

## MEMBANDINGKAN REGRESI 4PL DAN LINIER FIT UNTUK VERIFIKASI HORMON 17 $\beta$ -ESTRADIOL MENGUNAKAN METODE ELISA

Arroofita Ani Sandiya<sup>1\*</sup>, Sudjarwo<sup>2</sup>, dan Ashon Sa'adi<sup>3</sup>

Program Studi Magister Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga Surabaya<sup>1</sup>

Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga Surabaya<sup>2</sup>

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya<sup>3</sup>

\*e-mail: arroofita.ani.sandiya@ff.unair.ac.id

### Abstract

One solution for infertile couples to get offspring is IVF, one of the stages is a HOT procedure. On the stage there is an increasing in steroid hormone levels (estrogen) as a result of ovarian follicles development. The 17 $\beta$ -estradiol hormone was chosen to be verified because it can be used as a marker or marker to show the maturity follicle. Linear and logistic regression are the two most commonly used in curve making models for ELISA sandwich immunoassays. Although linear regression may be useful when analyzing samples included in the linear part of the analyte response curve, logistic regression is the preferred for multiplex immunoassays. Verification of 17 $\beta$  estradiol hormone regression results using linear fit obtained the value of  $r=0.952$  while the regression value used 4PL obtained result  $r=0.998$ . But the results shown in the verification of the 17 $\beta$  estradiol hormone good, this were evidenced by using of SPSS software. The value of F obtained was 78.712, where the value was greater than the value of F table (6.61) which means that the value of independent variable (concentration) on value of the dependent variable (optical density value). The linearity values obtained through verification using the 4PL model indicates that the linearity of this method was better based on linear regression.

**Keywords:** 17 $\beta$ -estradiol, ELISA, Regresi 4 Parameter Logistic (4PL), Linier Fit, verification.

### Abstrak

Salah satu solusi bagi pasangan infertil untuk mendapatkan keturunan adalah IVF, salah satu tahapannya adalah prosedur HOTA. Pada tahap tersebut terjadi peningkatan kadar hormon steroid (estrogen) sebagai akibat dari perkembangan folikel ovarium. Hormon 17 $\beta$ -estradiol dipilih untuk diverifikasi karena dapat digunakan sebagai marker atau penanda untuk menunjukkan kematangan folikel. Regresi linier dan logistik adalah dua model yang paling umum digunakan dalam pembuatan kurva untuk ELISA sandwich immunoassays. Meskipun regresi linier mungkin berguna ketika menganalisis sampel yang termasuk dalam bagian linear dari kurva respons analit, regresi logistik adalah jenis regresi yang disukai untuk immunoassay multiplex. Verifikasi hasil regresi hormon estradiol 17 $\beta$  menggunakan linear fit diperoleh hasil  $r=0,952$ , sedangkan nilai regresi menggunakan 4PL untuk didapatkan hasil  $r=0,998$ . Tetapi hasil yang ditunjukkan dalam verifikasi hormon estradiol 17 $\beta$  baik, ini dibuktikan dengan penggunaan perangkat lunak SPSS. Nilai F diperoleh sebesar

78,712, dimana nilainya lebih besar dari nilai  $F$  tabel (6,61) yang berarti nilai dari variabel independen (konsentrasi) pada nilai variabel dependen (nilai kepadatan optik). Nilai-nilai linearitas yang diperoleh melalui verifikasi menggunakan model 4PL menunjukkan bahwa metode ini lebih baik linieritasnya berdasarkan regresi linier.

**Kata kunci:**  $17\beta$ -estradiol, ELISA, Regresi 4 Parameter Logistik (4PL), Linier Fit, Verifikasi.

## 1. PENDAHULUAN

Kasus infertilitas pada wanita merupakan salah satu masalah yang penting di dunia termasuk Indonesia. Infertilitas adalah ketidakmampuan sepasang suami istri untuk memiliki keturunan dimana wanita belum mengalami kehamilan setelah melakukan hubungan seksual secara teratur 2-3 kali per minggu, tanpa memakai metode pencegahan selama 12 bulan, kondisi yang dapat disebabkan oleh pihak perempuan, laki-laki, maupun keduanya. Infertilitas sebagian besar disebabkan oleh perempuan (Riskesdas, 2013). Kasus infertil terjadi pada 8%-10% pasangan, dari gambaran global dunia populasi maka sekitar 50-80 juta pasangan (1 dari 7 pasangan) atau sekitar 2 juta pasangan infertil baru setiap tahun dan jumlah ini terus meningkat (WHO, 2010).

Salah satu solusi bagi pasangan infertil untuk memperoleh keturunan adalah *In Vitro Fertilization* (IVF). Salah satu tahapan dalam IVF adalah stimulasi ovarium atau yang biasa disebut Hiperstimulasi Ovarium Terkendali (HOT) yang merupakan tahapan penting pada penanganan kasus infertilitas, bertujuan untuk mendapatkan ovulasi ganda sehingga meningkatkan angka kehamilan. Selain itu, pada siklus haid yang diberi prosedur HOT terjadi peningkatan kadar hormon steroid (estrogen dan progesteron) sebagai dampak dari pertumbuhan dan

perkembangan multi folikel ovarium (David K. dkk, 2017).

Hormon estrogen merupakan salah satu hormon steroid kelamin, karena mempunyai struktur kimia berintikan steroid yang secara fisiologik sebagian besar diproduksi oleh kelenjar endokrin sistem produksi wanita. Fungsi utamanya berhubungan erat dengan fungsi alat kelamin primer dan sekunder wanita (Guyton A. 1994).

Estrogen terdiri dari tiga jenis hormon yang berbeda, yaitu estrone, estradiol, dan estriol. Pada wanita normal estrogen banyak diproduksi oleh folikel selama proses ovulasi dan korpus luteum selama kehamilan (Gronowski and Landau, 1999). Dari semua jenis estrogen,  $17\beta$ -estradiol (E2) ini adalah hormon yang paling berpengaruh secara fisiologis manusia, estrone (E1) kurang berpengaruh dan estriol paling tidak aktif. Potensi relatif masing-masing adalah 50:5:1. Sumber utama estradiol pada wanita adalah sel-sel teka dan granulosa ovarium dan turunan luteinisasi dari sel-sel ini. Berdasarkan teori sintesis estrogen kedua sel ini, sel-sel teka mensekresikan androgen yang menyebar ke sel-sel granulosa teraromatisasi menjadi estrogen. Kedua bentuk sel ini mungkin mampu untuk membentuk androgen dan estrogen. Estrone dan estriol utamanya dibentuk di hati dari estradiol (Guyton A. 1994).

Dipilihnya hormon  $17\beta$ -estradiol karena seperti yang dijelaskan sebelumnya bahwa hormon  $17\beta$ -estradiol berfungsi untuk penentuan tingkat kematangan folikel agar siap dibuahi oleh sel sperma pada tahap IVF. Karena hal tersebut, maka hormon  $17\beta$ -estradiol dapat dijadikan penanda atau *marker* untuk menunjukkan kematangan dari folikel (Permadi, Wiryawan, dkk, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk verifikasi linieritas kadar  $17\beta$ -estradiol dengan membandingkan regresi 4PL dengan linier fit menggunakan Metode Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). ELISA sendiri merupakan teknik pengujian serologi yang didasarkan pada prinsip interaksi antara antibodi dan antigen. Pada dasarnya, ELISA memiliki empat langkah prinsip, terdiri dari pelapisan, pemblokiran, pengaktifan antigen dan antibodi, dan pengembangan warna (Rudolf, 2005).

Verifikasi dilakukan untuk meyakinkan bahwa respon tiap perubahan dari kadar standar hormon steroid dapat memberikan pengaruh terhadap respon analit. Kemudian verifikasi yang akan dilakukan adalah dengan melakukan uji linieritas kurva baku. Parameter linieritas dijadikan salah satu parameter dalam uji verifikasi yang dilakukan. Linieritas sendiri merupakan kemampuan metode analisis yang dapat menunjukkan bahwa kontrasi analit dalam larutan sampel berada dalam rentang konsentrasi tertentu, dimana respon yang diberikan sebanding dan proporsional dengan konsentrasi analit (Green, JM. 1996).

Pengujian linieritas kurva baku ini akan dilakukan dengan dua model perhitungan yaitu dengan menggunakan

regresi linier dan menggunakan perhitungan 4 parameter logistik.

Regresi linier dan logistik adalah dua yang paling umum digunakan dalam model pembuatan kurva untuk *immunoassays sandwich* (Azlina, 2017). Meskipun regresi linier mungkin berguna saat menganalisis sampel yang termasuk dalam bagian linear dari respons analit kurva, namun regresi logistik adalah jenis regresi yang lebih disukai untuk *immunoassays multipleks*. Regresi logistik menghasilkan rentang konsentrasi terluas dimana sampel dapat diprediksi secara akurat, dan memungkinkan pemilihan satu set standar secara bersamaan diterapkan ke beberapa analit (Diana *et al*, 2000). Oleh karena itu pengujian dilakukan untuk dapat memberikan gambaran mengenai kedua persamaan regresi tersebut terhadap sampel biologis yaitu hormon  $17\beta$ -estradiol.

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1 Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu iMark™ *Microplate Absorbance Reader* Bio-RAD, Inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , pipet presisi, kertas penyerap, dan tip pipet.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu; Human  $17\beta$  estradiol ELISA Kit Bioassay Technology Laboratory, Larutan standar  $17\beta$  estradiol (640 ng/L), *Plate* ELISA yang sudah dilapisi antibody, larutan pengencer standar, Streptavidin-HRP, *stop solution*, larutan substrat A, Larutan substrat B, larutan *wash buffer*, *plate sealer* dan, antibodi  $17\beta$  estradiol manusia yang terbiotinilasi.

## 2.2 Preparasi

Preparasi pengerjaan verifikasi  $17\beta$  estradiol dilakukan dengan menyiapkan semua reagen dalam Elisa Kit ditempatkan pada suhu kamar, kemudian dilakukan preparasi untuk larutan standar. Larutan standar kerja yang akan digunakan sebanyak 6 konsentrasi. Dibuat dengan mengencerkan standar  $17\beta$  estradiol 640ng/L menjadi beberapa konsentrasi yaitu 320, 160, 80, 40, dan 20 ng/L. Kemudian, dipersiapkan pula larutan pencuci atau *wash solution* dimana larutan ini dalam bentuk konsentrat dan harus dilakukan pengenceran. Setiap *plate* membutuhkan 5 kali pencucian dengan jumlah larutan pencuci 0,35 mL.

## 2.3 Prosedur Kerja

Larutan standar yang telah disiapkan kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam *plate* sejumlah 50  $\mu$ L secara presisi dan kuantitatif. Kemudian ditambahkan 50  $\mu$ L Streptavidin-HRP kedalam masing-masing *plate* (tidak pada sumuran blangko) lalu dicampur dengan baik kemudian ditutup dengan *sealer* dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.

Kemudian lepaskan *sealer* pada *plate* dan *plate* dicuci dengan larutan pencuci sebanyak 5 kali masing-masing sumuran sejumlah 0,35 mL. Setelah dicuci dan dikeringkan dengan kertas penyerap, selanjutnya ditambahkan substrat A dan B secara berturut-turut sejumlah 50  $\mu$ L (penambahan dilakukan dalam kondisi gelap). Kemudian ditutup dengan *sealer* kembali dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C serta dalam kondisi gelap.

## 2.4 Pengamatan menggunakan Microplate Absorbance Reader

Setelah inkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan *stop solution* hingga terjadi perubahan warna yang semula biru menjadi kuning. Segera setelah itu ditentukan *optical density* dengan membaca serapannya menggunakan *Microplate Absorbance Reader* pada panjang gelombang 450 nm.

## 3. HASIL DAN DISKUSI

Hasil pembacaan *optical density* dari kadar standar  $17\beta$  estradiol didapatkan hasil sebagai berikut :

**Tabel 1. Hasil kadar standar  $17\beta$  estradiol dengan *optical density***

No	Kadar Standar $17\beta$ estradiol (ng/L)	OD (Optical Density)
1.	20	0,450
2.	40	0,500
3.	80	0,655
4.	160	1,147
5.	320	1,684
6.	640	2,278

Penggunaan *software* SPSS juga digunakan untuk meningkatkan keakuratan data dan kesimpulan yang didapatkan dalam penelitian ini. Pada penelitian ini menggunakan *software* SPSS IBM Statistic 20 *Regression Linier Test* untuk menentuka nilai f.

Berikut data perhitungan menggunakan SPSS untuk hasil verifikasi kadar hormon  $17\beta$  estradiol :

**Tabel 2. Hasil Pengukuran Menggunakan Program SPSS**

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.976 <sup>a</sup>	.952	.940	.180986

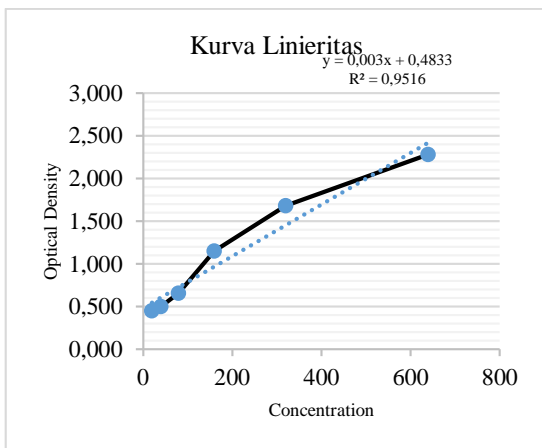
a. Predictors: (Constant), Konsentrasi Std.

ANOVA <sup>a</sup>					
Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	2.578	1	2.578	78.712	.001 <sup>b</sup>
Residual	.131	4	.033		
Total	2.709	5			

a. Dependent Variable: Nilai OD  
b. Predictors: (Constant), konsentrasi Std.

Hasil kurva baku parameter linieritas dan nilai regresi dengan menggunakan linier fit ditunjukkan pada **Gambar 1** untuk hormon  $17\beta$  estradiol.



**Gambar 1.** Kurva baku linieritas hormon  $17\beta$  estradiol

Pengujian ELISA seperti *sandwich* ELISA sering digunakan dalam penelitian dan uji diagnostik untuk mendeteksi dan mengukur target protein spesifik dalam matriks biologis yang kompleks. Analisis data yang benar dan penerapan model pemasangan kurva yang tepat sangat

penting untuk melaporkan hasil yang akurat (Findley J.W.A, and Dillart R.F. 2007). Uji ELISA kuantitatif biasanya menghasilkan plot 2-dimensi xy-plot yang menggambarkan hubungan konsentrasi (dosis), yaitu protein yang diminati, dengan respons sistem pengujian, misal, kerapatan optik untuk deteksi kolorimetri (Nix B. and Wild D. 2005).

Sebelum sampel dapat dievaluasi, model pemasangan kurva yang tepat harus dipilih sebelumnya dan nilai kecocokannya ditentukan. Model pemasangan kurva yang paling penting untuk *sandwich* ELISA. Pemasangan Kurva: Analisis Regresi *Linier* dan *Non-Linier* Regresi linier adalah salah satu model yang paling umum digunakan dalam analitik (Cox, K.L., et al. 2001.). Dalam pengujian ini dapat dilihat gambaran hasil dari perbandingan kedua persamaan regresi tersebut, dimana pada regresi Linier fit dengan persamaan:

$$y = mx + c$$

Dimana:

- y = variabel dependen (sinyal)
- x = variabel independen (konsentrasi)
- m = kemiringan garis yang dipasang
- c = intersep dari sumbu dependen

Didapatkan nilai  $r^2 = 0,9516$ , nilai perhitungan sesuai dengan perhitungan pada SPSS yang didapat *R square* = 0,952. Sedangkan pada pengujian menggunakan regresi 4PL dengan persamaan:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

Dimana:

Nilai x dan y sama seperti pada model linier di atas.

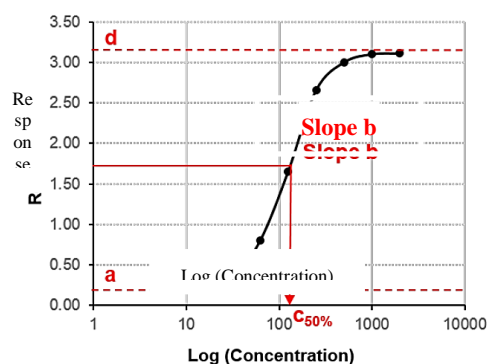
- a : nilai minimum yang dapat diperoleh (yaitu apa yang terjadi pada 0 dosis)
- b : Kemiringan pada kurva (yaitu hal ini terkait dengan kecuraman kurva pada titik c)
- c : titik infleksi (yaitu titik pada kurva S berbentuk setengah antara a dan d)
- d : nilai maksimum yang dapat diperoleh (yaitu apa yang terjadi pada dosis tak terbatas)

Dari hasil pengamatan verifikasi yang dilakukan pada  $17\beta$  estradiol guna membandingkan regresi menggunakan Linier fit dan 4PL menunjukkan hasil yang sedikit berbeda. Dimana pada verifikasi hormon  $17\beta$  estradiol hasil regresi menggunakan linier fit mendapatkan hasil nilai  $r = 0,952$  sedangkan nilai regresi menggunakan 4 PL mendapatkan hasil  $r = 0.998$ .

Kurva standar berbasis-ELISA umumnya bersifat nonlinear dan sigmoidal, langkah terbaik untuk menyesuaikan kurva ini adalah dengan menggunakan logistik 4 PL atau logistik 5 PL yang lebih jarang digunakan (Masdor NA, *et al.* 2016). Nilai r yang diperoleh dari kurva baku Linier fit tidak berbeda jauh, hanya saja pada regresi Linier fit menunjukkan hasil lebih rendah dari pada regresi 4PL.

Hasil pada Gambar 1 menunjukkan kurva sigmoidal khas untuk kurva kalibrasi ELISA berdasarkan persamaan 4-PL. *Immunoassays* menggambarkan sistem biologis (interaksi antibodi-antigen) dan dengan demikian *immunoassay* biasanya tidak mengikuti

hubungan dosis-respons linier (Cumberland WN., *et al.* 2015). Tes ELISA sering menghasilkan kurva sigmoid seperti yang ditunjukkan pada contoh Gambar 2 dan hanya memiliki rentang konsentrasi linier terbatas. Regresi non-linier menggunakan persamaan logistik empat-parameter berdasarkan fitting kuadrat (Motulsky HJ., and Ransnas LA. 1987) digunakan agar sesuai dengan kurva berikut:



**Gambar 2.** Kurva immunoassay sigmoidal untuk analisis regresi non-linear.

- a = asimtot rendah yang memperkirakan respons pada konsentrasi nol
- b = kemiringan kurva
- c50% = konsentrasi pada rentang menengah (titik belok)
- d = asimtot atas memperkirakan respons pada konsentrasi tak terbatas

Oleh karena itu, nilai regresi linier fit lebih rendah dari pada 4PL. Namun hasil yang ditunjukkan pada verifikasi hormon  $17\beta$  estradiol tergolong baik, hal tersebut dibuktikan dengan penggunaan software SPSS dimana didapat nilai  $F = 78,712$ , dimana nilai tersebut lebih besar dari nilai  $F$  table (6,61) yang artinya nilai variable independen (konsentrasi) berpengaruh pada nilai variable dependen (nilai *optical density*).

Nilai linieritas yang diperoleh melalui verifikasi menggunakan model 4PL menunjukkan bahwa metode tersebut lebih baik linieritas yang dilaporkan berdasarkan regresi Linier fit (Azlina. M, Noor., 2017). Nilai parameter dalam ELISA disarankan untuk dihitung berdasarkan metode 4 PL jika kurva menunjukkan profil sigmoid yang jelas. Dengan demikian, model regresi *non-linear* seperti 4 atau 5 *parameter logistic* (-PL) regresi harus diterapkan yang meningkatkan akurasi dan rentang kurva kalibrasi yang dapat digunakan untuk kuantifikasi.

#### 4. KESIMPULAN

Dalam hal kurva kalibrasi ELISA menunjukkan profil sigmoidal, model 4 PL harus digunakan agar sesuai dengan data daripada model Linier fit. Bagian linier penting sebagai metode yang mudah dan cepat untuk menilai sensitivitas metode ELISA.

#### DAFTAR PUSTAKA

Azlina, Masdor. (2017). Determination of the Detection Limit using the Four-Parameter Logistic Model for The Double-Antibody Sandwich ELISA for the Rapid Detection of Bacillus cereus in Food. *JEMAT*. Vol 5, No 1, 12-13.

Cox, K.L., Devanarayan, Viswanath, Kriauciunas, Aidas., Manetta, Joseph., Montrose, Chahrzad., dan Sittampalam, Sitta. (2001). Immunoassay Methods. In: Sittampalam, G.S. et al. eds. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly and Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

Cumberland,WN., Fong, Y., Yu, X., Defawe, O., Frahm, N., dan De, R. (2015). Nonlinear Calibration Model Choice between the Four and Five Parameter Logistic Models. *J Biopharm Stat*: 25(5):972–83.

David, K., Gardner., dan Carlos, Simón. (2017). *Handbook of In Vitro Fertilization, 4<sup>th</sup> Ed.* Melbourne: CRC Press.

Diana, Davis., Aiguo, Zhang., Chloe, Etienne., Ivan, Huang., dan Michele, Malit. (2000). Principles of Curve Fitting for Multiplex Sandwich Immunoassays. Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 USA.

Findley, JWA., dan Dillart, RF. (2007). Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays. *The AAPS Journal*.; 9(2) Article 29.

Guyton, A.C. and Hall, J.E., 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders.

Gronowski, A.M., and Landau, Levine. 1999. *Reproductive endocrine fuction: The textbook of Clinical Chemistry 3<sup>rd</sup> Ed.* Philadelphia: WB. Saunders Company.

Masdor, NA., Altintas, Z., dan Tothill, IE. (2016). Sensitive Detection of *Campylobacter jejuni* using nanoparticles enhanced QCM sensor. *Biosens Bioelectron*: 78:328–36.

Motulsky, HJ., dan Ransnas, LA. (1987). Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and non mathematical review. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*.;1(5):365–74.

Nix, B., dan Wild, D. (2005). Calibration Curve-fitting. In: Wild D. ed. *The*

- Immunoassay Handbook. Oxford, UK. Elsevier Ltd, pp. 233-245.
- Permadi, Wiryawan., Djuwantono, Tono., Herlianto, Harris., dan Halim, Danny. (2008). *Hanya 7 Hari Memahami Fertilitas In Vitro*. Bandung: PT. Refika Aditama.
- Rudolf, ML. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* Vol. 51 No. 12 pp. 2415–2418.
- Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). *Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI*. <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf>. (10 Mei 2019).
- World Health Organization. *Mother or nothing: the agony of infertility*: <http://www.who.int/bulletin/volumes/88/12/10.011210.pdf?ua=1>. (10 Mei 2019).