

***Fourier Transform Infrared* Sebagai Metode Alternatif Penetapan Tingkat Stres pada Sapi**

(*FOURIER TRANSFORM INFRARED AS AN ALTERNATIVE TOOL
FOR DETERMINING OF STRESS IN COW*)

**Pudji Astuti¹, Claude Mona Airin¹, Slamet Widiyanto², Amelia Hana¹,
Hera Maheshwari³, Luthfirda Sjahfirdi⁴**

¹Bagian Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan,

²Bagian Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada,
Kampus UGM, Jln Fauna No 2 Yogyakarta

Email : pastuti@yahoo.com

³Lab Fisiologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, FKH, Institut Pertanian Bogor,
Kampus IPB Dramaga, Bogor

⁴Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam, Universitas
Indonesia, Kampus UI Depok, Jawa Barat

ABSTRAK

Stres merupakan suatu kondisi ketidaknyamanan non-spesifik yang mengakibatkan penurunan imunitas, kegagalan reproduksi, penurunan bobot karkas, sampai kepada kematian hewan. Untuk mengetahui kondisi stres pada sapi, akan dibuat suatu alat detektor stress secara non-invasif berdasarkan metode Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Prinsip kerja FTIR adalah mengenali komponen dalam suatu senyawa, maka FTIR diharapkan juga akan mengenali kelompok komponen pada katekolamin maupun kortisol seperti *keton* (=O) dan *methyl* (=CH₃). Setiap kelompok komponen dideteksi dalam panjang gelombang dan nilai absorbansi yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata kadar kortisol pada sapi betina sebelum dipotong adalah 38,48±21,53 ng/dL, pada saat dipotong 116,88±112,59 ng/dL, pada sapi jantan saat istirahat 20,42±9,25 ng/dL, saat dipotong 67,61±41,62 ng/dL. Berdasarkan pengukuran dengan metode FTIR, gugus metil merupakan komponen utama yang dapat diabsorpsi oleh FTIR. Sapi dalam kondisi stres dapat terkumpul pada panjang gelombang 2777-3456 nm sedangkan pada panjang gelombang lain menunjukkan sapi dalam kondisi tidak stres. Kadar kortisol pada sapi yang diistirahatkan dengan sapi yang sedang dipotong berbeda secara signifikan (P<0.05). Pada saat dipotong, kadar kortisol meningkat secara drastis. Hasil kalibrasi FTIR dapat membedakan dengan sangat jelas antara sapi yang diistirahatkan dengan sapi yang dipotong. Sapi yang sedang istirahat mempunyai nilai absorbansi yang lebih rendah dibandingkan sapi saat dipotong. Untuk itu, FTIR merupakan metode yang sangat mungkin dapat dijadikan rintisan dalam pembuatan alat detektor stres pada sapi.

Kata-kata kunci : kortisol, FTIR, stres, istirahat, ELISA

ABSTRACT

Stress in animal is a condition of nonspecific discomfort which cause of non-specific immune defects, failure of reproduction, and decreased of meat carcass until the death of animals. To determine stress of cattle, it will be invented stress detector using a non-invasive method based on the spectroscopy *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Basically, FTIR will detect component in compound of catecholamine and cortisol as ketone (= O) and methyl (= CH₃). Furthermore, each group of components will be detected in different of absorbant and wavelength. The results showed that average level of cortisol in female beef cattle during resting eriod was 38,48±21,53 ng/dL, on time of slaughtering were 116,88±112,59 ng/dL. For bull, which were resting 20,42±9,25 ng/dL; when animal was slaughtered level of cortisol was 67,61±41,62 ng/dL. Using FTIR, it was showed that compound of metil was absorbed well. Animals with udder stress condition have been recorded on the wave lenth of 2777-3456 nm. It has been concluded level of cortisol on cattle which were resting is significantly different from animal which were slaughtering P(< 0.05), where cortisol would increase drastically. Using Calibration of FTIR indicated resting animals only have fewer value of absorbance than animals which slaughtered. FTIR is a very prospect method for making stress indicator.

Key words : cortisol, FTIR, stress, resting period, ELISA

PENDAHULUAN

Stres merupakan suatu kondisi ketidaknyamanan non-spesifik yang mengakibatkan berbagai hal yang tidak menyenangkan antara lain : penurunan imunitas, kegagalan reproduksi, penurunan bobot karkas, hingga kepada kematian hewan. Secara ilmiah telah dinyatakan bahwa daging yang dikonsumsi hendaknya bukan berasal dari hewan yang stres. Bahkan dalam tinjauan Islam terdapat syarat tambahan yang harus dipenuhi yakni daging mesti bersifat *halalal toyibban* atau daging harus aman, sehat, utuh, dan halal / ASUH (Prodjodihardjo, 2002).

Selama ini, kondisi stres hewan diketahui dengan mengukur kadar kortisol baik dalam darah, saliva, feses maupun urine. Meskipun hasilnya akurat, namun pengukuran secara hormonal merupakan suatu cara yang dianggap mahal, dan kurang praktis. Penggunaan pada *kit* tertentu bahkan mempunyai batas waktu penggunaan sehingga pemeriksaan hewan stres tidak sering dilakukan. Oleh karena itu, perlu dikembangkan suatu alat detektor stres pada sapi secara non-invasif berdasarkan metode spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR).

Kortisol disekresikan oleh kelenjar adrenal bagian korteks berdasarkan alur kerja dari aksis hipotalamo-hipofisis-adrenal (aksis HPA) baik di dalam feses (Morrow *et al.*, 2002; Astuti *et al.*, 2010) dan urine (Palme *et al.*, 2002; Astuti *et al.*, 2006). Jika hewan stres, maka terjadi peningkatan kadar kortisol disertai peningkatan suhu tubuh (Schaltter *et al.*, 2002). Awalnya, stresor mengaktifkan sistem noradrenergik di otak (paling jelas di *locus ceruleus*) dan menyebabkan dilepaskannya katekolamin dari sistem saraf otonom. Stresor juga mengaktifkan sistem serotonergik di otak, seperti yang dibuktikan dengan meningkatnya pergantian serotonin. Stresor juga meningkatkan neurotransmisi dopaminergik pada aras mesofrontal. Neurotransmitter asam amino dan peptidergik juga terlibat di dalam respon stres (Sitoresmi, 2011).

Prinsip kerja FTIR adalah mengenali komponen dalam suatu senyawa, maka FTIR diharapkan juga akan mengenali kelompok komponen pada katekolamin maupun kortisol seperti *keton* (=O) dan *methyl* (=CH₃). Selanjutnya setiap kelompok komponen akan dideteksi pada panjang gelombang dan nilai absorbansi yang berbeda. Selama ini, FTIR telah diaplikasikan dalam

mengatasi berbagai macam penyakit antara lain deteksi tumor mammae (Dimitrova *et al.*, 2009); diagnosis batu empedu (Kleiner *et al.*, 2002) serta rintisan penentuan siklus estrus pada tikus (Luthfirda *et al.*, 2011 dan Sjahfirdi *et al.*, 2011).

Penelitian ini terbagi ke dalam empat tahap, namun aktivitas yang dikerjakan saat ini adalah merupakan studi pendahuluan. Dalam tahap awal, telah dilakukan pengukuran kortisol serum sapi sebagai indikator stres akut dengan menggunakan ELISA. Selanjutnya, dari sampel yang sama dilakukan konversi pengukuran dengan menggunakan metode FTIR. Hewan dalam kondisi stres akut diaplikasikan pada sapi saat dipotong; kondisi yang demikian diinterpretasikan sebagai hewan yang menderita stres akut. Luaran yang diharapkan dari penelitian pendahuluan ini adalah suatu konfirmasi bahwa metode FTIR dapat digunakan sebagai pembeda hewan yang stres dan hewan yang tidak stres.

Tujuan akhir penelitian ini adalah pembuatan alat pengukur stres pada sapi, sedangkan tujuan dalam penelitian ini adalah: 1). melakukan pengukuran kadar kortisol serum sapi saat istirahat dan pada saat sapi dipotong menggunakan teknik ELISA; 2). melakukan pengujian sampel serum yang sama dengan metode FTIR; 3). membuat kompilasi dan konversi antara kadar kortisol serum berdasarkan metode ELISA dan FTIR.

METODE PENELITIAN

Hewan Penelitian. Hewan yang digunakan dalam penelitian adalah tujuh ekor sapi peranakan ongole (PO) jantan dewasa dan 10 ekor sapi (PO) betina dewasa cacat fisik yang ada di Rumah Pemotongan Hewan (RPH), Yogyakarta.

Metode Penelitian. Pengambilan darah pada hewan penelitian dilakukan dua kali yakni pada saat sapi diistirahatkan, dan pada saat sapi dikorbankan (dipotong). Aplikasi pengambilan darah pada sapi yang diistirahatkan dilakukan melalui vena jugularis, sedangkan pengambilan darah untuk sapi yang dipotong dilakukan dengan cara menampung darah saat pemotongan. Selanjutnya, darah yang sudah tersedia, diambil serum dengan cara sebagai berikut: darah disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 3.000 rpm sampai terpisah menjadi dua bagian. Bagian supernatan

disimpan di dalam *freezer* pada suhu -70°C sampai saat dilakukan pengukuran kadar kortisol dengan ELISA maupun pengukuran dengan FTIR. Pengukuran FTIR dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), UGM, dan pengukuran kadar kortisol dilakukan di Laboratorium Fisiologi, FKH, UGM. Dengan metode FTIR, setiap kelompok komponen akan terdeteksi dalam panjang gelombang dan nilai absorbansi yang berbeda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

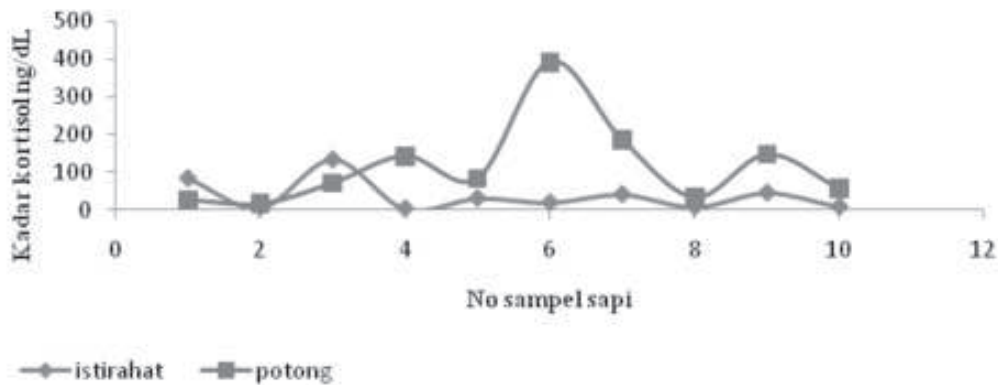
Kadar Kortisol Sapi yang Mengalami Stres

Sampel yang digunakan adalah serum darah sapi saat diistirahatkan dan saat dipotong. Kondisi saat dipotong menggambarkan sapi yang sedang dalam kondisi stres. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata kadar kortisol pada sapi betina saat dipotong adalah $116,88 \pm 112,59$ ng/dL, pada kondisi istirahat, kadar kortisol hanya mencapai $38,48 \pm 21,53$ ng/dL. Tingginya

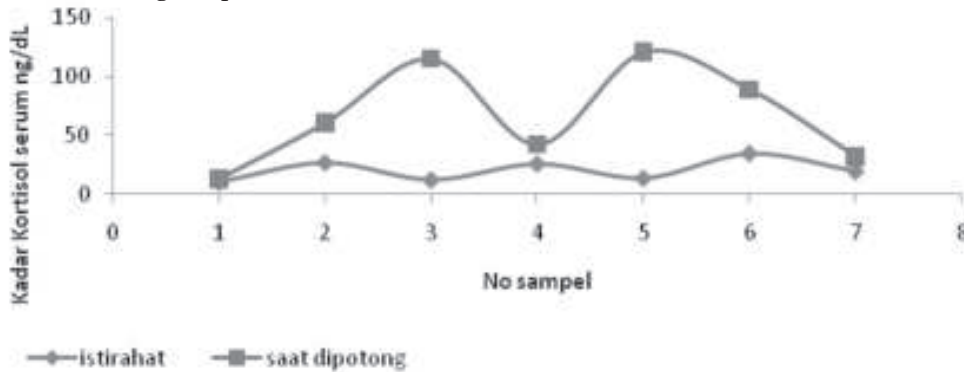
Tabel 1. Rataan kadar kortisol (ng/dL) pada kondisi stres dibandingkan dengan kondisi istirahat

Seks	Istirahat (ng/dL)	Saat dipotong (ng/dL)
betina	$38,48 \pm 21,53$	$116,88 \pm 112,59$
jantan	$20,42 \pm 9,25$	$67,61 \pm 41,62$

standar deviasi dalam penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan umur hewan mengingat data umur hewan tidak diketahui secara pasti. Terdapat perbedaan yang signifikan antara sapi yang sedang istirahat dibandingkan dengan saat dipotong ($P < 0,05$). Untuk sapi jantan, rata-rata kadar kortisol pada saat dipotong $67,61 \pm 41,62$ ng/dL, sedangkan pada saat istirahat sebesar $20,42 \pm 9,25$ ng/dL. Berdasarkan uji *t-student*, berhasil ditunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara sapi yang istirahat dengan sapi yang dipotong ($P < 0,05$) (Tabel 1, Gambar 1, dan Gambar 2).



Gambar 1. Perbandingan kadar kortisol (ng/dL) serum sapi betina pada saat istirahat dan pada saat dipotong. Kadar kortisol pada sapi saat dipotong meningkat 3 kali lipat lebih dibandingkan pada saat istirahat



Gambar 2. Perbandingan kadar kortisol (ng/dL) serum sapi jantan pada saat istirahat dan pada saat dipotong. Dalam gambar nampak bahwa kadar kortisol pada sapi saat dipotong jauh lebih tinggi dibandingkan saat istirahat

Kortisol merupakan salah satu hormon yang sampai saat ini digunakan sebagai indikator stres pada makhluk hidup. Ketika hewan sedang mengalami stres, maka hipotalamus melepaskan *corticotropin-releasing factor* (CRF) ke dalam darah. Polipeptida yang terkandung di dalamnya, memicu sekresi hormon adrenokortikotropik (ACTH) dari kelenjar pituitari anterior, sampai akhirnya terjadi pelepasan kortisol di dalam peredaran darah (Marcel *et al.*, 2009; Wittow *et al.*, 2000). Dalam penelitian ini, kadar kortisol pada saat sapi dipotong juga menunjukkan peningkatan yang drastis yakni lebih dari tiga kali lipat dibandingkan sapi yang diistirahatkan. Hal ini menunjukkan bahwa hewan-hewan tersebut memang dalam kondisi yang sangat stres.

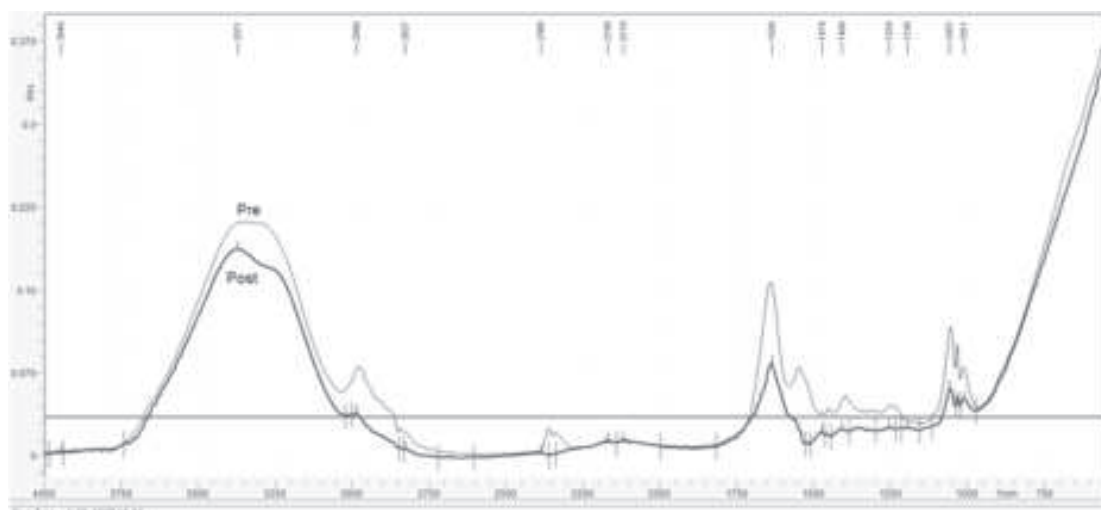
Data berikutnya menunjukkan bahwa kadar kortisol pada hewan betina lebih tinggi dibandingkan dengan hewan jantan. Doornenbal *et al.*, (1988) melaporkan bahwa kadar kortisol pada sapi jantan berbeda sesuai dengan umur dan fungsi masing-masing hewan. Pada pejantan muda, kadar kortisol berkisar antara $67,5 \pm 38,4$ ng/dL, sedangkan sapi-sapi yang digemukan adalah $106,3 \pm 38,1$ ng/dL. Dalam penelitian ini, kadar kortisol sapi jantan hanya berkisar antara $20,42 \pm 9,25$ ng/dL. Hal yang demikian ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan ras sapi, jenis kelamin, juga karena fungsi sapi. Diperkirakan sapi yang digemukan mempunyai tingkat metabolisme yang lebih tinggi dibandingkan sapi dewasa lain. Thompson *et al.*, (2006) melaporkan bahwa salah satu fungsi kortisol adalah untuk metabolisme baik karbohidrat, lemak maupun

protein. Perbedaan kadar kortisol pada jantan dan betina juga dijumpai pada jenis primata *Pan paniscus*, namun perbedaan tersebut terkadang berkaitan dengan kehidupan sosial. Kadar kortisol pejantan dominan meningkat secara drastis bila berdekatan dengan betina yang sedang berahi/estrus (Surbeck *et al.*, 2012). Pada tikus betina, kadar kortisol meningkat secara drastis ketika sedang mengalami stres akut (Maeng *et al.*, 2010). Dengan demikian sangatlah wajar jika dalam penelitian ini kadar sapi betina meningkat secara drastis pada saat sapi dipotong, suatu kondisi stres akut yakni dari $38,48 \pm 21,53$ ng/dL menjadi $116,88 \pm 112,59$ ng/dL.

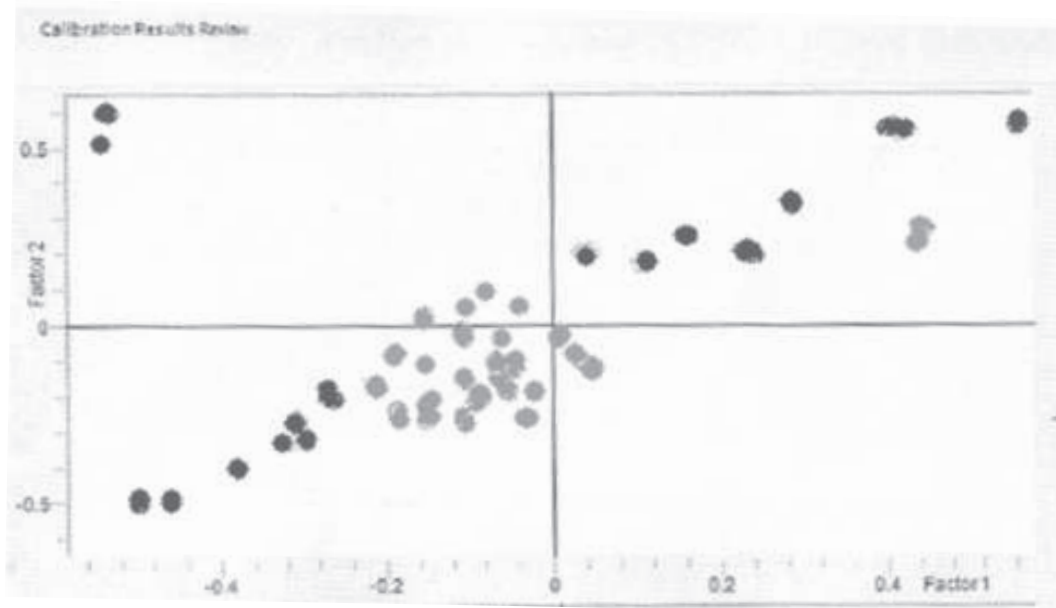
Tingkat Absorbansi FTIR pada Sapi yang Menderita Stres

Fourier Transform Infrared (FTIR) adalah instrumen universal yang telah digunakan untuk menganalisis sampel organik / anorganik. Keuntungan menggunakan FTIR adalah akurat, aman, cepat, dan sensitif (Smith 1979; Rintoul *et al.*, 1998). Berdasarkan prinsip kerjanya FTIR dapat mengenali gugus fungsional secara spesifik dalam suatu komponen. Khusus pada kortisol, FTIR dapat mengenali gugus komponen metil (CH_3) (Gambar 3). Setiap gugus fungsional dapat tercatat dalam panjang gelombang tertentu. Dalam penelitian ini, gugus metil (CH_3) tercatat dalam panjang gelombang antara 2777-3456 nm.

Hasil kalibrasi menunjukkan bahwa pada sapi yang stres, terkumpul pada suatu daerah tertentu yakni daerah dengan kecenderungan yang berlawanan dengan sapi istirahat yang



Gambar 3. Hasil FTIR serum sapi pada saat istirahat (pre) dan serum sapi pada saat dipotong (post). Puncak menunjukkan adanya gugus metil (CH_3)



Gambar 4. Hasil kalibrasi data menunjukkan bahwa tanda merah menunjukkan sapi pada saat istirahat, sedangkan warna hijau menunjukkan bahwa hewan dalam kondisi stres. Dalam gambar nampak jelas bahwa sapi dalam kondisi stres terkumpul pada area tertentu

mempunyai nilai absorbansi yang rendah dibandingkan sapi yang sedang dipotong (Gambar 3 dan Gambar 4). Berdasarkan rumus bangun, kortisol mengandung gugus CH_3 (Litwack dan Schmidt, 2002). Dijelaskan lebih lanjut bahwa dalam kondisi stres, kadar kortisol meningkat. Dengan demikian sangat wajar jika sapi yang sedang istirahat mempunyai nilai absorbansi yang lebih rendah.

Sjahfirdi (2006) melaporkan bahwa kadar progesterone serum pada owa jawa dapat digunakan sebagai indikator penentuan siklus reproduksi. Sementara itu Luthfiralda *et al.*, (2011) melaporkan pada tikus bahwa hasil FTIR progesteron untuk gugus keton, metil, dan metilketon tercatat masing-masing memiliki panjang gelombang 1724 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , dan 1354 cm^{-1} . Kadar progesteron tikus dalam kondisi estrus dan non-estrus adalah $17,593 \pm 4,246\text{ ng/dL}$ dan $76,218 \pm 4,687\text{ ng/dL}$. Pada urin, Sjahfirdi *et al.*, (2011) juga melaporkan bahwa *Pregnanediol 3-glucoronide* (PDG) diidentifikasi oleh puncak 1639 cm^{-1} aldehida, 2783 cm^{-1} asam karboksil, dan 2877 cm^{-1} alkil. Sementara itu *estron* konjugasi (E1C) diidentifikasi oleh puncak dari 1639 aldehida, 416 cm^{-1} alkil, 709 cm^{-1} aromatik, dan 3468 cm^{-1} hidroksil. Dari hasil penelitian pada tikus dan dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa FTIR dapat digunakan sebagai rintisan awal pembuatan alat detektor stres pada sapi. Meskipun demikian, aplikasi dengan sampel urin perlu

dilakukan mengingat pemeriksaan dengan urin akan jauh lebih mudah dibandingkan serum.

SIMPULAN

Kadar kortisol pada sapi yang diistirahatkan dengan sapi yang sedang dipotong sangat berbeda. Pada saat dipotong, kadar kortisol meningkat secara drastis. Komparasi antara kortisol dan FTIR menunjukkan bahwa ada kecenderungan sapi yang istirahat mempunyai nilai absorbansi yang lebih rendah dibandingkan saat dipotong dan hasil kalibrasi FTIR menunjukkan ada perbedaan yang sangat jelas antara sapi yang stres dan yang tidak. Dengan demikian FTIR merupakan metode yang sangat mungkin dapat dijadikan suatu rintisan dalam pembuatan alat detektor stres pada sapi

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, dengan menggunakan sampel urin. Pengambilan sampel urin merupakan aplikasi metode non-invasif sehingga diharapkan akan memberikan hasil dengan validitas yang tinggi dan sangat mudah diperoleh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menghaturkan terima kasih kepada drh Aladria, drh Supriyanto beserta seluruh staf Rumah Pematangan Hewan Giwangan Yogyakarta atas izin penggunaan sapi dan segala bantuan teknik di lapangan. Demikian pula untuk asisten Lab Fisiologi FKH UGM yang telah membantu pelaksanaan di Lapangan, atas bantuan dan dedikasinya kami ucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti P, Widayati DT, Sunendar, Suharto K, Kusumawati A, Junaidi A. 2008. Diurnal Patterns of Cortisol in Crossbreds Ettawa Does with special emphasis on Body Condition Scoring (BCS). *Intl. Proc. Th 15 th FAVA Congress, Bangkok, Thailand*. Pp 031-032
- Astuti P, Sarmin, Kusumawati A, Airin CM, Maheshwari H, Sjahfirdi L. 2010. Physiological Response of Bligon Buck to Transportation: Relation to Level of Thyroid Hormone. *J Veteriner* 11 (2) : 87-92
- Astuti P, Sarmin, Asmarani K, Airin CM, Maheshwari H, Sjahfirdi L. 2009 Comparison level of cortisol and ratio of neutrophil/lymphocytes as acute stress marker to long road transportation of Bligon bucks. *Intl Seminar on Zoonotic and Tropical Disease. Program Book P 143-144*
- Astuti WD, Sutardi T, Evvyernie D., Toharmat T. 2006. Penggunaan Kromium Organik dari Beberapa Jenis Fungi terhadap Aktivitas Fermentasi Rumen secara *In Vitro*. *Media Peternakan* 29 : 121-132.
- Dimitrova M, Ivanova D, Karamancheva I, Milev A, Dobrev I. 2009. Application of FTIR Spectroscopy for Diagnosis of Breast Cancer Tumors. *J of Chemical Technol and Metallurgy* 22(3) : 297-300.
- Doornenbal H, Tong AK, Murray NL. 1988. Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. *Can J Vet Res* 52(1): 99
- Kannan G, Terill TH, Kouakou B, Gazal OS, Gelaye S, Amoah EA, Samake S. 2000. Transportation of goats: effects on physiological stress responses and live weight loss. *J Anim Sci* 78 :1450-1457.
- Kleiner O, Ramesh J, Huleihel M, Cohen B, Kantarovich K, Levi C, Polyak B, Marks RS, Mordechai J, Cohen Z, Mordechai S. 2002. A Comparative Study of Gallsyones from Children and Adults Using FTIR Spectroscopy and Fluorescence Microscopy. *BMC Gastroenterol* 2(3) : 1-14.
- Litwack, Schmidt TJ. 2002. Biochemistry of Hormone II: Steroid Hormone in: *Textbook of Biochemistry and Clinical Correlations*, 5th ed. John Wiley and Sons. Pp: 959-989
- Sjahfirdi L, Septian A, Maheswari H, Astuti P, Suyatna FD, Nasikin M. 2011. Determination of Estrous Period in Female Rats (*Rattus norvegicus*) by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy Through Identification of Reproductive Hormone in Blood Sampel. *WASJ* 14(4) : 539-545
- Maeng LY, Waddell J, Shors TJ. 2010. The Prefrontal Cortex Communicates with the Amygdala to Impair Learning after Acute Stress in Females but Not in Males. *The Journal of Neuroscience* 30(48) : 16188 – 16196
- Marcel M-P, Luis RM, Rogelio RE. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4(2) : 158-178
- Morrow D, Rondinelli D. 2002. Adopting Corporate Environmental Management Systems: Motivations and Results of ISO 14001 and EMAS certification. *European Management Journal* 201 : 59-171.
- Palmer MA, Zedler JB, Falk DA. 2002. Ecological theory and restoration ecology. Ecological Society of America, ESA 2002 Annual Meeting Abstracts.
- Penaloza C, Estevez B, Orlanski S, Sikorska M, Walker R, Smith C, Smith B, Lockshin RA, Zakeri Z. 2009. Sex of the cell dictates its response: differential gene expression and sensitivity to cell death inducing stress in male and female cells. *FASEB J* 23 : 1869–1879
- Prodjodiharjo S. 2002. *Pengelolaan Daging*. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian.
- Rintoul L, Panayiotou H, Kokot S, George G, Cash G, Frost R, Bui T, Fredericks P. 1998. Fourier Transform Infrared Spectrometry: A Versatile Teechnique for Real World Samples. *Analyst* 123 : 571-577.
- Schaltter H, Langer T, Rosmus S, Onneken M, Fasold H. 2002. A novel func-tion for the 90kDa heat-shock protein (Hsp90):

- facilitating nuclear export of 60S ribosomal subunits. *Biochem J* 362 : 675–684.
- Sitoesmi D. 2011. Perubahan Anatomi dan Fisiologi pada Kehamilan. *Journal Royal Collage of Obstetricians and Gynaecologists* 9 : 21-26
- Sjahfirdi L. 2006. Assessment of Reproductive Biology in Captive Housed Female Javan Gibbon (*Hylobates moloch Audebert 1797*): With Special Emphasize on Ovarian Cycle Determination and Daily Activity Observation. *Disertasi*. Depok : Universitas Indonesia.
- Sjahfirdi L, Aziz SN, Maheshwari H, Astuti P, Suyatna FD, Nasikin M. 2011. Estrus Period Determination of Female Rats (*Rattus norvegicus*) by Fourier Transform Infrared (FTIR) through Identification of Reproductive Hormones Metabolites in Urine. *International Journal of Basic & Applied Sciences* 11 (03) : 158-163
- Smith AL. 1979. *Applied Infrared Spectroscopy : Fundamental, Techniques and Analytical Problem Solving*. Canada. John Wiley and Sons Inc. P: 322.
- Steward M, Webster JR, Schaefer AL, Cook NJ, Scott. 2005. Infrared Thermography as a non-invasive tool to study animal Welfare. *Anim Welfare* 14 : 319-325
- Surbeck M, Deschner T, Weltring A, Hohmann G. 2012. Social correlates of variation in urinary cortisol in wild male bonobos (*Pan paniscus*). *Horm and Behave* 62 : 27-35
- Thompson G, Shurgot DA, Robinson G, Kenneth R, Heather L, McKibbin C L, Kraemer L, Sandra E, Thompson L. 2006. Ethnicity, stress, and cortisol function in Hispanic and non-Hispanic white women: A preliminary study of family dementia caregivers and noncaregivers. *Am J of Ger Psy* 14 (4) : 334-342
- Wittow CG. 2000. *Avian Physiology*. 5th. Ed. New York. Academic Press. Pp. 500-522.