

Evaluasi Konsentrasi Hormon Progesteron Pada Lobster (*Panulirus versicolor*) Dengan Ukuran Berbeda Menggunakan Metode Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Evaluation of Progesterone Hormone Concentration of Lobster (*Panulirus versicolor*) with Different Sizes Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Jolen Matakupan^{1*}, Jacqueline M. F. Sahetapy¹, Daniel G. Louhenapessy¹, Absalom Luturmas¹, Elizabeth M. Palinussa¹

¹Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Pattimura, Ambon, Maluku 97233, Indonesia

*Corresponding author: lenda_hokky@gmail.com

(Received 1 Maret 2024; Accepted 5 Mei 2024)

Abstrak

Kontrol pematangan gonad dan pemijahan merupakan masalah utama dalam pengembangan budidaya udang dan juga lobster. Teknologi reproduksi dalam pembenihan jenis krustasea ini belum mengalami perkembangan yang signifikan. Progesteron merupakan prekursor estrogen pada vertebrata, yang juga ditemukan pada krustacea dan avertebrata lainnya. Beberapa hormon reproduksi krustasea telah dikarakterisasi, identitas dan fungsi hormon reproduksi lainnya masih dalam penelitian. Dalam analisis hormon, penggunaan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) terus berkembang, baik untuk tujuan penelitian maupun aplikasi klinis. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi konsentrasi hormon progesteron pada lobster *panulirus versicolor* pada ukuran berbeda dengan kisaran bobot tubuh 300-750gr yang merupakan hasil tangkapan di alam menggunakan metode ELISA. Hormon progesteron diukur pada organ ovarium, hepatopankreas dan hemolimf. Penelitian ini menggunakan metode analisis deskriptif. Dari penggunaan metode ELISA diperoleh hasil uji paralelisme menunjukkan bahwa kurva sampel uji sejajar dengan kurva standar. Uji absorbansi dan pemulihan nilai standar diperoleh konsentrasi hormon progesteron pada lobster *Panulirus versicolor* yang terukur dapat diterima karena memiliki presentasi nilai rata-rata pemulihan nilai standar 98%. Dari hasil pengujian presisi dari Kit ELISA yang digunakan menunjukkan bahwa Preskripsi pengujian baik dan dapat diterima berdasarkan persentase variasi koefisien (%CV) dari QC1 dan QC 2 (<15%). Nilai konsentrasi hormon progesteron pada lobster *P. versicolor* menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi terhadap ukuran tubuh dimana pada lobster dengan bobot tubuh 650-750gr diperoleh konsentrasi hormon progesteron pada hepatopankreas, ovarium dan hemolimf yaitu 1,059 ng/ml, 0,357 ng/ml dan 0,042 ng/ml sedangkan pada bobot tubuh yang lebih rendah yaitu 300-350 gr konsentrasi hormon progesteron yakni 0,753 ng/ml, 0,181 ng/ml, 0,010 ng/ml.

Kata kunci : ELISA, Lobster, *Panulirus versicolor*

Abstract

Control of gonad maturation and spawning is a major problem in the development of shrimp and lobster cultivation. Reproductive technology in hatching this type of crustacean has not experienced significant development. Progesterone is a precursor of estrogen in vertebrates, which is also found in crustaceans and other invertebrates. While several crustacean reproductive hormones have been characterized, the identity and function of other reproductive hormones are still under investigation. In hormone analysis, the use of the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method continues to grow, both for research purposes and clinical applications. This study aims to evaluate the concentration of the hormone progesterone in *Panulirus versicolor* lobsters of different sizes with a body weight range of 300-750g which are caught in the wild using the ELISA method. The hormone progesterone is measured in the ovaries, hepatopankreas and hemolymph. This research uses descriptive analysis methods. From using the ELISA method, the results of the parallelism test showed that the test sample curve was parallel to the standard curve. Absorbance and standard value recovery tests showed that the measured



concentrations of the progesterone hormone in *Panulirus versicolor* lobsters were acceptable because they had an average recovery value of 98%. The precision testing results of the ELISA kit used show that the test prescription is good and acceptable based on the percentage of coefficient variation (%CV) from QC1 and QC 2 (<15%). The concentration value of the progesterone hormone in *P. versicolor* lobsters shows that there is a difference in concentration depending on body size, where in lobsters with a body weight of 650-750g, the concentration of the progesterone hormone in the hepatopancreas, ovaries and hemolin is 1.059 ng/ml, 0.357 ng/ml and 0.042 ng/ml. while at lower body weights, namely 300-350 grams, the concentration of the hormone progesterone is 0.753 ng/ml, 0.181 ng/ml, 0.010 ng/ml.

Keywords : Lobster, *Panulirus versicolor*, ELISA

PENDAHULUAN

Proses reproduksi berkaitan dengan mekanisme sistem hormonal, yaitu hubungan antara hormon-hormon hipotalamus hipofisa yakni *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH), *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH), hormon-hormon ovarium (estrogen dan progesteron), dan hormon uterus (*prostaglandin*) (Hafez dan Hafez, 2000). Hormon ovarium yang mempunyai peranan besar terhadap reproduksi adalah estrogen dan progesteron. Regulasi reproduksi pada krustasea sangat beragam (Chang dan Sagi, 2008) dan diketahui dikendalikan terutama oleh neuropeptida eyestalk, amina biogenik, hormon perangsang gonad, metil farnesoat, ekdisteroid, dan steroid jenis vertebrata. Cukup besar perluasan telah terjadi dalam reproduksi krustasea sehubungan terhadap pendekatan molekuler hormon endokrin dan faktor lainnya (Adiyodi, 1985; Reddy & Rammamurthi, 1999; Tsukimura B, 2001; Wilder et al, 2002) Di *hatchery*, teknik ablasi umumnya digunakan untuk menginduksi reproduksi pada induk krustasea. Metode ini dapat menyebabkan produksi benih berkualitas rendah dan sering menyebabkan kematian pada induk lobster. Untuk mengatasi masalah ini, beberapa kelompok peneliti bekerja dalam berbagai arah untuk menginduksi reproduksi yang sukses terutama pada regulasi vitellogenin pada krustasea di seluruh dunia. Salah satu cara terbaik untuk menginduksi reproduksi yang sukses di krustasea tanpa merusak stok induk dan dengan kualitas tinggi produksi benih adalah manipulasi endokrin pada tingkat molekuler (Swetha et al., 2011).

Manipulasi lingkungan merupakan cara yang efektif dan murah dalam merangsang sekresi hormon untuk mempercepat kematangan gonad, tetapi karakter spesifik dari sinyal-sinyal lingkungan untuk merangsang perkembangan gonad dan pemijahan, tidak diketahui secara pasti. Pada beberapa studi reproduksi udang putih telah diketahui bahwa fotoperiodisitas dan temperatur berpengaruh terhadap kecepatan perkembangan gonad tetapi hasilnya belum cukup optimal. Alternatif lain yang diduga cukup efektif dalam mempercepat perkembangan gonad adalah dengan rangsangan hormonal.

Kontrol pematangan gonad dan pemijahan merupakan masalah utama dalam pengembangan budidaya udang dan juga lobster. Teknologi reproduksi dalam pembenihan jenis krustasea ini belum mengalami perkembangan yang signifikan. Mekanisme dan peranan hormon pada reproduksi belum banyak diketahui. Pada umumnya untuk mempercepat kematangan gonad induk udang digunakan teknik ablasi. Teknik rangsangan hormonal dengan memberikan hormon steroid telah banyak dilakukan pada ikan dan terbukti cukup efektif.

Menurut Partodiharjo (1992), progesteron adalah nama umum untuk grup steroid yang terdiri dari 21 atom karbon. Progesteron merupakan salah satu hormon penting yang berhubungan dengan reproduksi yang disekresikan oleh sel-sel luteal korpus luteum (Hafez dan Hafez, 2000). Progesteron merupakan prekursor estrogen pada vertebrata, yang juga ditemukan pada Crustacea dan invertebrata lainnya. beberapa hormon reproduksi krustasea telah dikarakterisasi, identitas dan fungsi hormon reproduksi lainnya masih dalam penelitian (Suwansaard *et al.*, 2015; Christie, 2016a, 2016b; Christie *et al.*, 2017).

Dalam analisis hormon, penggunaan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay/ELISA* terus berkembang, baik untuk tujuan penelitian maupun aplikasi klinis. Teknik ELISA cepat menjadi populer karena keunggulannya. Karena tidak membutuhkan isotop, teknik ELISA lebih mudah dilakukan di negara berkembang dibandingkan dengan RIA. Secara singkat, metode ELISA adalah sistem enzyme immunoassay kompetitif yang mirip dengan metode *radio immunoassay* (RIA). Ini digunakan untuk mengidentifikasi hormon dalam cairan tubuh. Immune assay mengukur analit (seperti antibodi dan hormon) dalam bahan biologis (seperti darah, urin, dan faeses). Jenis yang paling umum dari prosedur *immunoassay* adalah *competitive binding assay* (Heistermann *et al.*, 1993), ini adalah metode yang tepat dan sensitif untuk memperkirakan hingga ke satuan ng/mL sampai pg/mL dalam larutan, seperti serum, urin, semen, dan kultur supernatan (Savige, 1998). Metode ELISA merupakan metode imunologi dengan memanfaatkan enzim sebagai konjugat, sehingga metode ini lebih aman dan banyak digunakan untuk pengukuran hormon kortisol saat ini (Gholib *et al.*, 2020b). Hal ini karena metode ELISA tidak menggunakan bahan radioaktif, hanya memerlukan alat fotometri untuk deteksi aktivitas enzim, mudah dikerjakan, relatif murah, dan memiliki sensitivitas yang baik (Kinn Rød *et al.*, 2017). Kontrol hormonal reproduksi telah dipelajari di banyak spesies krustasea, termasuk lobster air tawar, udang, kepiting, lobster dan lain-lain. Meskipun banyak spesies dekapoda memiliki nilai ekonomi yang signifikan dari disfungsi yang terlihat pada induk yang ditangkarkan tetap menjadi hambatan utama dalam akuakultur krustasea. Sejumlah hormon dari organ *neuroendokrin* memainkan peran penting dalam mengendalikan pematangan gonad (Chang *et al.*, 2001; Fingerman, 1997a; Laufer *et al.*, 1993a; Mazurová *et al.*, 2008; Nagaraju, 2007; Raviv *et al.*, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi konsentrasi hormon progesteron pada lobster *Panulirus versicolor* pada ukuran berbeda yang merupakan hasil tangkapan di alam menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

METODE PENELITIAN

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan di balai perikanan dan budidaya laut Ambon sebagai lokasi pemeliharaan lobster. Untuk analisis kandungan hormon progesteron dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Aceh.

Pengumpulan hewan uji

Sampel lobster yang digunakan diperoleh dari nelayan pengumpul dari pulau osi kabupaten seram bagian barat. Lobster yang kumpulkan berbeda ukuran 300 gr -750 gr.

Pemeliharaan lobster

Pemeliharaan induk Induk yang telah diberi perlakuan dan kontrol dipelihara dalam bak fiber berukuran 3.5x2x1 meter. Air pemeliharaan berasal dari laut yang telah di filter menggunakan sandfilter dengan



salinitas 32-33 ppt dan temperatur 28°C. Air mengalir kontinyu didalam bak ditambahkan aerasi agar oksigen terlarut tetap optimal. Untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dalam perkembangan gonad

Ekstraksi sampel

Pengambilan serum hemolim dilakukan dengan menggunakan syringe 3ml. sampel hemolim diambil pada kaki jalan ke tiga. Setelah diambil dimasukan kedalam tabung ependrof yang telah diberi antikoagulan asam sitrat. Sambil yang diambil kemudian disentrifus. Setelah serum dipisahkan dari supernatan kemudian disimpan dalam lemari pendingin sebelum dikirim ke Laboratorium untuk dianalisis.

Analisis konsentrasi hormon

Uji Paralelisme. Pengujian ini dilakukan untuk mencari jumlah atau perbandingan pengenceran yang tepat pada saat akan menganalisis sampel, biasanya dilakukan terhadap sampel hewan yang baru dan belum diketahui perbandingan pengencerannya. Pengenceran sampel dikatakan bagus jika pengenceran tersebut tidak terlalu tinggi dan tidak terlalu rendah, jadi berada dipertengahan. Perbandingan pengenceran ini didapat dengan melihat kurva, yaitu antara kurva standar dengan kurva sampel yang diuji, biasanya dilakukan beberapa perbandingan pengenceran. Apabila kurva sampel yang diuji sejajar (paralel) dengan kurva standar berarti konsentrasi sampel selalu turun dua kali lipat dimulai dari pengenceran terendah sampai tertinggi dan tentunya hasil pengujian ini dapat diterima sehingga pengenceran dapat dihitung dan pengujian hormon dapat dilanjutkan ke tahap berikutnya, tetapi apabila terjadi sebaliknya maka pengujian tidak dapat dilanjutkan.

Sensitivitas Kit ELISA. Nilai sensitivitas yang dihasilkan merupakan konsentrasi rata-rata respons *blank* (B0) dan untuk menentukan nilai pada maksimum *binding* 90% atau 95%.

Presisi Kit ELISA. Presisi merupakan suatu kemampuan asai untuk secara konsisten mereproduksi hasil (nilai) yang diambil dari sampel yang sama. Presisi intra-asai dan inter- asai adalah dua ukuran yang berbeda yang dapat dibuat sebagai bagian dari prosedur validasi. Rumus yang digunakan untuk perhitungan persentase koefisien variasi (% CV) sedikit berbeda dengan rumus konvensional (standar deviasi dibagi dengan rata-rata dan dikalikan dengan 100). Nilai presisi berdasarkan pada ukuran dari kesalahan acak sebagai variasi antara pengukuran ulangan dari sampel yang ditetapkan, dinyatakan sebagai koefisien variasi (%CV) dan nilai yang diperoleh berasal dari perhitungan standar deviasi/rata-rata x 100.

Pengukuran konsentrasi Hormon Progesteron

Pengukuran konsentrasi progesteron dilakukan menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Adapun prosedur pelaksanaannya sebagai berikut :

Semua reagen harus dibiarkan pada suhu kamar (18-25°C) sebelum digunakan. Selanjutnya, dipersiapkan terlebih dahulu larutan standar dengan konsentrasi 0,3;0,625;1,25;5;10; 20 dan 40 ng/ml dan larutan QC (*quality control*). Adapun prosedur pengerjaan ELISA adalah sebagai berikut:

1. Dimasukkan ke dalam masing-masing sumur pelat (*microplate*) sebanyak 25 µl standar, sampel dan QC (*quality control*).
2. Inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar
3. Ditambahkan 200 µl konjugat enzim HRP Progesteron (*Enzym Conjugate*) ke dalam setiap sumur, kemudian dikocok perlahan selama kurang lebih 10 detik.
4. Inkubasi pada suhu kamar selama 60 menit.

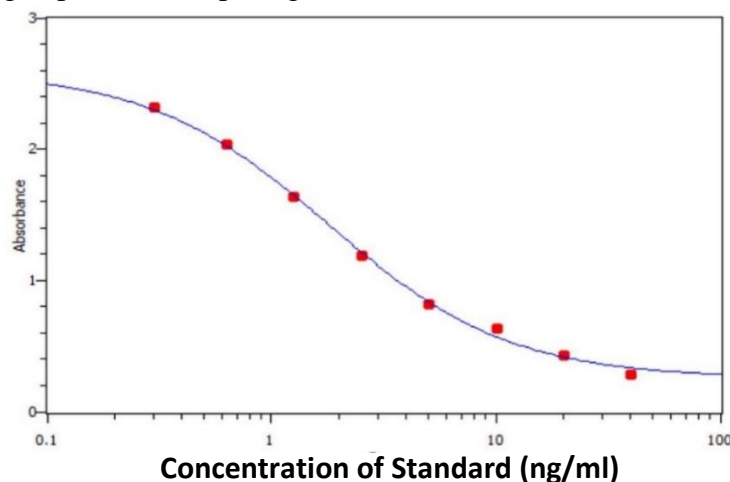
5. Setelah diinkubasi,larutan pada pelat dibuang dan dicuci dengan larutan pencuci (*washing solution*) dengan volume 300 µl setiap sumur. Pencucian dilakukan sebanyak 4 kali menggunakan alat *Microplate Strip Washer*. Setelah pencucian selesai, dikeringkan dengan cara dibanting secara perlahan pada kertas penyerap.
6. Ditambahkan 200 µl larutan substrat (*TBM Substrate*) pada masing-masing sumur pelat.
7. Inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang.
8. Setelah inkubasi dengan larutan substrat, reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 100µl larutan penyetop (*Stop Solution*, H₂SO₄ 0,5 M) ke dalam setiap sumur pelat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

A. Kurva standard konsentrasi progesteron

Hasil evaluasi konsentrasi hormon progesteron melalui uji Pararelisme yang ditunjukkan pada gambar 1. Saat akan menganalisis sampel, uji paralelisme juga dapat digunakan untuk mengukur perbandingan pengenceran yang tepat. Hal ini sangat penting untuk kit ELISA yang baru, yang belum pernah digunakan untuk menganalisis hormon spesies tertentu. Proses uji ini sangat penting untuk mengetahui pengenceran sampel yang tepat digunakan untuk menganalisis dan menghasilkan nilai konsentrasi hormon yang sesuai dengan batas nilai yang dapat diterima pada garis linier kurva hormon standar.



Gambar 1. Hasil evaluasi konsentrasi hormon progesteron melalui uji Pararelisme

Kisaran konsentrasi standar dimodifikasi untuk meningkatkan sensitivitas pengujian dan meningkatkan rentang linier kurva standar. Kisaran asli konsentrasi standar adalah 0.3; 1.25;2.5; 5.0; 15 and 40 ng/ml, sedangkan konsentrasi modifikasi adalah 0,3; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10; 20 dan 40 ng / ml. Lee (2009) menyatakan bahwa paralelisme adalah pengujian linieritas pengenceran sampel otentik. Tujuannya adalah untuk menunjukkan bahwa analit endogen dalam sampel yang tidak diketahui, yang mungkin berbeda dan/atau berbeda dari standar, menunjukkan hasil yang sama terlepas dari pengenceran standar.

B. Absorbansi dan pemulihan nilai standard

Pada tahapan pengujian dengan metode ELISA dilakukan juga pengukuran konsentrasi hormon yang diharapkan dan tertulis pada manual kit elisa yang digunakan nilai tersebut kemudian akan dibandingkan dengan nilai konsnstrasi hormon progreserron yang terukur dari pengukuran di laboratorium (Tabel 1).

Tabel 1. Nilai Absorbansi dan Pemulihan Nilai Standar

Standard	Kon. Diinginkan (ng/ml)	Kon. Terukur (ng/ml)	Recovery (%)
1	0.3	0.29	96.7
2	0.625	0.61	97.6
3	1.25	1.28	102.4
4	2.5	2.62	104.8
5	5	5.13	102.6
6	10	8.08	80.8
7	20	19.7	98.5
8	40	42.54	106.4
Rata-rata (%)			98.7

Dari hasil pengukuran tersebut diketahui bahwa konsentrasi hormon progesteron pada lobster *Panulirus versicolor* yang terukur dapat diterima karena memiliki presentasi nilai rata-rata pemulihan nilai standar 98%.

C. Presisi Kit ELISA

Presisi mengacu pada pengulangan nilai yang diukur atau konsistensi hasil (Brown *et al.*, 2005). Dari hasil pengujian presisi Kit ELISA seperti yang ditunjukkan pada tabel 2. menunjukkan bahwa Presisi pengujian baik dan dapat diterima berdasarkan persentase variasi koefisien (%CV) dari QC1 dan QC 2 (<15%).

Tabel 2. Hasil Uji Presisi Kit ELISA

Plate	QC 1 (ng/ml)	QC 2 (ng/ml)
	1.25	10.81
1	1.31	11.72
Mean	1.28	11.27
CV (%)	3.31	5.71

ket: - CV= Coefficient variation, QC = Quality control of standard

Nilai konsentrasi hormon progesteron pada lobster *P. versicolor* menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi pada ukuran tubuh berbeda.

Tabel 3. Konsentrasi Hormon Progesteron pada lobster *P. versicolor*

No.	Ukuran Bobot (gr)	Organ	Konsentrasi progesteron (ng/ml)
1	300-350	Hepatopankreas	0.753
		Ovari	0.181
		Hemolim	0.010
2	450-500	Hepatopankreas	0.604
		Ovari	0.203
		Hemolim	0.051
3	550-600	Hepatopankreas	1.061
		Ovari	0.234

No.	Ukuran Bobot (gr)	Organ	Konsentrasi progesteron (ng/ml)
4	650-750	Hemolim	0.014
		Hepatopankreas	1.059
		Ovari	0.357
		Hemolim	0.042

Pembahasan

Uji paralelisme yang dilakukan pada kit ELISA menunjukkan bahwa kurva sampel sejajar dengan kurva standar. Uji paralelisme adalah uji kemampuan di mana kit ELISA menentukan kemampuan (dalam kisaran tertentu) dengan hasil yang sebanding dengan konsentrasi (jumlah) analit sampel (Ederveen, 2010). Selain itu, pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah kit ELISA yang digunakan dapat mendeteksi kehadiran hormon tertentu yang diketahui. Untuk menghasilkan perbandingan pengenceran, kurva dilihat untuk membandingkan antara kurva sampel yang diuji dan kurva standar; ini biasanya dilakukan setelah beberapa perbandingan pengenceran, yaitu lima perbandingan bertingkat. Kurva sampel yang diuji sejajar atau paralel dengan kurva standar, yang menunjukkan bahwa hormon assay yang digunakan dapat mendeteksi keberadaan hormon yang akan dianalisis. Fazielawanie *et al.* (2011) menemukan bahwa garis kurva sampel pada plasma ikan kakap betina (*Lates calcarifer*) yang disuntik dengan estradiol dan vitellogenin sejajar dengan kurva standar. Untuk hormon yang sama, uji paralelisme pada sampel yang berbeda dapat menunjukkan hasil yang berbeda, bahkan pada spesies yang sama.

Menurut Botus *et al.*, (2009) presisi merupakan kemampuan untuk melanjutkan analisis dan dapat dinyatakan sebagai *repeatability* dan *reproducibility*. Sensitivitas adalah kemampuan untuk mendeteksi sejumlah kecil antigen (Brown *et al.*, 2005). Sensitivitas merupakan konsentrasi terendah dari antigen yang dapat dibedakan secara statistik, dan bertujuan untuk menentukan nilai dua simpangan baku (2 SD) dari respons rata-rata *blank* (B0) dan menentukan nilai maksimum *binding* 90% atau 95% (Brown *et al.*, 2005). Kehadiran hormon steroid pada vertebrata (*estradiol*, *testosteron*, *pregnenolon*, dan *progesteron*) telah terdeteksi pada beberapa spesies krustasea Subramoniam (2011) dan fluktuasi korelatif konsentrasinya dalam hemolim, hepatopankreas, dan ovarium dengan reproduksi siklus telah mempengaruhi fungsi pengaturan dalam reproduksi pada vertebrata (Subramoniam, 2000; Warier *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2009). Merlin *et al.*, (2015), menyatakan bahwa tingginya konsentrasi hormon pada hemolim dipengaruhi juga oleh hormon *vitellogenin inhibiting hormon* (VIH) yang ikut mempengaruhi fungsi sintesis hormon reproduksi

KESIMPULAN

Penggunaan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk menguji konsentrasi hormon progesteron pada lobster *Panulirus versicolor* menunjukkan hasil yang baik pada setiap tahapan pengujian metode ini. Nilai konsentrasi hormon progesteron pada lobster *P. versicolor* menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi pada ukuran tubuh berbeda dimana pada lobster dengan bobot tubuh 650-750gr diperoleh konsentrasi hormon progesteron pada hepatopankreas, ovarium dan hemolim yaitu 1,059 ng/ml, 0,357 ng/ml dan 0,042 ng/ml sedangkan pada bobot tubuh yang lebih rendah yaitu 300-350 gr konsentrasi hormon progesteron yakni 0,753 ng/ml, 0,181 ng/ml, 0,010 ng/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiyodi, R. G. (1985). Reproduction and its control. *The biology of Crustacea*, 9, 147-215.
- Bowen, R. A., Hortin, G. L., Csako, G., Otañez, O. H., & Remaley, A. T. (2010). Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clinical biochemistry*, 43(1-2), 4-25.
- Chang, E. S., & Sagi, A. (2008). Male reproductive hormones. In *Reproductive biology of crustaceans* (pp. 299-317). CRC Press.
- Ederveen, J. (2010). A practical approach to biological assay validation. *Hoofddorp: Progress*, 106(1).
- Fazielawanie, N. M. R., Siraj, S. S., Harmin, S. A., Ina-Salwany, M. Y., & Nik-Daud, N. S. (2011). Development and validation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) vitellogenin in *Lates calcarifer*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 6(7), 715-727.
- Gholib, G., Wahyuni, S., Akmal, M., Hasan, M., Agil, M., & Purwantara, B. (2020). The validation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay and the effect of freeze-thaw cycles of serum on the stability of cortisol and testosterone concentrations in Aceh cattle. *F1000Research*, 8, 1220.
- Huang, H., Ye, H., Han, S., & Wang, G. (2009). Profiles of gonadotropins and steroid hormone-like substances in the hemolymph of mud crab *Scylla paramamosain* during the reproduction cycle. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 42(4), 297-305.
- Kinn Rød, A. M., Harkestad, N., Jellestad, F. K., & Murison, R. (2017). Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum. *Scientific reports*, 7(1), 6748.
- Lee, J. W. (2009). Method validation and application of protein biomarkers: basic similarities and differences from biotherapeutics. *Bioanalysis*, 1(8), 1461-1474.
- Merlin, J., Mohanlal, D. L., Balasubramanian, C. P., Sherly, T., Subramoniam, T., Syamadayal, J., ... & Vijayan, K. K. (2015). Induction of vitellogenesis and reproductive maturation in tiger shrimp, *Penaeus monodon* by 17 β -estradiol and 17 α -hydroxyprogesterone: in vivo and in vitro studies. *Invertebrate Reproduction & Development*, 59(3), 166-175.
- Reddy, P. S., & Ramamurthi, R. (1999). Recent trends in crustacean endocrine research. *PROCEEDINGS-INDIAN NATIONAL SCIENCE ACADEMY PART B*, 65, 15-32.
- Subramoniam, T. (2000). Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 125(2), 135-156.
- Subramoniam, T. (2011). Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. *Fisheries Science*, 77, 1-21.
- Swetha, C. H., Sainath, S. B., Reddy, P. R., & Reddy, P. S. (2011). Reproductive endocrinology of female crustaceans: perspective and prospective. *Journal of Marine Science Research and Development S*, 3, 1-13.
- Tsukimura, B. (2001). Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoologist*, 41(3), 465-476.
- Warrier, S. R., Tirumalai, R., & Subramoniam, T. (2001). Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 β and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 130(2), 283-294.
- Wilder, M. N., Subramoniam, T., & Aida, K. (2002). Yolk proteins of crustacea in: Raikhel AS, Sappington TW (Eds.) *Reproductive Biology of Invertebrates*. Vo I XII, Part A: Progress in Vitellogenesis. Science Publishers, Inc., Plymouth, UK. Pp: 131-173.