vulva meliputi; adanya mukosa vulva merah (3A: *abang, abuh, anget*), keluar leleran lendir jernih (Gambar 1), kental, menggantung dari vulva.

Pengambilan urine sebanyak 5 mL dilakukan dua kali yakni sesaat sebelum sinkronisasi estrus dan pada saat sapi estrus. Sampel urine diambil dalam waktu yang hampir sama dengan pengambilan darah. Selanjutnya sampel-sampel disimpan di dalam tabung mikro ditutup dan diberi selotip agar sampel tidak menguap. Tahap berikutnya membawa sampel ke Laboratorium MIPA Jurusan Fisika, Universitas Gadjah Mada untuk dilakukan pengukuran absorbansi sensor dengan EN.

Sampel yang telah diperoleh selanjutnya dipanaskan dengan suhu tertentu, selanjutnya dilakukan uji dengan menggunakan delapan macam sensor yakni: propana, metana, butana, hidroksi disulfida, air terkontaminasi. Absorbansi sensor ditunjukkan dengan adanya puncak di dalam grafik, sedangkan gambaran plateau menunjukkan bahwa sensor tidak dapat menyerap uap di dalam sampel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemeriksaan Fisik

Tanda-tanda fisik pada sapi estrus ternyata tidak dijumpai pada semua sapi. Dari 10 sapi dilakukan injeksi sinkronisasi estrus hanya enam ekor (60 %) yang menampakkan gejala estrus seperti *bengak-bengok* (gelisah dan bersuara keras), saling menaiki dan mengeluarkan leleran jernih (Gambar 1). Terdapat beberapa kemungkinan tidak terdeteksinya gejala estrus. Pertama, sapi memang tidak menampakkan gejala, gejala estrus terlewat, adanya pengaruh musim panas yang menjadikan gejala estrus tidak jelas (Du Ponte *et al.* (2007). Gordon (2003) dan Cunningham (2002), menyatakan bahwa salah satu efek estradiol adalah vaskularisasi pembuluh darah sehingga menimbulkan vulva berwarna merah. Leleran bening yang keluar digunakan sebagai sampel dalam pengukuran sensor. Menurut Noakes *et al.* (2001) faktor yang memengaruhi lama waktu estrus adalah jenis hewan, musim, keberadaan pejantan, dan individu.

### Pemeriksaan Sensor Menggunakan Sampel Urine

Sebelum dilakukan pengujian sampel urine dengan EN, dilakukan pembacaan sensor. Urine yang digunakan adalah sampel urine dari sapi yang sedang estrus. Sensor yang digunakan meliputi delapan macam yakni: C1 T95813: metana, propoana, butana; C2: T95822: uap jenuh pelarut organik; C3: T952600; sensitif terhadap hidrogen sulfida; C4: T95826: amonia; C5: T952611: metana; C6: T95620: alkohol; C7: T952612: metana propana butana; C8: T952602: air kontaminan.

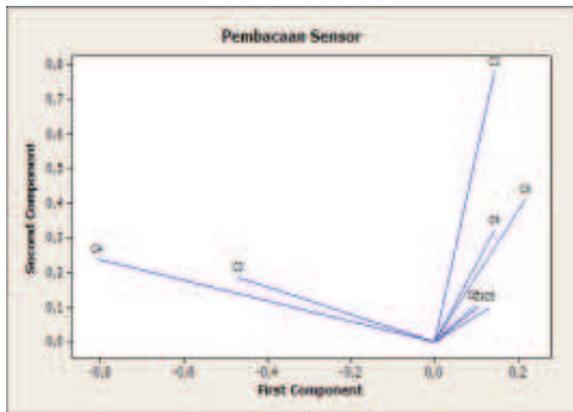
Hasi penelitian menunjukkan bahwa dari delapan sensor yang diuji, semua sensor dapat diserap. Meskipun demikian, C2 (uap jenuh pelarut organik), C3 (hidrogen sulfida), dan C4 (amonia) mempunyai puncak yang tinggi dan mempunyai sensitivitas yang tinggi terhadap sensor. Gambar 2 menunjukkan sapi estrus dalam EN menunjukkan terdapat dua gelombang yang mempunyai puncak yakni T95612 (C7) dan T95813 (C1). Titik puncak artinya penyerapan EN secara sempurna sedangkan titik merendah menunjukkan pengeluaran.

Mohammed (2009) melaporkan bahwa selain metana, propana, dan butana, detektor estrus juga dilakukan dengan menggunakan berbagai sensor metal oksida dan menurut Lane (1989) asetaldehida merupakan salah satu senyawa yang dapat dijadikan indikator estrus pada sapi. Wheeler *et al.* (2012) melaporkan bahwa pada hewan, sensor bau biasanya dideteksi melalui gugus aldehida, asam lemak volatil, nitrogen, dan sulfur. Asetaldehida yang digunakan dihasilkan melalui oksidasi butana atau nafta ringan, atau hidrasi dari etilena. Fischer *et al.* (2011) melaporkan bahwa selain dengan senyawa yang dapat menguap secara langsung, deteksi estrus pada sapi juga dapat dilakukan dengan menggunakan anjing yang telah dilatih untuk mengenali estrus. Dalam aktivitas tersebut, anjing dilatih dengan membedakan berbagai macam bau asal perineum. Selain dengan EN, deteksi estrus pada tikus juga dapat dilakukan dengan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) baik menggunakan sampel darah maupun urine (Sjahfirdi *et al.*, 2011a; Sjahfirdi *et al.*, 2011b).

Pada Gambar 3, disajikan bahwa sapi yang estrus mempunyai sensitivitas yang tinggi terhadap C1 dan C7 yakni metana, propana, dan butana, sedangkan pada sapi yang non-estrus

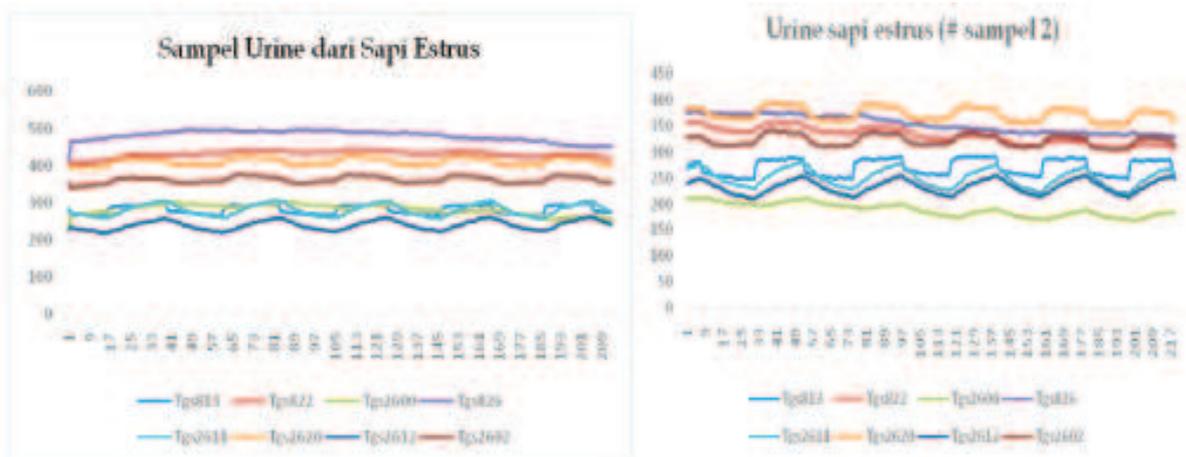


Gambar 1. Leleran bening dari vagina sapi yang berwarna jernih (tanda panah) yang menunjukkan adanya indikasi estrus. Vulva yang berwarna merah juga mengindikasikan estrus (kanan)

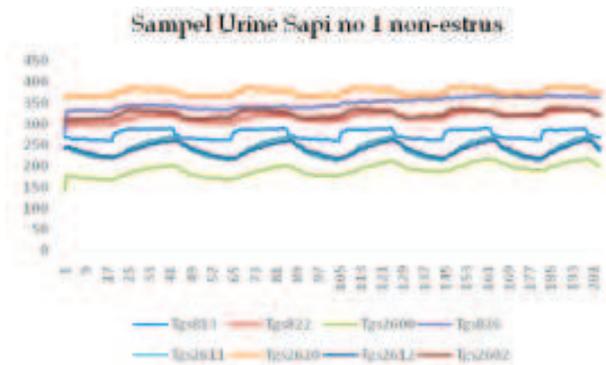


Gambar 2. *Loading Plot* pembacaan sensor pada berbagai senyawa

(Gambar 4 dan 5), selain menyerap C1 dan C7, urine juga mempunyai sensitivitas yang tinggi terhadap (C3) yakni hidrogen sulfat. Dengan demikian dapat dibuat suatu indikator bahwa pada sapi estrus puncak hidrogen disulfida tidak muncul, sedangkan pada sapi-sapi yang estrus sensitivitas sensor terhadap hidrogen disulfida tidak nampak. Hal ini berlawanan dengan pendapat Zahn *et al.* (1997) yang melaporkan bahwa hidrogen sulfida dan amoniak merupakan kemikal yang paling sering digunakan namun sayangnya tidak berkorelasi secara signifikan dengan bau pada ternak. Dijelaskan lebih lanjut bahwa bau pada ternak terdiri dari berbagai gas namun selalu dalam



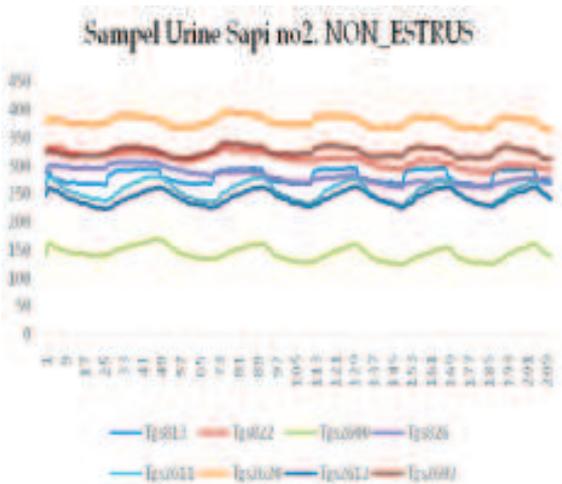
Gambar 3. Uji sensor urine sapi no 1 dan 2. Terlihat puncak pada T95813 (C1) dan T95612 (C7) yang mengindikasikan bahwa sampel sangat sensitif terhadap metana, propana, dan butana. Tanda panah menunjukkan adanya puncak, sedangkan garis dengan arah ganda menunjukkan tidak ada puncak



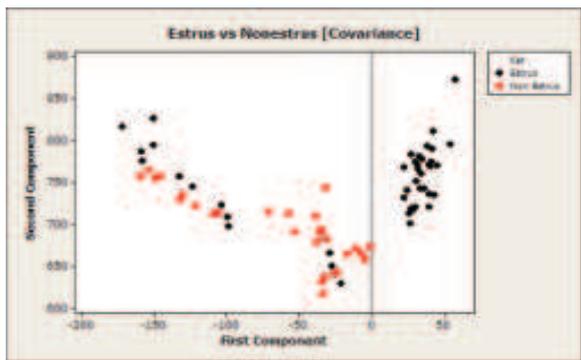
Gambar 4. Uji sensor urine sapi no 1 non\_estrus. Terlihat puncak pada T95813 (C1) dan T95612 (C7) dan T952600 (C3) yang mengindikasikan bahwa sampel sangat sensitif terhadap metana, propana, butana, dan hidrogen sulfat

konsentrasi yang rendah sehingga sangat susah diukur (Spoelstra, 1980; Misselbrook *et al.*, 1990; Jacobson *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 1997). Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh sensitivitas alat yang digunakan lebih tinggi sehingga konsentrasi yang sedikit masih dapat terdeteksi oleh EC.

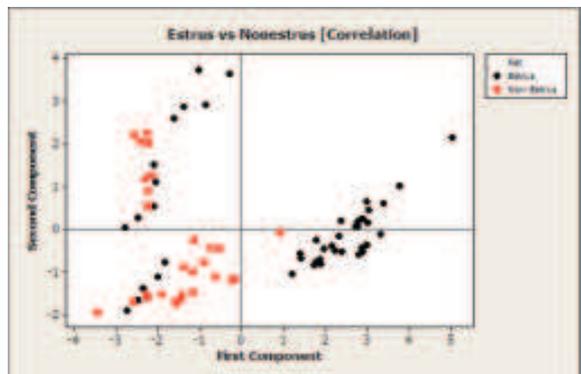
Apabila grafik tersebut dilanjutkan dengan mencari kovarians dan korelasi dengan olah data EN, maka diperoleh data bahwa daerah kanan menunjukkan daerah sapi estrus, sedangkan di bagian kiri didominasi oleh sapi-sapi yang non estrus (Gambar 6). Hasil korelasi data yang diperoleh disajikan pada Gambar 7.



Gambar 5. Uji sensor urine sapi no 2 dan 3 non\_estrus. Terlihat puncak pada T95813 (C1) dan T95612 (C7) dan T952600 (C3) yang mengindikasikan bahwa sampel sangat sensitif terhadap metana, propana, dan butana dan hidrogen sulfat



Gambar 6. Kovarians data urine sapi yang estrus dan non-estrus. Sebagian besar urine sapi estrus terletak di bagian kanan, sedangkan non-estrus sebagian besar terletak di bagian kiri.



Gambar 7. Korelasi data urine sapi yang estrus dan non-estrus. Sebagian besar urine sapi sapi estrus terletak di bagian kanan, sedangkan non-estrus sebagian besar terletak di bagian kiri.

Hasil tersebut mengindikasikan hasil yang konsisten yakni daerah bagian kanan didominasi oleh kondisi estrus, sedangkan bagian kiri adalah daerah yang mendominasi non-estrus.

Meskipun belum menghasilkan keseragaman 100 persen, namun dapat diprediksi bahwa EN, merupakan salah satu metode yang dapat diterapkan sebagai alat detektor estrus. Ketidakteraturan tersebut kemungkinan disebabkan oleh beberapa hal seperti: adanya variasi individu, sedikitnya jumlah sampel, dan tidak semua sapi menunjukkan gejala estrus secara nyata sehingga sangat memengaruhi periode dalam mengambil sampel. Cortesa *et al.* (2009) melaporkan bahwa keringat dapat digunakan sebagai indikator stres pada manusia.

Lebih jauh dilaporkan bahwa kondisi tersebut ditandai dengan adanya perbedaan *Principal Component Analysis* (PCA) dan laju *Probabilistic Neural Network* (PNN) sebesar 85%. Satu hal yang perlu diperhitungkan adalah adanya *time lag* yakni periode waktu antara produksi estradiol dalam darah sampai ke urine. Pada gajah afrika, *time lags* untuk estradiol dalam urine adalah empat jam, sedangkan untuk feses 48 jam (Wasser *et al.* 1996; Heistermann dan Hodges, 1995). Hanselman *et al.* (2003) melaporkan bahwa pada sapi, 58% estradiol diekskresikan pada feses dan 42% diekskresikan melalui urine. Ditambahkan pula bahwa 90% 17 $\alpha$ -estradiol dan E1 dilepaskan dalam bentuk bebas.

## SIMPULAN

Dapat disarikan bahwa tidak semua sapi yang disinkronisasi menunjukkan gejala estrus. Urine dari sapi estrus menunjukkan kadar sensitivitas terhadap sensor metana, propana dan butana, sedangkan pada sapi non-estrus, selain metana, propana dan butana sensitivitas pada sapi non-estrus juga menciri dengan adanya puncak sensitif terhadap hidrogen sulfida.

Analisis korelasi dan kovarians menunjukkan hasil yang konsisten yakni daerah sensor pada urine sapi estrus dan non-estrus dapat dibedakan dalam hal dominasi. Dengan demikian *electronic nose* sangat prospek digunakan sebagai alat detektor estrus pada sapi.

## SARAN

Perlu dilakukan pengujian dengan jumlah sampel yang lebih banyak terutama untuk memastikan puncak hidrogen disulfida sebagai indikator sapi non-estrus

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada para peternak sapi yang berada di Dusun Kuwang, Kecamatan Cangkringan, Sleman, dan Laboratorium Jurusan Fisika, FMIPA, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST. 2004. Applied animal reproduction. 6<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice Hall, Upper Saddle River. Hlm.: 44-45; 167-207.
- Cortésa G, Martíá J, Sayagoa I, Santosa J P, Gutiérrez J and Horrilloa M C 2009. Detection of stress through sweat analysis with an electronic nose. Proceeding of The 2009 Spanish Conference on Electric Devices. 11-13 February, Santiago
- Cunningham J. 2002. *Textbook of Veterinary Physiology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Sydney. WB Saunders Co.
- Du Ponte, Michael W. 2007. The Basics of Heat (Estrus) Detection in Cattle. *Livestock Management*. UH, CTAR: 1-3
- Fischer-Tenhagen C, Wetterhome R, Tenhagen BA, Heuwieser W. 2011. Dogs On A Scent Platform For Oestrus Detection In Cows. Vol. 131: (1-2): April, 63-70
- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. 2011. Oestrus cycles in Bos Taurus cattle. *J Anim Reprod Sci* 124: 163-169.
- Gordon I. 2003. *Laboratory Of Cattle Embryos*. 2<sup>th</sup> Edition. UK CABI Publishing.
- Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins. A Wolters Kluwer Co.

- Hanselman TA, Graetz DA, Wilkie AC. 2003. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review. *Environ Sci Tech* 37: 5471-5478.
- Heistermann M, Hodges JK. 1995. Endocrine monitoring of the ovarian cycle and pregnancy in the saddle-black tamarin (*Saguinus fuscicollis*) by measurement of steroid conjugates in urine. *Am J Primatol* 35: 117-127.
- Jacobson LD, Clanton CJD, Schmidt R, Radman C, Nicolai RE, Janni KA. 1997. Comparison of hydrogen sulfide and odor emissions from animal manure storages. In Proc. Intl. Symp. on Ammonia and Odour Control from Animal Production Facilities, 405-412. J.A.M. Voermans, and G. Monteny, eds. Vinkeloord, The Netherlands.
- Kune P, Solihati N. 2007. Tampilan birahi dan tingkat kesuburan sapi Bali Timor yang diinseminasi. *Jurnal Ilmu Ternak* 7(1): 1-5.
- Lane AJP, Wathes DC. 1989. An Electronic Nose to Detect Changes in Perineal Odors Associated with Estrus in the Cow. *J Dairy Sci* 81: 2145-2150
- Sjahfirdi L, Septian A, Maheshwari H, Astuti P, Suyatna FD, Nasikin M. 2011a. Determination of Estrous Period in Female Rats (*Rattus norvegicus*) by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy Through Identification of Reproductive Homrone in Blood Sampel. *WASJ* 14(4): 539-545
- Misselbrook THP, Hobbs J, Persaud KC. 1997. Use of an electronic nose to measure odor concentration following application of cattle slurry to grassland. *J Ag Eng Res* 66(3): 213-220.
- Mohamed EI, Maher HM, Shaban AM, Hussein FM. 2009. Electronic Nose Technology for the Accurate Detection of Estrus by Monitoring Changes in Perineal Odors in Dairy Cows. *J of Biophy and Biomed Sci* 2(1): 128-133
- Noakes DE, Timothy JP, Gary CWE. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8<sup>th</sup> Edition. England. WB Saunders..
- Patel, Kunpara. 2011. *Electronic Nose Sensor Response and Qualitative Review of E-Nose Sensor*. Ahmedabad. Institute of Technology Nirma University..
- Sitohang ME. 2012. Analisis Sinyal Electronic Nose Berbasis Wavelet Menggunakan Support Vector Machine untuk Identifikasi Jenis The Hitam. *Jurnal Sistem Komputer* 2 (2): 47-53.
- Sjahfirdi L, Aziz SN, Maheshwari H, Astuti P, Suyatna FD, Nasikin M. 2011b. Estrus Period Determination of Female Rats (*Rattus norvegicus*) by Fourier Transform Infrared (FTIR) through Identification of Reproductive Hormones Metabolites in Urine. *Internat. J of Basic & Appl Sci IJBAS-IJENS* 11(03): 158-163
- Spoelstra SF. 1980. Origin of objectionable odourous components in piggery wastes and the possibility of applying indicator components for studying odour development, 241-260. In Agriculture and Environment. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.
- Wasser SK, Papageorge S, Foley C, Brown JL. 1996. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. *Gen Comp Endocrinol* 102(2): 255-62.
- Wheeler EF, Hile M, Schmidt D. 2012. Odor Measurement for Animal Agriculture. *Air Quality*. December: 1-21
- Yan ZX, Gu H, Ni X. 2011. Hydrogen Sulfidi in the Endocrine and Reproductive System. *Expert Rev Clin Pharmacol* 4(1): 75-82.
- Zahn JA, Hatfield JL, Do YS, DiSpirito AA, Laird DA, Pfeiffer RL. 1997. Characterization of volatile organic emissions and wastes from a swine production facility. *J Env Quality* 26(6): 1687-1696.