

Soraya Rahmanisa

Steroid Sex Hormone And It's Implementation to Reproductive Function

Soraya Rahmanisa

Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, University of Lampung,
Indonesia

Abstract

The synthesise of steroid sex hormone were produced primary by gonad and conducted by two kinds of gonadotrophic hormone which produce by adenohipofisis. Follicle-stimulating hormone (FSH) dan luteinizing hormone (LH) that come from hypofisis bring good influence to the ovarium and testes. FSH primary has the responsibility on the growth of germinal cell both on the gonads (testes and ovarium) and the synthesise of estrogen from ovarium. LH and hCG stimulate the synthesise of androgen sex steroid in testis and ovarium, and the production of progesterone by corpus luteum. LH, FSH, and hCG don't have any important clinical activity besides the tractus reproductivus. [JuKeUnila 2014;4(7):97-105]

Kata kunci: FSH, steroid sex hormone, LH, prolactine

Pendahuluan

Steroid seks dianggap sebagai satu-satunya pengatur produksi hormon gonadotropin. Akhir-akhir ini, peptida gonad mempunyai sifat pengatur penting sekresi FSH. Inhibin dan follistatin menekan pelepasan FSH, dan aktivin merangsang pelepasan FSH.

Sintesis dan fungsi hormon reproduksi berbeda, tetapi saling berhubungan dan mempengaruhi. Berikut akan dibahas sintesis dan fungsi dari masing-masing hormon reproduksi ini.

1. Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), Follicle Stimulating Hormone dan Luteinizing Hormone (LH)

Hipotalamus mengeluarkan GnRH dengan proses sekresinya setiap 90-120 menit melalui aliran portal hipotalamohipofisial. Setelah sampai di hipofise anterior, GnRH akan mengikat sel gonadotrop dan merangsang pengeluaran FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*)⁽¹⁾.

Waktu paruh LH kurang lebih 30 menit sedangkan FSH sekitar 3 jam. FSH dan LH berikatan dengan reseptor yang terdapat pada ovarium dan testis, serta mempengaruhi fungsi gonad dengan berperan dalam produksi hormon seks steroid dan gametogenesis .

Pada wanita selama masa ovulasi GnRH akan merangsang LH untuk menstimulus produksi estrogen dan progesteron. Peranan LH pada siklus pertengahan (*midcycle*) adalah ovulasi dan merangsang korpus luteum untuk menghasilkan progesteron. FSH berperan akan merangsang perbesaran folikel ovarium dan bersama-sama LH akan merangsang sekresi estrogen dan ovarium .

Selama siklus menstruasi yang normal, konsentrat FSH dan LH akan mulai meningkat pada hari-hari pertama. Kadar FSH akan lebih cepat meningkan dibandingkan LH dan akan mencapai puncak pada fase folikular, tetapi akan menurun sampai kadar yang terendah pada fase preovulasi karena

pengaruh peningkatan kadar estrogen lalu akan meningkat kembali pada fase ovulasi. Regulasi LH selama siklus menstruasi, kadarnya akan meninggi di fase folikular dengan puncaknya pada midcycle, bertahan selama 1-3 hari, dan menurun pada fase luteal .

Sekresi LH dan FSH dikontrol oleh GnRH yang merupakan pusat kontrol untuk basal gonadotropin, masa ovulasi dan onset pubertas pada masing-masing individu. Proses sekresi basal gonadotropin ini dipengaruhi oleh beberapa macam proses:

a. Episode sekresi (*Episodic secretadon*)

Pada pria dan wanita, proses sekresi LH dan FSH bersifat periodik, dimana terjadinya secara bertahap dan pengeluarannya dikontrol oleh GnRH .⁽²⁾

b. Umpan balik positif (*Positive feedback*)

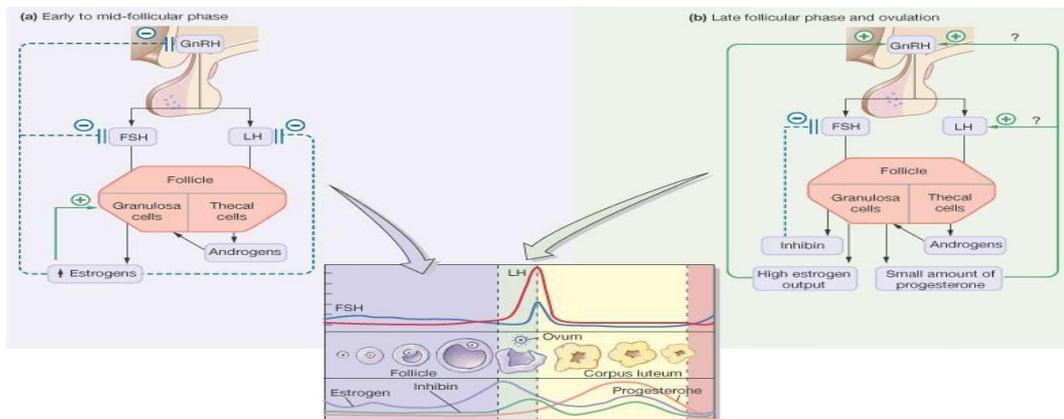
Pada wanita selama siklus menstruasi estrogen memberikan umpan balik positif pada kadar GnRH untuk mensekresi LH dan FSH dan peningkatan kadar estrogen selama fase folikular merupakan stimulus dari LH dan FSH setelah pertengahan siklus, sehingga ovum menjadi matang dan terjadi ovulasi. Ovulasi terjadi hari ke 10-12 pada siklus ovulasi setelah puncak kadar LH dan 24-36 jam setelah

puncakestradiol. Setelah hari ke-14 korpus luteurn akan mengalami involusi karena disebabkan oleh penurunan estradiol dan progesteron sehingga terjadi proses menstruasi⁽²⁾

c. Umpan balik negatif (*Negative Feedback*)

Proses umpanbalik ini memberi dampak pada sekresi gonadotropin. Pada wanita terjadinya kegagalan pnbentukan gonad primer dan proses menopause disebabkan karena peningkatan kadar LH dan FSH yang dapat ditekan oleh terapi estrogen dalam jangka waktu yang lama.

Tujuan pemeriksaan FSH dan LH adalah untuk melihat fungsi sekresi hormon yang dikeluarkan oleh hipotalamus dan mekanisme fisiologis umpan balik dari organ target yaitu testis dan ovarium⁽³⁾ Kadar FSH akan meningkat pada hipogonadism, pubertas prekoks, menopause, kegagalan diferensiasi testis, orchitis, seminoma, acromegall, sidroma Turner. Serta menurun pada keadaan insufisiensi hipotalamus, disfungsi gonad, anovulasi, insufisiensi hipofise, dan tumor ovarium. Faktor yang mempengaruhi kadarnya adalah obat-obatan seperti steroid, kontrasepsi oral, progesteron, estrogen, dan testoteron



Gambar 1. Umpan balik positif dan negatif dalam pengaturan sekresi hormonal sistem HPO

Harga normal LH dan FSH bervariasi tergantung dari usia, jenis kelamin dan siklus ovulasi pada pasien wanita. Kadarnya akan rendah sebelum pubertas dan jika sesudahnya akan meningkat⁽⁴⁾.

Berikut harga normal kadar hormon FSH dan LH pada pria dan wanita berdasarkan usia dan keadaan.

Tabel 1. Nilai normal kadar FSH

FSH	
ng/L	
Wanita	
< 8 thn	0,6-0,8
8 - 12 thn	1,2-2,4
12 - 14 thn	1,7-2,8
14 - 18 thn	2,2-3,0
Dewasa	
<i>Midcycle</i>	2,6-24
kehamilan	Tak terdeteksi
Premenopause	1,1-5,3
Pasca menopause	11,0-66

(Disadur dari Greenspan dan Strewler, 1997)⁽⁵⁾

2. Hormon Seks Steroid

Hormon steroid disintesis dari kolesterol yang berasal dari sintesis asetat, dari kolesterol ester pada jaringan steroidogenik, dan sumber makanan. Sekitar 80% kolesterol digunakan untuk sintesis hormon seks steroid.

Pada wanita, ovum yang matang akan mensintesis dan mensekresi hormon steroid aktif. Ovarium yang normal merupakan sumber utama dari pembentukan Pada wanita menopause dan kelainan ovarium estrogen dihasilkan dari prekursor androgen pada jaringan lain. Selain itu ovarium juga memproduksi progesteron selama fase luteal pada siklus menstruasi, testosteron dan androgen dalam jumlah sedikit. Korteks adrenal juga memproduksi

hormon testosteron dan androgen dalam jumlah yang sedikit yang digunakan bukan hanya untuk prekursor estrogen tetapi langsung dikeluarkan ke jaringan perifer.

2.1 Estrogen

Estrogen terdiri dari tiga jenis hormon yang berbeda, yaitu estron, estradiol, dan estriol. Pada wanita normal, estrogen banyak diproduksi oleh folikel selama proses ovulasi dan korpus luteum selama kehamilan⁽⁶⁾

Pada saat keluar dari sirkulasi, hormon steroid berikatan dengan protein plasma. Estradiol berikatan dengan transpor globulin yang dikenal dengan *sex hormone binding globulin* (SHBG) dan berikatan lemah dengan albumin, sedangkan estrone berikatan kuat dengan albumin. Sirkulasi estradiol secara cepat diubah menjadi estron di hepar dengan bantuan 17 - hidrosisteroid dehidrogenase. Sebagian estrone masuk ke sirkulasi, dan sebagian lagi dimetabolisme menjadi - hidroksiestrone yang dikonversi menjadi estriol.

Pada awal siklus ovulasi - produksi estradiol akan menurun sampai titik terendah, tetapi karena pengaruh hormon FSH estradiol akan mulai meningkat. Sebelum fase mid cycle kadar estradiol dibawah 50 pg/mL, tetapi akan terus meningkat sejalan dengan pematangan ovum. Estradiol akan mencapai puncaknya sebesar 250-500 pg/mL pada hari ke 13-15 siklus ovulasi. Pada fase luteal, kadar estrogen akan menurun sampai 125 pg/mL. Progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum bersarna-sarna dengan estrogen akan memberikan umpanbalik negatif pada hipotalamus dan hipofise anterior. Kadar dibawah 30 pg/mL menunjukkan keadaan oligomenore atau amenore sebagai indikasi kegagalan gonad. Hormon estradiol

dipengaruhi oleh ritme sirkadian yaitu adanya variasi diurnal pada wanita pasca menopause yang diperkirakan. karena adanya variasi pada kelenjar adrenal⁽²⁾

Hormon estrogen yang dapat diperiksa yaitu estrone (E1), estradiol (E2), dan estriol (E3). Pemeriksaan estradiol dipakai, untuk mengetahui aksis hipotalamus-hipofise-gonad (ovarium dan testis), penentuan waktu ovulasi, menopause dan monitoring pengobatan fertilitas. Waktu pengambilan sampel untuk pemeriksaan estradiol adalah pada fase folikular (preovulasi) dan fase luteal^(3,4,7).

Kadar estrogen meningkat pada keadaan ovulasi, kehamilan, pubertas prekoks, ginekomastia, atrofi testis, tumor ovarium., dan tumor adrenal. Kadarnya akan menurun pada keadaan menopause, disfungsi ovarium, infertilitas, sindroma turner, amenorea akibat hipopituitari, anoreksia nervosa, keadaan stres, dan sindroma testikular feminis pada wanita. Faktor intervensi yang meningkatkan estrogen adalah preparat estrogen, kontrasepsi oral, dan kehamilan. Serta yang menurunkan kadarnya yaitu obat clomiphene⁽⁴⁾

Tabel 2. Harga normal hormon estrogen pada wanita

Hormon	Jenis kelamin	Unit konvensional
Estradiol	Wanita	(pg/mL)
	< 8 thn	< 7
	8 - 12 thn	8- 18
	12 - 14 thn	16- 34
	14 – 16 thn	20- 68
	Fase folikular	20- 100
	Preovulasi	100- 350
	Luteal	100- 350
	Pasca menopause	10 - 30
Estriol	Kehamilan	(ng/mL)
	30 - 32 mgg	2 - 12
	33 - 35 mgg	3 - 19
	36 - 38 mgg	5 - 27
	39 - 40 mgg	10 - 30
	Tdk hamil	<2
Estrone	Wanita	(ng/mL)
	Fase folikular	30 - 100
	Ovulasi	>150
	Luteal	90 - 150
	Pascamenopause	20 - 40

(Disadur dari Greenspan dan Strewler, 1997)⁽⁵⁾

2.2 Progesteron

Progesteron bersama-sama dengan estrogen memegang peranan penting di dalam regulasi seks hormon wanita. Pada wanita, pregnenolon diubah menjadi progesteron atau 17a-

hidroksipregnenolone dan perubahan ini tergantung dari fase ovulasi dimana progesteron disekresi oleh korpus luteum dalam jumlah yang besar. Progesteron juga merupakan prekursor untuk testoteron dan estrogen, pada saat terjadi

metabolisme 17α -hidroksiprogesteron menjadi dehidroepiandrosteron yang dikonversi menjadi 4 androstenedion dengan bantuan enzim 17α hidroksilase pregnenolon .

Pada awal menstruasi dan fase folikular kadar progesteron sekitar 1 ng/mL. Pada saat sekresi LH, konsentrasi progesteron dapat bertahan selama $4-5$ hari di dalam plasma dan mencapai puncaknya yaitu sebesar $10-20$ ng/mL selama fase luteal. Pengukuran progesteron di dalam plasma dapat digunakan untuk memonitor keadaan ovulasi. Jika konsentrasi progesteron lebih dari $4-5$ ng/mL mungkin sudah terjadi ovulasi .

Progesteron berperan di dalam organ reproduksi termasuk kelenjar *mamae* dan endometrium serta meningkatkan suhu tubuh manusia. Organ target progesteron yang lain adalah uterus, dimana progesteron membantu implantasi ovum. Selama kehamilan progesteron mempertahankan plasenta, menghambat kontraktilitas uterus dan mempersiapkan *mamae* untuk proses laktasi⁽⁸⁾

Pada umumnya pemeriksaan kadar progesteron dilakukan untuk pemeriksaan fungsi plasenta selama kehamilan, fungsi ovarium pada fase luteal, dan monitoring proses ovulasi. Pada pemeriksaan ini sampel diambil satu sampai dua kali pada fase luteal⁽⁷⁾

Kadarnya meningkat pada kehamilan, ovulasi, kista ovarium, tumor adrenal, tumor ovarium, mola hidatidosa. Dan menurun pada keadaan amonorea, aborsi mengancarn, dan kematian janin. Faktor yang mempengaruhi pemeriksaan hormon progesteron adalah penggunaan steroid, progesteron, dan kontrasepsi oral⁽⁴⁾

Tabel 3. Harga normal hormon progesteron wanita

Hornion Jenis kelamin Unit konvensional	
Progesteron Wanita	(ng/mL)
Fase folikular	0.3 - 0,8
Fase luteal	4 - 20

(Disadur dari Greenspan dan Strewler, 1997)⁽⁵⁾

2. 3 Testoteron (Androgen)

Testoteron atau androgen merupakan hormon seks steroid yang dominan pada pria. Hormon ini mempunyai berat molekul $288,41$ Dalton. Proses sintesis testoteron berlangsung di sel Leydig interstitial pada testis yang memberikan respon pada *interstitial cell stimulating hormone (ICSH)*, atau yang lebih dikenal dengan *luteinizing hormone*. Pada pria sebagian dihidrotestoteron dibentuk di jaringan perifer.⁽¹⁾

Di dalam aliran darah testoteron terikat oleh protein serum dan sebagian tidak terikat (*unbound*). Sebanyak 60% testoteron terikat kuat dengan *binding* protein utama yaitu SHGB dan sekitar 38% terikat lemah dengan albumin dan *corlisol binding globulin*. Sekitar 2% sirkulasi testoteron tidak terikat oleh proteinserum tetapi masuk ke dalam set.^(1,9)

Testoteron diubah menjadi dihidrotestoteron di dalam target jaringan testoteron yang spesifik. Metabolisme testoteron terjadi di hepar. Testoteron dikonversi menjadi androstenedion dan etiokolanolon. Testoteron masuk ke dalam membran sel dengan cepat dan di dalam sel testoteron berubah secara enzimatik menjadi androgen dihidrotestoteron dengan bantuan isoenzim microsomal reduktase-2, dan isoenzim 5 -reduktase-1.⁽¹⁾

Konsentrasi testoteron mulai meningkat sebelum pematangan ksisa hipotalamus-hipofise-gonad yaltu pada awal usia 6-7 tahun, meningkat selama pubertas, dan mencapai puncaknya pada usia dewasa ⁽¹⁾

Berikut tabel harga normal testoteron:

Tabel 4. Harga normal hormon testoteron pada pria dan wanita

Hormon	Jenis kelamin	Unit konvensional
Testoteron	Wanita	(ng/dL)
	Prepubertas	5-13
	Pubertas	9-24
	Dewasa	30-70
	Pria	
	Prepubertas	8-14
Pubertas	84-180	
Dewasa	300-1000	

(Disadur dari Greenspan dan Strewler, 1997) ⁽⁵⁾

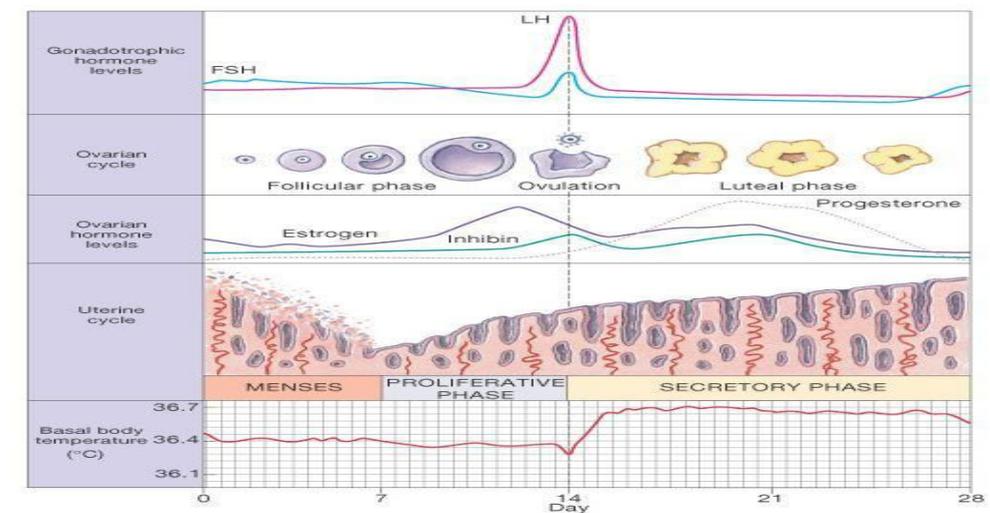
Pada pria, testoteron memegang peranan penting dalam diferensiasi system organ yang genital pria pada saat pertumbuhan fetus, pertumbuhan dan fungsi organ yang dipengeruhi oleh testoteron

seperti skrotum, epididimis, vas deferens, vesika seminalis, prostat, dan penis. Testoteron juga berperan dalam pertumbuhan organ skeletal, laring yang berperan dalam pembentukan suara pada pria dan kartilago epifisial serta mempengaruhi pertumbuhan rambut pada daerah pubis, axilla, janggut, jambang, dada, abdomen, dan daerah punggung, aktivitas kelenjar sebasa, dan perubahan tingkah laku ⁽¹⁾

Pada wanita yang normal, ovarium akan memproduksi testoteron dalam jumlah yang sedikit yaitu kurang dari 300 g selama 24 jam. Testoteron berperandalam proses pertumbuhan rambut selama masa pubertas. Penigkatan testoteron yang berlebih akan menyebabkan amenorea, pertumbuhan rambut dan kelenjar sebasa yang berlebih .

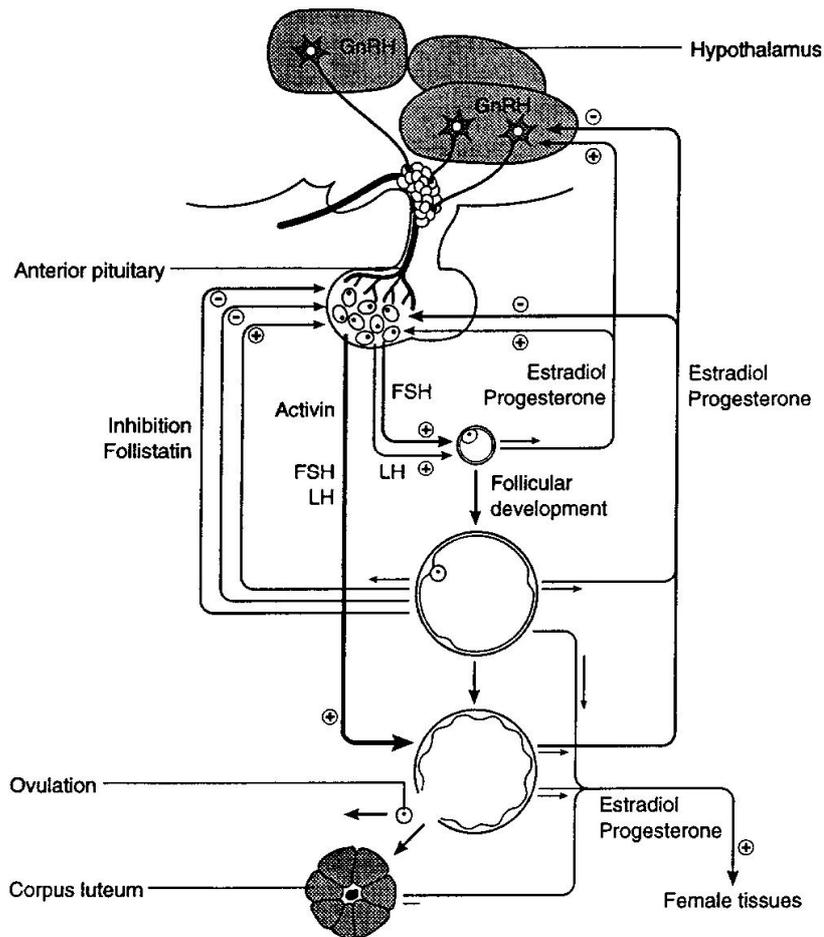
Kadar androgen meningkat pada hirsustisme, amenorea hipotalamus, dan turnor sel sertoll. Dan menurun pada andropause, sindrom klinefelter, aplasia sel leydig, dan *criptorchidism* .

Berikut gambar yang akan menjelaskan tentang sintesis hormon steroid dan siklus ovulasi pada wanita normal



Gambar 2. Siklus ovulasi pada wanita normal

Hubungan umpan balik steroid pada wanita dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 3. Regulasi steroid dan peptida gonad atas fungsi ovarium. Hypothalamus menghasilkan GnRH, yang merangsang pelepasan LH dan FSH hypofise. Peptida hypofise ini merangsang steroidogenesis dan pematangan folikel.

2.4 Prolaktin

Prolaktin terdiri dari 199 pasang asam. amino hormon polipeptida dengan berat molekul 23.000 Dalton dan disintesis serta disekresi oleh laktotrop yang terdapat pada hipofise anterior. Sama seperti hormon hipofise anterior yang lain, prolaktin juga dikontrol oleh *hypothalamic-releasin factors*. Sekresi prolaktin terutama dihambat oleh dopamin yang disekresi oleh neuron dopaminergik tuberoinfundibular⁽²⁾

Prolaktin akan merangsang pengeluaran ASI pada saat sesudah melahirkan. Selama kehamilan prolaktin akan banyak disekresi dan dipengaruhi oleh bormon lain seperti

estrogen, progesteron, human placenta lactogen (HPL), dan cortisol untuk merangsang pertumbuhan *mamae*. Setelah melahirkan, kadar estrogen dan progesteron akan menurun sehingga kadar prolaktin akan meningkat dan merangsang *mamae* untuk mengeluarkan ASI. Kadar prolaktin akan meningkat pada fetus dan bayl baru lahir terutama pada usla bulan pertama.

Dalam keadaan fisiologis, prolaktinemia dapat terjadi pada saat kehamilan, ibu menyusui, tidur, stres, dan, konsumsi protein tinggi dan olah raga. Keadaan patologis yang menyebabkan hiperprolaktinemi adalah tumor pituitari, adenomapituitari, - gagal

ginjal, akromegali, dan anoreksia nervosa. Dan kadarnya menurun dalam keadaan osteoporosis, ginekomasti, nekrosis hipofise, dan hirsutism. Pada wanita, hiper-prolaktinemia dapat menyebabkan memendeknya fase luteal sehingga dapat menyebabkan anovulasi, amenorea, bahkan infertil. Fluktuasi prolaktin lebih nyata pada wanita premenopause dibandingkan pasca menopause⁽²⁾. Pemeriksaan prolaktin akan memberikan fluktuasi hasil yang berbeda pada masing-masing individu. Pengambilan sampel sebaiknya dilakukan 3-4 jam setelah pasien bangun tidur.^(3,4)

Faktor interferensi yang mempengaruhi pemeriksaan prolaktin adalah penggunaan steroid, kontrasepsi oral, progesteron, metil dopa, fenotiazid, antidepresan, morfin, haloperidol, levodopa, dan ergot alkaloid⁽⁴⁾

Berikut kadar prolaktin pada pria maupun wanita

Tabel 5. Kadar prolaktin pria dan wanita pada serum

Jenis kelamin	Usia, keadaan	Konvensional unit (ng/mL)
Wanita	Bayi baru lahir	< 500
	Bayi 1-5 bulan	6-14
	Anak-anak	4-8
	Dewasa Fase folikular	< 20
	Fase luteal	<40

Disadur dari Greenspan dan Strewler, 1997)

Interpretasi Pemeriksaan Hormonal Dalam Gangguan Masa Usia Reproduksi (Dewasa)

Nilai-nilai normal dari kadar hormon dalam siklus ovulatorik (WHO Laboratory No. 21 Zone B for EQC and No. 104 for MRP):

Tabel 7. Patokan normal hormon untuk siklus ovulatorik

Hormon	Satuan	Fase siklus haid		
		Folikuler	Ovulasi	Luteal
FSH	mUI/ml	5-20		
LH	mUI/ml	3-13		
Estrogen (E2)	pg/n-d	-12:50-100 -4:120- 220	200-400	+ 2:90- 200 +12:60-130
Progesteron	ng/ml	0,5-1,5	5-8	10-30
Prolaktin	m UI/M	-	5-25	-

Gangguan yang sering dialami wanita dalam usia reproduksi yang pernah mengalami haid, namun haidnya berhenti untuk sedikitnya 3 bulan berturut-turut disebut dengan amenorea sekunder. Penyebab tidak munculnya haid ini dapat disebabkan oleh organ yang bertanggung jawab terhadap proses terjadinya siklus haid dan proses pengeluaran darah haid, sehingga dikenal dengan:

a. Amenorea sentral (amenorea

hipotalamik, amenorea hipofisis), paling sering disebabkan oleh karena gangguan psikiatris dimana terjadi gangguan pengeluaran LH-RH akibatnya pengeluaran hormon gonadotropin berkurang, sehingga pada pemeriksaan hormon FSH, LH, estradiol kadarnya rendah.

b. Amenorea ovarium atau dikenal dengan *Premature ovarian*

- failure*, amenorea yang disertai dengan kadar estrogen yang menurun sedangkan kadar FSH meningkat (> 40 mIU/ml) pada wanita usia < 40 tahun. Diperkirakan 5-10% dari wanita ini mempunyai risiko $< 1\%$ mengalami menopause sebelum usia 40 tahun, dan diperkirakan 15-20% dihubungkan dengan penyakit auto-imun.
- c. Amenorea uteriner, dapat disebabkan kerusakan pada endometrium akibat perlengketan (sindrom Asherman) atau adanya infeksi berat (TBC), dimana endometrium ada tetapi tidak bereaksi sama sekali terhadap hormon.

Daftar Pustaka

- Braunstein, G.D.. Testes. In Francis S.G and Gordon J.S (eds), *Basic and Clinical Endocrinology*. 5thed. 1997.London: Prentice-Hall International Inc.
- Aron, D.C, dan Findling, J.W. Hypothalamus & pituitary. In Francis S.G and Gordon J.S (eds), *Basic and Clinical Endocrinology*. 5th ed.1997.London Prentice-Hall International Inc.
- Howaritz, B dan Henry J.B. Evaluation of endocrine function. In John, B.H (eds), *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21st ed. 2001 Philadelphia: WB Saunders Company.
- Demers, L.M. Pituitary function. In Carl- A.13 dan Edward, R.A (eds), *The textbook of Clinical Chemistry*. 3rded. 1999.Philadelphia : WB.Saunders Company.
- Greenspan, F.S dan Strewler, G.D. Appendix. In Francis S.G and Gordon J. S (eds), *Basic and Clinical Endocrinology*. 5th ed. 1997 London: Prentice-Hall International Inc
- Gronowski, A.M dan Landau-Levine,M. Reproductive endocrine function. In Carl, A.B dan Edward, R.A (eds), *The textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. 1999.Philadelphia: WB. Saunders Company
- Linde. R dan Goshin J.P. Reproduction. In James P.G. Lawrence V.B (eds), *Immunoassay Laboratory Analysis and Clinical Application*. 1994. Boston Butterworth-Heineman
- Bodlaender. 1995. *Progesteron : Physiology and Clinical Utility*. Melalui www.dpcweb.com
- Vankricken, L, dkk. 2000. *HCG and Subunit : DPC Assay Specificities and Clinical Utility in Obstetrical Care and Oncology*. Melalui www.dvcweb.com
- Kricka, L.J dan Phil,D. Principle of immunochemical technique. In Carl, A.B dan Edward, R.A (eds), *The textbook of Clinical Chemistry*. 3ed. 1999.Philadelphia WB. Saunders Company.
- Asihara,Y dan Kasahara, Y. Immunoassay and immunochemistry. In John, B.H (eds), *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 21st ed. 2001.Philadelphia : WB Saunders Company.