

VERIFIKASI LINIERITAS KURVA BAKU TESTOSTERON MENGGUNAKAN METODE ELISA (*ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

Muhammad Arif Hanny Ferry Fernanda^{1*}, Ashon Sa'adi², dan Sudjarwo¹

Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga Surabaya¹

Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga Surabaya²

*e-mail: m.a.hanny.ferry.fernanda-2016@ff.unair.ac.id

Abstract

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is one of the quantitative analysis methods that is often used to determine the levels of active compounds in biological samples. In this study we will verify the method of determining testosterone active compounds in blood and urine samples of female patients who have Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) using the Human Testosterone ELISA Kit. Before conducting testosterone levels using ELISA, it is necessary to verify the linearity of the standard curve first to determine the effect of testosterone standard levels on the analyte response in the form of optical density. The linearity verification of the standard testosterone curve was calculated using linear regression calculations with determinant coefficient result was 0.978 and a value of $r = 0.05$. While for testing by using 4 parameter logistic (4PL) coefficient created, 0.999. Based on these results it can be concluded that the testosterone standard level has a significant influence on the response of optical density analytes.

Keywords: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Linearity, Testosterone, Verification.

Abstrak

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan salah satu metode analisis kuantitatif yang sering digunakan untuk menentukan kadar senyawa aktif dalam sampel biologis. Pada penelitian ini akan dilakukan verifikasi metode penetapan kadar senyawa aktif testosteron pada sampel darah dan urin pasien wanita yang mengalami Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) dengan menggunakan Human Testosterone ELISA Kit. Sebelum melakukan penetapan kadar testosteron menggunakan ELISA, perlu dilakukan verifikasi linieritas kurva baku terlebih dahulu untuk mengetahui pengaruh kadar standar testosteron terhadap respon analit berupa optical density. Verifikasi linieritas kurva baku testosteron dihitung dengan menggunakan perhitungan regresi linier dengan hasil nilai koefisien determinasi yaitu 0.978 dengan nilai $r = 0,05$. Sedangkan untuk pengujian dengan perhitungan 4 parameter logistic (4PL) didapatkan hasil nilai koefisien determinasi sebesar 0.999. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kadar standar testosteron memiliki pengaruh secara signifikan terhadap respon analit berupa optical density.

Kata kunci: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Linieritas, Testosteron, Verifikasi.

1. PENDAHULUAN

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dapat diartikan sebagai penentuan kadar imunosorben taut-enzim. ELISA merupakan teknik pengujian serologi yang didasarkan pada prinsip interaksi antara antibodi dan antigen. Pada awalnya, Teknik ELISA hanya digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi keberadaan antigen maupun antibodi dalam suatu sampel seperti dalam pendeteksian antibodi IgM, IgG dan IgA pada saat terjadi infeksi (pada tubuh manusia khususnya). Namun, seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, Teknik ELISA juga diaplikasikan dalam bidang patologi tumbuhan dan kedokteran.

Teknik ELISA pertama kali diperkenalkan pada tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall. Mereka menggunakan teknik ini dalam bidang imunologi (ELISA konvensional) untuk menganalisis interaksi antara antigen dan antibodi di dalam suatu sampel, dimana interaksi tersebut menggunakan suatu enzim yang berfungsi sebagai pemberi signal. Pada dasarnya, ELISA memiliki empat langkah prinsip, terdiri dari pelapisan, pemblokiran, pengaktifan antigen dan antibodi, dan pengembangan warna (Rudolf, 2005).

Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian kadar testosteron dengan menggunakan Metode ELISA. Pengujian kadar testosteron ini penting dalam diagnosis sejumlah kondisi klinis pada wanita diantaranya *precocious puberty*, tumor androgen, dan sindrom ovarium polikistik (PCOS) (Hahn, *et al* 2007). Testosteron merupakan androgen yang paling ampuh, testosteron disekresikan oleh zona adrenal fasciculata (25%) dan

stroma ovarium (25%), masing-masing sekitar 50 g per hari, dan 50% sisanya dihasilkan dari sirkulasi Androstenedion. Tingkat produksi harian berada di kisaran 0,1-0,4 mg dan tingkat sirkulasi berada pada kisaran 0,2-0,7 ng/mL (0,6-2,5 nmol/L). Testosteron berada pada konsentrasi terendah pada fase folikuler awal siklus, naik ke puncak siklus pertengahan dan konsentrasi pada fase luteal lebih tinggi dari pada fase folikular awal (Burger, 2002).

Penentuan kadar testosteron pada penelitian ini menggunakan *Human Testosterone* ELISA Kit, dimana prinsip analisisnya menggunakan model *immunoassays sandwich*. Sebelum melakukan penetapan kadar testosteron menggunakan ELISA ini, perlu dilakukan verifikasi linieritas kurva baku terlebih dahulu agar diketahui pengaruh kadar standar testosteron terhadap respon analit berupa *optical density*. Verifikasi ini perlu dilakukan untuk dapat meyakinkan bahwa respon tiap perubahan dari kadar standar testosteron dapat memberikan pengaruh terhadap respon analit.

Verifikasi yang akan dilakukan adalah dengan melakukan uji linieritas kurva baku. 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 model yang paling umum digunakan untuk kurva *immunoassays sandwich*. Meskipun regresi linier mungkin berguna saat menganalisis sampel yang termasuk dalam bagian linear dari respon 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 meskipun berada diluar rentang konsentrasi standarnya, dan memungkinkan pemilihan satu set standar secara bersamaan diterapkan kebeberapa analit (Davis, *et al* 2000).

2. METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu iMark™ *Microplate Absorbance Reader* Bio-RAD, yang dilengkapi dengan menggunakan perangkat lunak *Microplate Manager*® 6 Software, inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, kertas penyerap, pipet presisi, dan tip pipet sekali pakai.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Human Testosterone ELISA Kit Bioassay Technology Laboratory, yang terdiri dari Larutan standar Testosteron (128nmol/L), Plat ELISA yang sudah dilapisi antibodi, larutan pengencer standar, Streptavidin-HRP, *stop solution*, larutan substrat A, Larutan substrat B, larutan *wash buffer*, *plate sealer* dan Antibodi Testosteron manusia yang terbiotinilasi.

2.2 Preparasi

Semua reagen dalam ELISA Kit di tempatkan pada suhu kamar, kemudian dilakukan preparasi untuk larutan standar. Larutan standar kerja yang akan digunakan sebanyak 6 konsentrasi yang berbeda. standar Testosteron 128 nmol/L diencerkan dan dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu 64, 32, 16, 8, 4, dan 2 nmol/L. Selain itu, dipersiapkan pula larutan pencuci atau *wash solution* sebab larutan ini tersedia dalam bentuk konsentrat dan harus dilakukan

pengenceran. Setiap plat membutuhkan 5 kali pencucian dengan jumlah larutan pencuci 0,35 mL.

2.3 Prosedur Kerja

Larutan standar yang telah siap masing-masing dimasukkan kedalam plat sejumlah 50 μL secara presisi dan kuantitatif. Ditambahkan 50 μL Streptavidin-HRP kedalam masing-masing plat lalu dicampur dengan baik kemudian ditutup dengan sealer dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C . Sambil menunggu disiapkan larutan pencuci. Setelah inkubasi, *sealer* dilepas dan kemudian plat dicuci dengan larutan pencuci sebanyak 5 kali masing-masing sejumlah 0,35 mL. Setelah dicuci dan larutan pencuci sudah ditiriskan, selanjutnya ditambahkan substrat A dan B secara berturut-turut sejumlah 50 μL . 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 dilakukan inkubasi selama 10 menit, kemudian *plate* dikeluarkan dan ditambahkan *stop solution* hingga terjadi perubahan warna yang semula biru menjadi kuning. Segera setelah dimasukkan *stop solution*, kemudian 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 testosteron didapatkan hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Kadar vs *Optical Density*

No	Kadar Standar Testosteron (nmol/L)	OD (<i>Optical Density</i>)
1.	2	0,098
2.	4	0,269
3.	8	0,544
4.	16	1,042
5.	32	2,035
6.	64	3,162

Hasil pada Tabel 1 kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS untuk uji regresi linier. Hasil regresi linier ditunjukkan pada Gambar 1. Hasil regresi linier tersebut kemudian di evaluasi dengan melakukan perhitungan

menggunakan Metode 4PL (*four parameter logistic*).

Dari hasil regresi linier dengan SPSS didapatkan persamaan $Y=0.050x + 0.150$ dengan nilai $r = 0.989$ dan koefisien determinasi (R^2) = 0.978. Hasil kurva baku menggunakan regresi linier fit seperti pada Gambar 3. Berdasarkan nilai signifikansi di tabel koefisien pada Gambar 1, didapatkan nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ sehingga dapat diartikan bahwa variabel kadar testosteron (X) memiliki pengaruh signifikan terhadap variabel *optical density* (Y). Dengan demikian, diharapkan hasil dari pembacaan *optical density* pada pengukuran testosteron di sampel darah dan urin dapat diprediksi secara akurat.

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Kadar ^b		Enter

a. Dependent Variable: OD
b. All requested variables entered.

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.989 ^a	.978	.973	.196159

a. Predictors: (Constant), Kadar
b. Dependent Variable: OD

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	.150	.112		1,341	.251
Kadar	.050	.004	.989	13,419	.000

a. Dependent Variable: OD

Gambar 1. Hasil Analisa dengan SPSS

Meskipun nilai r pada hasil regresi linier telah membuktikan adanya pengaruh yang signifikan antara kadar testosteron terhadap *optical density*, penetapan kadar menggunakan Metode ELISA memang sering dijumpai hasil kurva baku yang dianggap kurang linier terutama ketika menggunakan kadar standar dengan rentang yang besar. Untuk itu, perlu dilakukan evaluasi terhadap kurva baku hasil regresi linier yaitu dengan menggunakan Kurva 4PL. Kurva 4PL adalah model regresi yang sering digunakan untuk menganalisis *bioassay*

seperti terutama ELISA yang diketahui memiliki kurva berbentuk sigmoidal, atau "s". Jenis kurva ini sangat berguna untuk mengkarakterisasi *bioassay* karena *bioassay* seringkali hanya linier pada rentang besaran konsentrasi tertentu. Selain itu, dengan menggunakan kurva 4PL ini dapat menghasilkan rentang kurva yang luas sehingga dapat digunakan untuk memprediksi kandungan analit sampel secara akurat meskipun berada diluar rentang konsentrasi standarnya.

Perhitungan Model 4PL mengikuti rumus sebagai berikut:

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

dimana, y adalah respons pada konsentrasi x, a adalah *asymptote* atas, d adalah *asymptote* bawah, c adalah konsentrasi pada titik refleksi kurva, dan b adalah factor pertumbuhan. Salah satu ciri model ini adalah simetri di sekitar titik refleksi yang sesuai dengan setengah jarak antara d dan a (Azadeh, *et al* 2018).

Perhitungan 4PL ini membutuhkan *software* khusus untuk dapat mengetahui hasilnya. Untuk melakukan perhitungan ini dapat langsung menggunakan *software* yang terintegrasi dengan *microplate reader*. Selain itu, dapat pula memanfaatkan website yang menyediakan perhitungan regresi logistik ini diantaranya

<https://www.aatbio.com/tools/four-parameter-logistic-4pl-curve-regression-online-calculator> atau <https://elisaanalysis.com/app>.

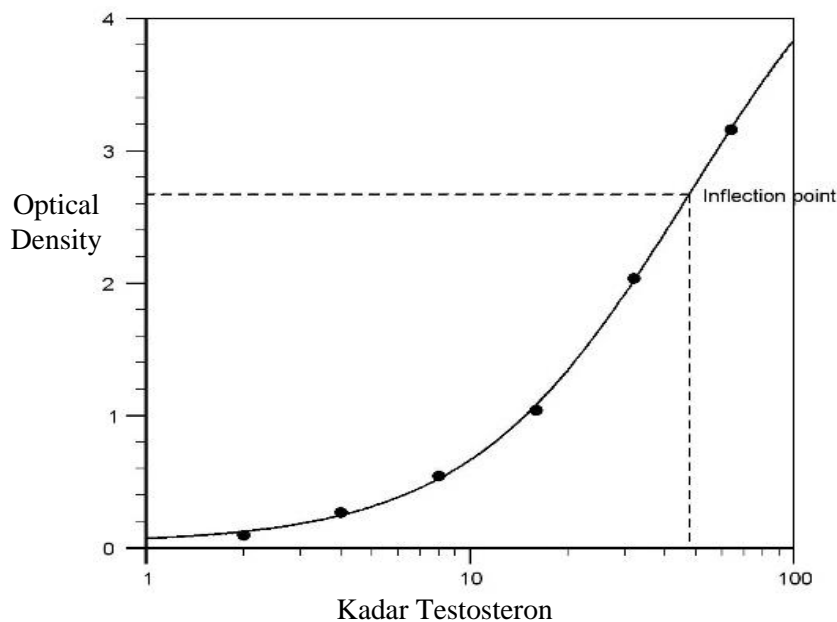
Apabila dilakukan perhitungan linieritas dengan Model 4PL (www.aatbio.com) akan didapatkan hasil sebagai berikut:

$$y = 0,033 + \frac{5,308 - 0,033}{1 + \left(\frac{x}{47,556}\right)^{-1,281}}$$

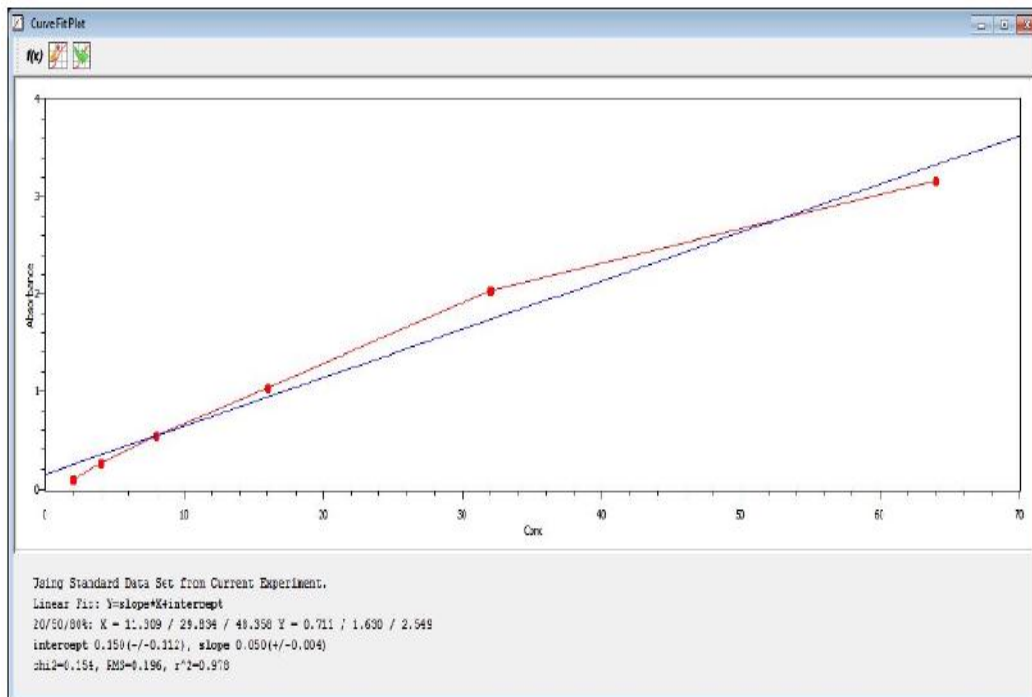
Dengan nilai $R^2 = 0,999$ (<https://elisaanalysis.com/app>). Hasil perhitungan dari website tersebut dapat dilihat di Gambar 4. Hasil kurva baku dengan model perhitungan 4PL dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut terlihat bahwa model perhitungan 4PL lebih ideal untuk digunakan sebagai kurva baku linieritas. Namun demikian, pemilihan kurva baku baik Metode Regresi Linier ataupun Metode 4PL tetap dapat dijadikan acuan sebagai kurva baku untuk penetapan kadar testosteron menggunakan ELISA karena keduanya telah memenuhi kriteria yang diharapkan.

Kurva Linieritas 4PL



Gambar 2. Hasil Kurva baku dari website www.aatbio.com



Gambar 3. Kurva Baku dengan Perhitungan Regresi Linier (Linier Fit)

elisaanalysis.com

Assay ID	Kit Target	Kit Product Code	Created Date	Regression Algorithm
	Testosteron	ELISA KIT	2019-05-31 07:44:59	4-Parameter Logistic Regression

» Find out more about the formulas (<http://elisaanalysis.com/knowledge-base/elisa-software-4-parameter-logistic-4pl-nonlinear-regression>)

Regression Formula: $y = d + \frac{a-d}{1+(x/c)^b}$

Inverse Formula: $x = c \left(\frac{a-d}{y-d} - 1 \right)^{1/b}$

Where:

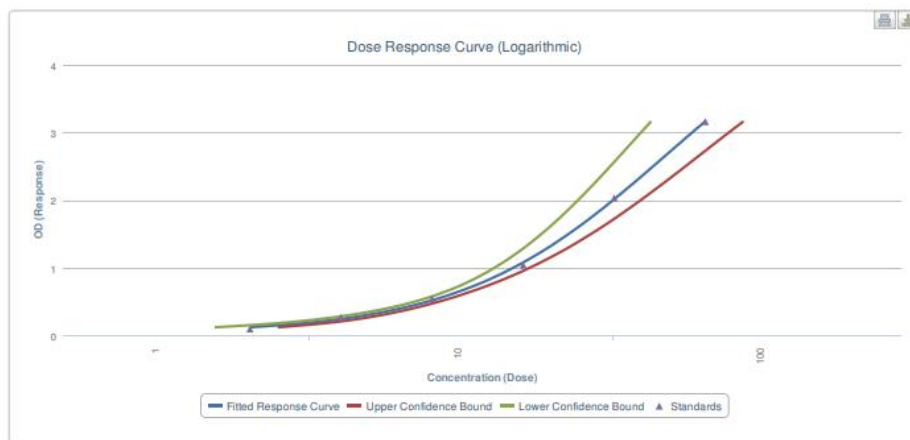
y = Response Value eg. OD

x = Dose Value eg. Concentration

and the constants/parameters are as follows:

a	b	c	d
5.3080196	-1.281162	47.553691	0.0328857

R² value: 0.9994967



Gambar 4. Screenshot dari Perhitungan dengan Menggunakan Website www.elisaanalysis.com

4. KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu kadar standar testosterone memiliki pengaruh secara signifikan terhadap respon analit berupa *optical density* baik menggunakan perhitungan regresi linier atau pun menggunakan perhitungan model 4PL (*four parameter logistic*).

DAFTAR PUSTAKA

- Azadeh M., Gorovits B., Kamerud J., MacMannis S., Safavi A., Sailstad J., and Sondag P. 2018. Calibration Curves in Quantitative Ligand Binding Assays: Recommendations and Best Practices for Preparation, Design, and Editing of Calibration Curves. *The AAPS Journal* 20: 22.
- Burger H. G. 2002. Androgen Production In Women. *Fertility And Sterility* Vol. 77, No. 4 pp. 1-3.
- Davis D., Zhang A., Etienne C., Huang I., and Malit M. 2000. *Principles of Curve Fitting for Multiplex Sandwich Immunoassays*. Bio-Rad Laboratories, Inc. Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 USA.
- Hahn S., Kuehnel W., Tan S., Kramer K., Schmidt M., Roesler S., Kimmig R., Mann K., and Janssen O.E. 2007. Diagnostic Value Of Calculated Testosterone Indices In The Assessment Of Polycystic Ovary Syndrome. *J. Clin Chem Lab Med* Vol 45 No. 2 pp. 202–207.
- <https://www.aatbio.com/tools/four-parameter-logistic-4pl-curve-regression-online-calculator>.
- Rudolf M. L. 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* Vol. 51 No. 12 pp. 2415–2418.