

**Verifikasi Metode ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*)
Untuk Penentuan Kadar AMH (*Anti Mullerian Hormone*)
*Verification of The ELISA Method (Enzym Linked Immunosorbent Assay)
for Determination of AMH Levels (Anti Mullerian Hormone)***

Irvan Ipandi¹, Ashon Sa'adi², Sudjarwo^{3*}

- 1) Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, JawaTimur, Indonesia
- 2) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, JawaTimur, Indonesia
- 3) Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, JawaTimur, Indonesia

e-mail:sudjarwo@ff.unair.ac.id

ABSTRAK

Validasi adalah proses mengkonfirmasi bahwa metode yang digunakan memiliki kemampuan yang konsisten dengan apa yang diperlukan ketika sedang digunakan secara terus menerus. ELISA kit AMH sudah melakukan proses validasi metode sebelum dipasarkan dan digunakan dilaboratorium untuk menentukan kadar AMH. AMH adalah biomarker spesifik yang digunakan untuk mendiagnosis pasien PCOS. Laboratorium dapat mengadopsi prosedur yang telah divalidasi tetapi laboratorium masih perlu mengkonfirmasi kemampuannya untuk menerapkan metode ini. Verifikasi adalah penyediaan bukti objektif bahwa parameter terukur memenuhi persyaratan yang ditentukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui seberapa baik verifikasi ELISA kit AMH dan membandingkan perhitungan 4 PL dengan regresi linear. Berdasarkan uji statistic diperoleh $p=0.871$ ($p>0.05$). Dapat dikatakan bahwa tidakada perbedaan yang bermakna antara *Optical Density* harike 1 danke 7 pada ($p=0.05$). Persamaan regresi linear (r) 0.9543 ($p=0.000$; $p<0.05$) sedangkan pada persamaan 4 PL (r) 1.000. Metode ELISA kit AMH telah memenuhi persyaratan verifikasi. Kurva kalibrasi model 4PL lebih sesuai digunakan pada ELISA kit AMH dari pada model regresi linear

KataKunci: Verifikasi ELISA AMH 4 Parameter Logistik

ABSTRACT

Validation is the process of confirming that the method used has capabilities that are consistent with what is needed while being used continuously. The AMH ELISA kit has carried out a method validation process before marketed and used in a laboratory to determine AMH levels. AMH is a specific biomarker used to diagnose PCOS patients. The laboratory can adopt a validated procedure but the laboratory still needs to confirm its ability to apply this method. Verification is the provision of objective evidence that the measured parameters meet the specified requirements. The purpose of this study was to find out how well verification of the ELISA AMH kit and comparing the calculation of 4 PL with linear regression. Based on the statistical test obtained $p = 0.871$ ($p > 0.05$). It can be said that there was no significant difference between Optical Density days 1 and 7 ($p = 0.05$). Linear regression equation (r) 0.9543 ($p = 0.000$; $p < 0.05$) while in equation 4 PL (r) 1,000. The ELISA kit AMH method meets the verification requirements. The 4PL model calibration curve is more suitable to be used in the AMH ELISA kit than the linear regression model.

Keywords : verification ELISA AMH 4 Logistic Parameter

PENDAHULUAN

Validasi metode pada dasarnya adalah proses mendefinisikan persyaratan analitis, dan mengkonfirmasi bahwa metode digunakan memiliki kemampuan yang konsisten dengan apa yang diperlukan ketika sedang digunakan secara terus menerus. Tujuan dari validasi metode adalah untuk menunjukkan bahwa metode sesuai untuk tujuan [1]. Parameter validasi menurut FDA, USP dan ICH meliputi spesifisitas, linearitas, presisi (*repeatability* dan *ruggedness*) akurasi, *solution stability*, *limit of detection* (LOD), *Limit of Quantification* (LOQ) dan Robutness [2]. Validasi metode perlu dilakukan karena hanya metode analisa yang telah dibuktikan validitas nya yang dapat dipertanggung jawabkan dan dipergunakan sebagai landasan, sehingga kesimpulan hasil yang diperoleh benar-benar dapat dipercaya.

Labolatorium dapat mengadopsi prosedur yang telah divalidasi oleh pabrikan, tetapi laboratorium masih perlu mengkonfirmasi kemampuannya untuk menerapkan metode ini. Verifikasi adalah penyediaan bukti objektif bahwa parameter terukur memenuhi persyaratan yang ditentukan, di mana persyaratan yang ditentukan memadai untuk penggunaan yang dimaksudkan [1].

Metode ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) merupakan analisis kuantitatif yang menunjukkan reaksi antigen-antibodi melalui perubahan warna yang diperoleh dengan menggunakan konjugat terkait enzim dan substrat enzim. Metode ELISA digunakan dalam mengidentifikasi keberadaan dan konsentrasi molekul dalam cairan biologis [3]. Dalam mengidentifikasi suatu molekul tertentu, ELISA kit yang digunakan harus spesifik terhadap antigen tersebut.

Dalam hal ini antigen spesifik yang ingin diidentifikasi adalah AMH (*Anti Mullerian Hormone*). AMH adalah biomarker spesifik yang digunakan untuk mendiagnosis pasien PCOS (*Polycystic Ovary Syndrome*) [4].

Pabrik yang memproduksi ELISA kit AMH sudah melakukan proses validasi metode sebelum dipasarkan dan digunakan di laboratorium untuk menentukan kadar AMH. Ruang lingkup verifikasi tergantung pada sifat perubahan dan hasil penilaian risiko [5]. Dalam hal ini parameter validasi yang digunakan untuk memverifikasi ELISA kit AMH adalah linearitas.

Linearitas merupakan parameter yang digunakan untuk menentukan kemampuan metode untuk memperoleh hasil yang proporsional dengan konsentrasi [6]. Dalam hal ini parameter linearitas digunakan untuk memverifikasi metode ELISA karena untuk melihat stabilitas larutan stok dan pengenceran yang tepat [7]. Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara terdeteksi variabel respon dan konsentrasi standar referensi yang dianggap mewakili analit dalam sampel uji [8]. Model perhitungan kurva kalibrasi pada metode ELISA untuk menentukan kadar AMH dapat menggunakan 4 parameter logistik (4 PL) dan regresi linear. Sehingga pada penelitian ini ingin mengetahui seberapa baik verifikasi ELISA kit AMH dan membandingkan perhitungan 4 PL dengan regresi linear dalam menentukan kadar AMH.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu iMark™ Microplate Absorbance Reader Bio-RAD, Inkubator 37 C ± 0,5 C, kertas penyerap dan pipet presisi.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Human AMH (*Anti Mullerian Hormone*) ELISA Kit (Elabscience®), yang terdiri dari Micro ELISA Plate, *Reference Standard, Concentrated Biotinylated Detection Ab, Concentrated HRP Conjugate, Reference Standard & Sample Diluent, Biotinylated Detection Ab Diluent, HRP Conjugate Diluent, Concentrated Wash Buffer, Substrate Reagent, Stop Solution, Plate Sealer* dan *Product Description*

PROSEDUR KERJA

Tambahkan 100 µL standar ke setiap sumur kemudian tutup dengan sealer. Inkubasi selama 90 menit pada suhu 37 ° C, kemudian keluarkan cairan dari masing-masing sumur, jangan dicuci. Segera tambahkan 100 µL larutan Biotinylated Detection Ab untuk masing-masing sumur. Tutup dengan sealer Plat. Lembut campur. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 ° C. Aspirasi atau tuang larutan dari masing-masing sumur, tambahkan 350 µL *wash buffer* ke setiap sumur. Rendam selama 1-2 menit dan buang larutan dari masing-masing sumur dan tepuk kering di atas kertas penyerap yang bersih. Ulangi langkah cucim ini 3 kali, kemudian tambahkan 100 µL

solusi kerja HRP Conjugate kemasing-masing sumur. Tutup dengan sealer Plat. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 ° C, lakukan kembali pencucian dengan pengulangan 5 kali, lalu tambahkan 90 µL substrat reagen kesetiap lubang. Tutup dengan sealer piring baru. Inkubasi selama sekitar 15 menit pada suhu 37 ° C. Lindungi piring dari cahaya. Tambahkan 50 µL dari *Stop Solution* kemasing-masing sumur lalu baca pada panjang gelombang 450

nm. Hasil OD hari 1 dan ke 7 dianalisis menggunakan SPSS version 2.1

HASIL DAN PEMBAHASAN

Verifikasi dilakukan dengan cara mengukur OD standard ELISA kit AMH dalam waktu yang berbeda yaitu hari ke 1 dan ke 7. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan dari standard ELISA kit AMH. Hasil pembacaan *optical density* (OD) dari konsentrasi standard AMH hari ke 1 dan hari ke 7 didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel I. OD (*Optical Density*) Standard AMH hari 1 dan hari 7

Konsentrasi (pg/mL)	OD (<i>Optical Density</i>)	
	hari ke 1	hari ke 7
0	0.056	0.057
46.875	0.063	0.055
93.75	0.069	0.065
187.5	0.092	0.073
375	0.121	0.119
750	0.193	0.176
1500	0.320	0.270
3000	0.618	0.514
6000	0.861	0.867
Rata-rata	0.26589	0.2440
SD	0.287575	0.277021

Tabel II. Hasil uji Independent *t* test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		Sig.	Sig. (2-tailed)		
Optical_	Equal variances	.821	.871		
Density	assumed				
	Equal variances		.871		
	not assumed				

Berdasarkan hasil uji independent *t* test diperoleh $p=0.871$ ($p>0.05$). Hal ini dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara OD hari ke 1 dan ke 7 pada

($p=0.05$). Sehingga dapat dikatakan bahwa ELISA kit AMH dalam keadaan baik dan dapat digunakan untuk menentukan kadar AMH dalam serum.

Tabelll. OD (*Optical Density*) Standard AMH

Konsentrasi (pg/mL)	<i>Optical Density</i> (OD)
0	-0.002
46.875	0.061
93.75	0.112
187.5	0.204
375	0.389
750	0.762
1500	1.483
3000	2.316
6000	2.943

Hubungan antara konsentrasi standard AMH dengan (OD) *Optical Density* diuji dengan persamaan regresi linearitas yaitu $Y=bx+a$ dan 4 parameter logistik (4PL). Perhitungan model 4 parameter logistik (4PL) menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Dimana:

y = Respons optical density

x = Konsentrasi

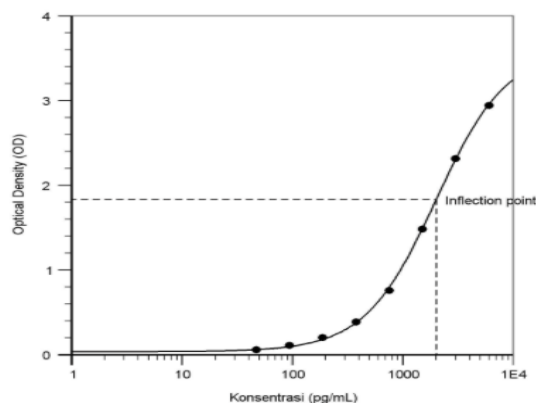
a = Respon terendah konsentrasi,

d = Respon tertinggi konsentrasi

c = Konsentrasi pada titik refleksi kurva

b = Faktor pertumbuhan.

(Stephanie, et al, 2018).

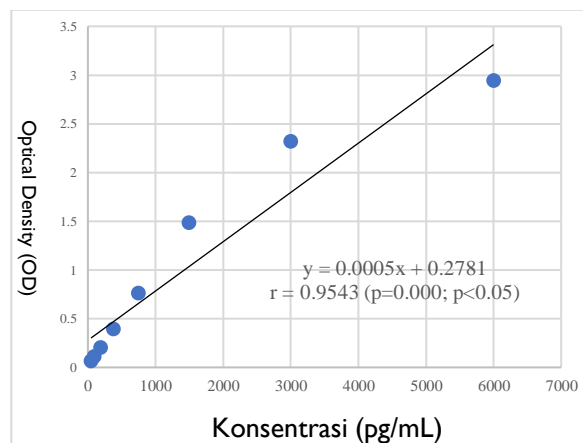


Gambar 1. Grafik Persamaan 4PL

Dari persamaan 4PL didapatkan hasil sebagai berikut:

$$y = 0.061 + \frac{3.551 - 0.061}{1 + \left(\frac{x}{1963.202}\right)^{-1.400}}$$

Dari model persamaan 4PL diperoleh koefisien korelasi (r) yaitu 1.000.



Gambar 2. Grafik Persamaan Regresi

Dari model persamaanya $y = 0.0005x + 0.2781$ diperoleh koefisien korelasi (r) yaitu 0.9543 ($p=0.000$; $p<0.05$). Koefisien korelasi adalah ukuran yang dipakai untuk mengetahui derajat hubungan antara dua variabel [9]. Nilai koefisien korelasi dengan persamaan regresi linear mempunyai nilai yang baik yaitu (r) 0.9543 ($p=0.000$; $p<0.05$). Sehingga dapat diartikan bahwa variabel konsentrasi standard AMH (X) memiliki pengaruh signifikan terhadap variabel *Optical Density* (Y). Ketika nilai koefisien korelasi (r) mendekati -1 atau +1 maka semakin baik, hal ini dikarenakan semua titik data terletak tepat di garis lurus, sehingga semakin kuat hubungan variabel (X) terhadap variabel (Y) [10].

Nilai koefisien korelasi dari persamaan 4PL adalah (r) 1.000. Nilai ini menunjukkan bahwa antara konsentrasi standard AMH terhadap *Optical Density* terdapat korelasi sebesar 100%. Menurut Referensi [11] hal ini

disebabkan karena terjadi peningkatan konsentrasi dua kali lipat dari standard AMH yang menyebabkan nilai *Optical Density* akan menjadi dua kali lipatnya sehingga pada saatnya nilai *Optical Density* akan cenderung melandai seperti yang terlihat pada gambar 1.

Pemilihan model kurva kalibrasi harus mempertimbangkan karakteristik dari ELISA kit hal bertujuan agar kurva kalibrasi dapat mengoptimalkan akurasi dan presisi pada seluruh rentang kalibrasi yang digunakan [12]. Pada ELISA kit AMH kurva kalibrasi yang sesuai untuk digunakan adalah dalam bentuk nonlinear. Model 4PL merupakan model yang sering digunakan untuk menggambarkan kurva sigmoid [13]. Meskipun nilai koefisien korelasi pada persamaan regresi linear telah membuktikan adanya pengaruh yang signifikan antara konsentrasi terhadap *Optical Density*. Model persamaan 4 PL dianggap lebih sesuai digunakan pada ELISA kit AMH.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa: ELISA kit AMH telah memenuhi persyaratan verifikasi dan kurva kalibrasi model 4PL lebih sesuai digunakan pada ELISA kit AMH daripada model regresi linear.

REFERENSI

1. Eurachem Guide. 2014 The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and

Related Topics 2nd. ISBN 978-91-87461-59-0

2. Chauhan ashish, Bharti M & Priyanka. 2015. Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques. (6) 1. pp 1-5. Doi: 10.4172/2155-9872.1000233
3. Aydin Suleyman. 2015. A Short History, Principles, and Types of ELISA, and our Laboratory Experience with Peptide/Protein Analyses Using ELISA. Peptides. (72). pp 4-15. Doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
4. Dewailly D, Claus Y.A, Adam B, Frank B, Nafi D, Renato F, Georg G, Tom W.K, Antonio L.M, Cornelius L, Helen M, Scott M.N, Jenny A.V, Hamish W and Richard A.A. 2014. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. **Human Reproduction**. (20) 3. pp 1-16. Doi: 10.1093/humupd/dmt062.
5. WHO. 2016. Guidelines On Validation Appendix 4 Analytical Method Validation Working
6. FDA. 2016. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds. pp 1-54
7. European Medicine Agency (EMA). 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation. Committee for Medicinal Products for Human Use.

- EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1
Corr. 2
8. Azadeh M., Gorovits B., Kamerud J., MacMannis S., Safavi A., Sailstad J., and Sondag P. 2017. Calibration Curves in Quantitative Ligand Binding Assays: Recommendations and Best Practices for Preparation, Design, and Editing of Calibration Curves. **The AAPS Journal**. 20(1). pp 1-16. doi: 10.1208/s12248-017-0159-4.
9. Samuel M & Lawrence E.O. 2015. The Relevance And Significance Of Correlation In Social Science Research. **International Journal of Sociology and Anthropology Research**. 3(1). pp 22-28. ISSN 2059-1209, ISSN 2059-1217
10. Schober P, Christa B & Lothar S. 2018. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. **Correlation Coefficients in Medical Research**. 126(5). pp. 1763-1768. doi: 10.1213/ANE.0000000000002864.
11. Masdor N.A, Altintas Z & Tohill I.E. 2016. Sensitive Detection Of *Campylobacter Jejuni* using Nanoparticles Enhanced QCM Sensor. **Biosens Bioelectron**: 78. pp 328–36. doi: 10.1016/j.bios.2015.11.033
12. John W.A. F & Robert F.D. 2007. Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays. **The AAPS Journal**. 9(2). pp 260-267. doi: 10.1208/11psj0902029
13. Hyun W.S, Weng K.W & Yarong Y. 2018. VNM: An R Package for Finding Multiple Objective Optimal Designs for the 4-Parameter Logistic Model. **Journal of Statistical Software**. 83(5). pp 1- 19. doi: 10.18637/jss.v083.i05