

Validasi Kit *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* Komersial untuk Analisis Hormon Estradiol dan Progesteron Darah Kambing Kacang

**(VALIDATION OF COMMERCIAL ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY KIT
FOR ANALYSIS OF ESTRADIOL AND PROGESTERONE HORMONE
IN BLOOD OF KACANG GOAT)**

Dedi Rahmat Setiadi^{1,2}, Iman Supriatna², Muhammad Agil²

¹Mahasiswa Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana

²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agathis, Lingkar Kampus IPB, Dramaga, Bogor. 16680
Telepon +622518629461, +622518623940/fax. : +622518623940
e-mail: derassy@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi kapabilitas dua kit ELISA komersial untuk manusia, yaitu produk DRG International Inc., Jerman dan GBC Taiwan dalam mengukur hormon estradiol (E2) dan progesteron (P4) dalam plasma darah kambing kacang. Tiga ekor kambing kacang betina berumur 2-3 tahun, kondisi sehat, memiliki siklus berahi/estrus normal, dan tidak bunting digunakan dalam penelitian ini. Sampel darah diambil dari vena jugularis menggunakan venoject 21 G setiap dua hari sekali dan diintensifkan setiap hari menjelang fase estrus, dan plasma disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan analisis. Validasi kapabilitas dilakukan dengan melakukan uji akurasi (paralelisme), sensitivitas, dan presisi. Uji paralelisme memperlihatkan bahwa kurva sampel paralel dengan kurva standar kit E2 dan P4 ELISA komersial DRG International Inc., sedangkan kurva sampel tidak paralel dengan kurva standar kit ELISA komersial GBC. Sensitivitas diukur dari konsentrasi terendah hormon estradiol dan progesteron kit DRG pada 90% *binding* adalah 25 pg/mL dan 0,14 ng/mL, sedangkan kit GBC pada 90% menunjukkan konsentrasi 5 pg/mL untuk estradiol dan 0,2 ng/mL untuk progesteron. Koefisien variasi intra- dan interasai pada kit DRG dan GBC adalah < 10%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kit ELISA komersial E2 dan P4 DRG cocok dan dapat digunakan untuk pengujian sampel plasma kambing kacang sedangkan kit ELISA komersial GBC tidak dapat mengukur konsentrasi hormon yang dianalisis

kata kunci : kambing kacang, estradiol, progesteron, ELISA

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the capability of two human commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (DRG International Inc., Germany and GBC Taiwan) for measuring estradiol (E2) and progesterone (P4) in plasma of kacang goat. Three healthy and non pregnant female kacang goats aged 2-3 years with regular estrous cycles were used in this study. Blood samples were collected from the jugular vein using a 21G venoject every two days and it was intensified every day during the period before heat. Collected plasma were stored at -20°C until the analysis. Capability validation was conducted by measuring accuracy (parallelism test), sensitivity and precision. Parallelism test using DRG commercial kit showed that sample curve was parallel with standard curve of E2 and P4. In contrast it was not parallel with standard curve of GBC commercial kit. Sensitivity was measured from the lowest hormones concentration of E2 and P4 at 90% binding that were 25 pg/ml and 0.14 ng/mL in DRG kit, while in GBC kit were 5 pg/mL of E2 and 0.2 ng/mL of P4, respectively. Coefisien of variation of intra- and interassay for both ELISA commercial kits were less than 10%. It can be concluded that DRG commercial ELISA kit E2 and P4 can be used to analyse female kacang goat blood plasma, while GBC commercial ELISA kit E2 and P4 are not recommended.

Keywords : kacang goat, estradiol, progesteron, ELISA

PENDAHULUAN

Penggunaan metoda *Enzyme Linked Immunosorbent Assay/ELISA* dalam analisis hormon baik untuk riset maupun penerapan klinis terus mengalami peningkatan. Keunggulan yang dimiliki teknik ELISA mengakibatkan teknik ini cepat populer. Di negara berkembang teknik ELISA lebih memungkinkan untuk dilakukan dibandingkan dengan *Radio Immunoassay (RIA)* karena tidak membutuhkan pemakaian isotop. Secara singkat dapat dikatakan bahwa teknologi ELISA yang digunakan untuk asai hormon dalam cairan tubuh adalah sistem *competitive enzyme immunoassay* yang analog dengan metoda *radio immunoassay (RIA)*. *Immunoassay* didasarkan pada reaksi kekebalan untuk pengukuran berbagai analit (misalnya antibodi, hormon) dalam bahan biologis (misalnya darah, urin, 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). Semua metode imunokimia didasarkan pada reaksi spesifik dan sensitif antara antigen dan antibodi, antigen dapat menginduksi antibodi yang dihasilkan dalam sistem imun pada hewan vertebrata atau manusia sebagai reaksi pertahanan tubuh (Koivunen dan Krogsrud, 2006). Pemanfaatan ELISA ini memiliki berbagai keunggulan dibandingkan RIA antara lain tidak perlu menggunakan bahan radioaktif, label yang stabil sehingga dapat disimpan lebih lama, deteksi aktivitas enzim hanya memerlukan alat fotometri (Entwistle dan Ridd, 1995), cepat dan tidak mahal (Fleming *et al.*, 1990).

Banyak penelitian yang telah dilakukan pada hewan ternak berhubungan dengan analisis hormon reproduksi seperti hormon estradiol dan progesteron. Menurut Relave *et al.*, (2007) teknik ELISA telah terbukti dapat diandalkan dan praktis untuk mengevaluasi tingkat hormon progesteron plasma kuda. Pada penelitian lain, kandungan hormon progesteron dan estradiol dalam darah juga telah dideteksi dan diukur melalui pengujian analisis hormon menggunakan kit ELISA komersial (*Fertigenix Prog-Easia*. Biosource Europe. SA dan *Fertigenix-E2-Easia*. Biosource Europe. SA) terhadap domba *akkaraman* di Turki (Risvanli *et al.*, 2010). Selain domba, pada kambing *nubian*

telah dilakukan pengujian hormon progesteron dengan menggunakan kit ELISA progesteron sapi (*Progestassay*. Pitman Moore. Washington Crossing. New Jersey) (Fleming *et al.*, 1990). Sebagian besar sampel yang digunakan adalah darah dalam bentuk serum atau plasma. Haisenleder *et al.*, (2011) melakukan evaluasi terhadap sembilan komersial EIA kit estradiol yang akan digunakan dengan serum tikus, yaitu uji komponen *recovery* dan korelasi. Kit ELISA untuk pengujian hormon estrogen dan progesteron khusus dari sampel hewan belum tersedia di Indonesia. Kit ELISA yang bisa diperoleh adalah kit ELISA untuk menganalisis hormon estrogen dan progesteron pada manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dan membandingkan kelaikan kit ELISA komersial estradiol dan progesteron untuk manusia (DRG International Inc. Jerman dan GBC Taiwan), apakah dapat digunakan menganalisis hormon estrogen dan progesteron pada kambing kacang. Diharapkan dengan penelitian ini dapat memberikan informasi tentang produk kit ELISA komersial yang tepat untuk digunakan dalam pemeriksaan hormon reproduksi dari sampel darah pada kambing kacang.

METODE PENELITIAN

Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah tiga ekor kambing kacang yang dipelihara di kandang percobaan Unit Rehabilitasi Reproduksi, Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi FKH-IPB, Dramaga, Bogor. Kambing kacang tersebut berumur 2-3 tahun, dalam kondisi sehat, memiliki siklus berahi/estrus normal, tidak bunting, pernah beranak dua kali, dan dikandangkan dalam kandang individu.

Pengambilan sampel darah dilakukan selama tiga siklus estrus melalui vena jugularis, menggunakan *syringe* 21 G dan tabung vakum yang berantikoagulan mengandung *etilen diamin tetra asetat (EDTA)* 1,8 mg/mL (*Disposable Evacuated Blood Collection Tubes*, *Zhejiang U-REAL Medical Technology Co. Ltd*) untuk pembuatan plasma yang akan dianalisis konsentrasi hormon estradiol dan progesteronnya.

Volume darah segar yang diambil sebanyak 5 mL. Pengambilan darah dilakukan setiap dua hari sekali dan dilakukan setiap hari pada saat

menjelang estrus (selama tiga hari). Darah segar disentrifugasi dengan kecepatan 1500-2000 G selama 10 menit (LT, 2007), kemudian plasma yang diperoleh dituangkan ke dalam tabung *microtube* 2 mL, dan disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan analisis di laboratorium.

Validasi Kit Komersial

Validasi dilakukan terhadap dua kit ELISA komersial estradiol dan progesteron untuk manusia dari dua perusahaan produk biologis yang berbeda yaitu DRG Internasional Inc., Jerman dan GBC Taiwan. Validasi ini untuk membandingkan dan menentukan akurasi, sensitivitas, dan presisi dari kedua kit ELISA komersial dalam menganalisis hormon E2 dan P4 pada sampel plasma darah kambing kacang.

Validasi kit ELISA komersial, dilakukan melalui prosedur dengan tahapan sebagai berikut :

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 (lima perbandingan bertingkat). Jumlah sampel yang diambil secara acak adalah lima sampel dari status atau fase yang berbeda dalam satu siklus estrus, kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dimulai dari 1:0 (larutan orisinal tanpa pengenceran), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 untuk setiap sampel tersebut menggunakan pengencer aquabidestilata. 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 terendah dari antigen yang dapat dibedakan secara statistika, dan bertujuan untuk menentukan nilai dua simpangan baku dari

rataan 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/rataan x 100.

Prosedur Pemeriksaan Hormon

Prosedur pemeriksaan hormon yang dikerjakan mengikuti prosedur yang dijelaskan oleh perusahaan produk biologis DRG International Inc. Jerman dan GBC Taiwan. Larutan standar estradiol dan progesteron dari DRG International Inc. mengalami modifikasi untuk mendapatkan *slope* kurva yang lebih baik, sedangkan GBC Taiwan tetap. Menurut Lee (2009) kit komersial untuk penelitian, QC atau kontrol sampel mungkin tidak tersedia, hal ini merupakan tanggungjawab analis untuk mengatur QC terhadap karakterisasi akurasi, presisi dan memantau kinerja asai. Prosedur asai secara keseluruhan adalah sebagai berikut :

Hormon Estradiol dan Progesteron DRG Jerman (EIA-2693 dan EIA-1561). Semua reagen dan sampel harus berada pada temperatur ruang. Sampel plasma diencerkan dalam aquabidestilata dengan perbandingan pengenceran bertingkat dimulai dari 1:0 (orisinal plasma)-1:16. Larutan standar 25 pg/mL dan 100 pg/mL dimodifikasi menjadi larutan standar baru 12,5 pg/ml dan 50 pg/ml untuk estradiol, dan larutan standar 1,25 ng/mL, 15 ng/mL dan 40 ng/mL dimodifikasi menjadi larutan standar baru 0,625 ng/mL, 10 ng/mL dan 20 ng/mL untuk progesteron. Sebanyak 25 μL duplo larutan standar (larutan standar 15 ng/mL tidak dipergunakan), masing-masing kontrol (konsentrasi 25 pg/mL dan 250 pg/mL untuk estradiol, 1,25 ng/mL dan 10 ng/mL untuk progesteron sebagai kontrol konsentrasi hormon rendah dan kontrol konsentrasi hormon tinggi), dan sampel ke dalam setiap sumur

terpilih, untuk progesteron diinkubasi selama lima menit pada temperatur ruang. Sebanyak 25 µL duplo larutan standar, kontrol (sebagai kontrol konsentrasi hormon rendah dan kontrol konsentrasi tinggi) dan sampel dimasukkan ke dalam setiap sumur terpilih. Setelah itu larutan enzim konjugat sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam setiap sumur kecuali *blank*, kemudian ditutup dengan *cling film* dan dihomogenkan dengan cara digoyangkan secara perlahan selama 10 detik dan masing-masing diinkubasikan selama 120 menit untuk estradiol dan 60 menit untuk progesteron pada temperatur ruang. Setelah diinkubasi, setiap sumur dicuci dengan *washing solution* masing-masing 400 µL selama 3-4 kali pencucian, kemudian dihentak-hentakan secara perlahan di atas kertas (*absorbence paper*) untuk mengeluarkan cairan dalam sumur-sumur secara tuntas. Larutan substrat sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam setiap sumur-sumur kemudian ditutup dengan *cling film* dan diinkubasi selama 15 menit pada temperatur ruang. Reaksi enzimatis dihentikan dengan menambahkan *stop solution* 0,5 M H₂SO₄ sebanyak 100 µL ke dalam setiap sumur-sumur dan pembacaan *absorbance* menggunakan ELISA reader otomatis dalam waktu 10 menit dengan panjang gelombang 450±10 nm dan referensi filter dengan panjang gelombang 630 nm.

Hormon Estradiol dan Progesteron GBC Taiwan (4S00071 dan 4S00121). Semua reagen dan sampel harus berada di temperatur ruang. Larutan *working reagent* dipersiapkan dengan menambahkan 0,1 mL progesteron-HRP konjugat dengan 0,9 mL pengencer progesteron-HRP konjugat (pengenceran 1:10) kemudian dihomogenkan. Sampel plasma darah diencerkan dalam aquabidestilata dengan perbandingan pengenceran bertingkat dimulai dari 1:0 (orisinal plasma)-1:16. Sebanyak 25 µL duplo larutan standar, kontrol, dan sampel dimasukkan ke dalam sumur terpilih. Setelah itu masing-masing larutan enzim konjugat (kit ELISA estradiol) dan larutan siap pakai progesteron-HRP konjugat (kit ELISA progesteron) sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam setiap sumur dilanjutkan masing-masing dengan memasukkan 50 µL *rabbit* anti-estradiol (kit ELISA estradiol) dan *rabbit* anti-progesteron (kit ELISA progesteron) ke dalam setiap sumur kecuali *blank*, kemudian ditutup dengan *cling film* dan dihomogenkan dengan cara digoyangkan secara perlahan selama 30 detik

dan diinkubasikan selama 90 menit pada temperatur ruang. Setelah diinkubasi, setiap sumur dicuci dengan *milli-Q water* masing-masing 400 µL selama 3-4 kali pencucian, kemudian dihentak-hentakan secara perlahan di atas kertas (*absorbence paper*). Larutan substrat TMB sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam setiap sumur kemudian ditutup dengan *cling film* dan diinkubasi selama 20 menit pada temperatur ruang. Reaksi enzimatis dihentikan dengan menambahkan *stop solution* 1N HCl sebanyak 100 µL ke dalam setiap sumur kemudian dihomogenkan secara perlahan selama 30 detik dan pembacaan *absorbance* menggunakan ELISA reader otomatis dalam waktu 15 menit dengan panjang gelombang 450 nm dan referensi filter dengan panjang gelombang 630 nm.

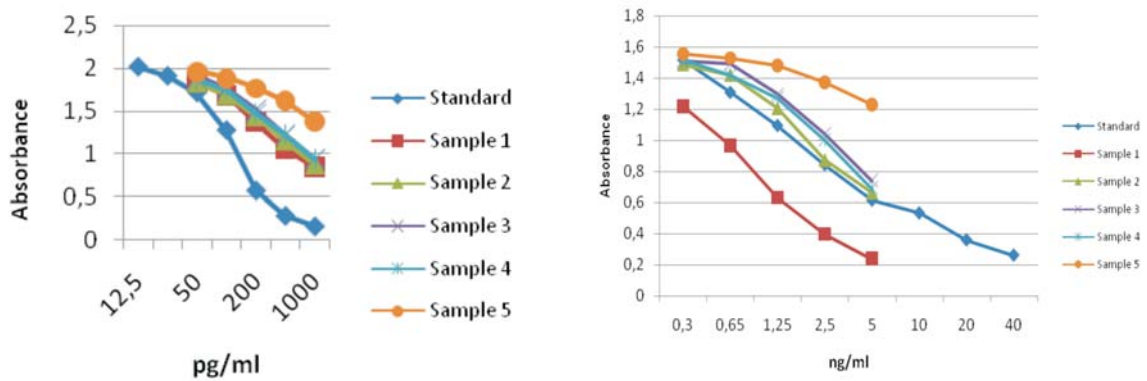
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji paralelisme yang dilakukan pada kit ELISA komersial E2 dan P4 (DRG International Inc., Jerman) menunjukkan bahwa kurva sampel sejajar dengan kurva standar (Gambar 1). Jumlah sampel yang diambil secara acak adalah lima sampel dari status atau fase yang berbeda dalam satu siklus estrus, kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dimulai dari 1:0 (larutan orisinal tanpa pengenceran), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 untuk setiap sampel tersebut menggunakan pengencer aquabidestilata. Mishra *et al.*, (2007) melakukan uji paralelisme somatotropin pada sampel serum dan air susu kerbau dengan perbandingan bertingkat 1:2-1:64. Perbandingan pengenceran untuk sampel kambing kacang yang diperoleh untuk E2 dan P4 adalah 1:2 dan 1:4.

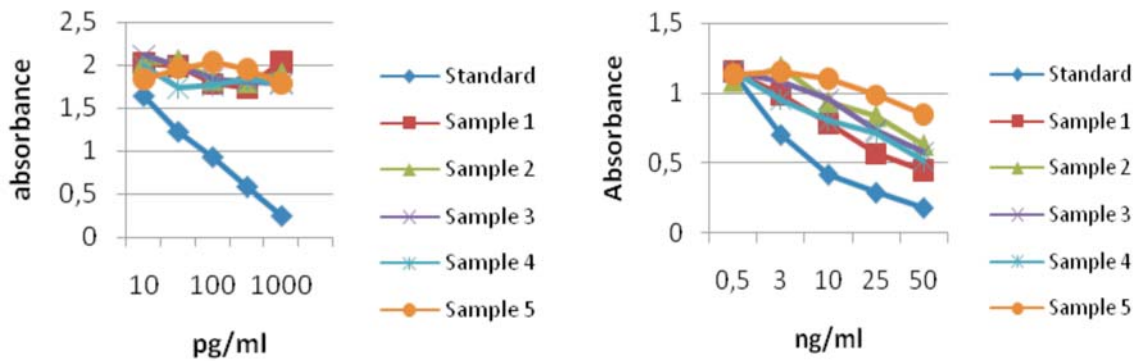
Uji paralelisme adalah uji penentuan kemampuan (dalam kisaran tertentu) kit ELISA memberikan hasil yang berbanding lurus dengan konsentrasi (jumlah) dari analit sampel (Ederveen, 2010). Pengujian ini juga dilakukan untuk menentukan apakah ELISA kit yang digunakan dapat mendeteksi keberadaan hormon tertentu yang diketahui. Uji paralelisme dapat juga digunakan untuk mengukur perbandingan pengenceran yang tepat pada saat akan menganalisis sampel. Hal ini sangat penting dilakukan terhadap ELISA kit yang baru dan belum pernah digunakan untuk menganalisis hormon tertentu pada suatu spesies. Uji tersebut penting dilakukan untuk mengetahui pengenceran sampel yang tepat

Tabel 1. Larutan standar dari empat kit ELISA komersial original dan modifikasi.

Standar	P4 DRG (ng/mL)		P4 GBC (ng/mL)		E2 DRG (pg/mL)		E2 GBC (pg/mL)
	Original	Modifikasi	Original	Original	Modifikasi	Original	
1	0,3	0,3	0,5	25	12,5	10	
2	1,25	0,625	3,0	100	25,0	30	
3	2,5	1,25	10,0	250	50,0	100	
4	5,0	2,5	25,0	500	100,0	300	
5	15,0	5,0	50,0	1000	250,0	1000	
6	40,0	10,0		2000	500,0		
7		20,0			1000,0		
8		40,0					



Gambar 1. Grafik uji paralelisme kurva sampel sejajar dengan kurva standar menggunakan kit ELISA komersial estradiol (A) dan progesteron (B) dari produk DRG International Inc., Jerman.



Gambar 2. Grafik uji paralelisme, kurva sampel tidak sejajar dengan kurva standar, menggunakan kit ELISA komersial estradiol (A) dan progesteron (B) GBC Taiwan.

digunakan untuk menganalisis sehingga menghasilkan angka konsentrasi hormon dalam batas nilai yang valid pada garis linier dari kurva hormon standar.

Lee (2009) menyampaikan juga bahwa paralelisme adalah uji linieritas pengenceran sampel otentik, tujuannya adalah untuk menunjukkan bahwa analit endogen dalam sampel yang tidak diketahui, yang mungkin berbeda dan/atau bervariasi dari standar menunjukkan hasil yang sama, terlepas dari pengenceran standar. Perbandingan pengenceran ini didapat dengan melihat kurva, yaitu membandingkan antara kurva standar dengan kurva sampel yang diuji, biasanya dilakukan beberapa perbandingan pengenceran (lima perbandingan bertingkat). Apabila kurva sampel yang diuji sejajar (paralel) dengan kurva standar berarti *hormone assay* yang digunakan dapat mendeteksi keberadaan hormon yang akan dianalisis.

Todini *et al.*, (2007) juga berhasil melakukan uji paralelisme estradiol pada kerbau, dan kurva sampel plasma kerbau sejajar dengan kurva standar. Fazielowanie *et al.*, (2011) menyatakan bahwa pada plasma ikan siakap betina (*Lates calcarifer*) yang disuntik dengan estradiol dan *vitellogenic* memperlihatkan garis kurva sampel sejajar dengan kurva standar. Uji paralelisme untuk hormon yang sama dari sampel yang berbeda dapat menunjukkan hasil yang berbeda walaupun pada spesies yang sama. Perez *et al.*, (2004) menyatakan bahwa hasil uji paralelisme hormon kortisol pada sampel air liur sapi menunjukkan kurva yang paralel dengan kurva standar, sementara itu dengan plasma darah sapi tidak paralel. Konsentrasi steroid yang bersirkulasi bebas dianggap sebagai yang paling akurat merefleksikan fungsi dari gonad, namun pengumpulan sampel darah sering kali sulit dilakukan pada hewan non-domestik (Graham *et al.*, 2001).

Pengujian terhadap kit ELISA komersial estradiol dan progesteron dari produk GBC (Taiwan) menunjukkan bahwa kurva sampel tidak sejajar dengan kurva standar (Gambar 2). Uji paralelisme pada asai hormon GBC memperlihatkan bahwa antibodi yang digunakan dalam asai tersebut tidak dapat menentukan jumlah konsentrasi hormon yang ada dalam sampel yang diukur, sehingga kedua kit asai hormon komersial tersebut tidak dapat dipergunakan untuk pengujian sampel plasma kambing kacang berikutnya. PB (2007)

menyatakan bahwa matriks sampel kemungkinan mengandung komponen yang dapat memengaruhi respons asai berbeda dengan standar. Simontacchi *et al.*, (1999) menyatakan jika hasil paralelisme tidak tercapai maka uji ini tidak valid dan menyiratkan bahwa baik sampel atau standar mengandung zat (antibodi) yang memengaruhi reaksi pengikatan yang berbeda pada hormon yang ada dalam sampel dengan hormon standarnya. Plikaytis *et al.*, (1994) mengemukakan bahwa tidak ada ketentuan secara umum dan banyak digunakan untuk menilai uji paralelisme dalam bioasai, dan jika tidak paralel maka antibodi tidak dapat menghitung perkiraan konsentrasi hormon dalam sampel.

Angka interval konsentrasi pada garis linier dari kurva yang diperoleh dari hasil uji paralelisme kedua kit komersial DRG untuk mendeteksi hormon estradiol dan progesteron masing-masing adalah 58-190 pg/mL dan 0,5-5,0 ng/mL, berarti nilai konsentrasi hormon sampel kambing kacang harus berada dalam interval angka tersebut, jika tidak, maka harus dilakukan penyesuaian terhadap pengenceran sampel. Seperti yang dikemukakan oleh PB (2007) bahwa komponen dalam matriks sampel yang menyebabkan konsentrasi hormon sampel tidak berada pada angka interval tersebut dan harus dilakukan penyesuaian pengenceran sampel untuk meminimalkan perbedaan tersebut.

Nilai hormon estradiol kambing kacang selama tiga siklus estrus yang dianalisis menggunakan kit komersial DRG sebagian besar berada dalam angka interval konsentrasi dengan rata-rata konsentrasi hormon sampel $170,6 \pm 43,0$ pg/mL. Nilai konsentrasi ini hampir sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Widiyono *et al.*, (2011) pada kambing bligon dengan nilai konsentrasi estradiol berkisar antara 211,25-247,77 pg/mL, sedangkan nilai konsentrasi hormon progesteron kambing kacang seluruhnya berada dalam angka interval dengan rata-rata konsentrasi hormon sampel $1,91 \pm 1,14$ ng/mL. Menurut Widiyono *et al.*, (2011) rata-rata progesteron kambing bligon adalah 0,21-0,70 ng/mL, Fleming *et al.*, (1990) melaporkan bahwa rata-rata konsentrasi progesteron kambing *nubian* pada saat tidak bunting adalah 0,16-2,80 ng/mL.

Konsentrasi terendah (sensitivitas) E2 dan P4 pada kit komersial ELISA DRG yang dapat diukur pada 90% *binding* adalah 25 pg/mL dan 0,14 ng/mL, sedangkan pada kit GBC

konsentrasi terendah pada 90% *binding* adalah 5 pg/mL untuk E2 dan 0,2 ng/mL untuk P4. Nilai koefisien variasi intraasai yang diperoleh adalah 6,81% (E2) dan 6,86% (P4), sedangkan interasai adalah 8,52% (E2) dan 7,23% (P4) untuk kit DRG. Koefisien variasi intraasai pada GBC tercatat 4,9% (E2) dan 7,1% (P4), sedangkan variasi interasai tidak dapat dihitung karena asai tersebut tidak digunakan untuk analisis lebih lanjut. Menurut Relave *et al.*, (2007) spesifitas untuk mendeteksi tingkat hormon progesteron plasma kuda adalah lebih tinggi dari 1,0 ng/mL. Presisi mengacu pada pengulangan nilai yang diukur atau konsistensi hasil (Brown *et al.*, 2005). 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).

Kit ELISA komersial estradiol dan progesteron produk GBC tidak menunjukkan hasil yang sama dengan produk DRG, hal ini disebabkan karena adanya kemungkinan keterlibatan substansi yang mengganggu terhadap pengikatan antara antibodi dan antigen berlabel (enzim konjugat) karena enzim konjugat tidak mampu memberikan sinyal yang dapat diukur. Plasma memiliki viskositas yang tinggi dan mengandung total protein ± 4 g/L lebih tinggi dari serum karena mengandung fibrinogen dan faktor pembekuan lain (Lundblad, 2005). Simontacchi *et al.*, (1999) menyatakan jika hasil paralelisme tidak tercapai maka uji ini tidak valid dan menyiratkan bahwa baik sampel atau standar mengandung zat (antibodi) yang mempengaruhi reaksi pengikatan yang berbeda pada hormon yang ada dalam sampel dengan hormon standarnya. Menurut Plikaytis *et al.*, (1994) tidak ada ketentuan secara umum dan banyak digunakan untuk menilai uji paralelisme dalam bioasai, dan jika tidak paralel maka antibodi tidak dapat menghitung perkiraan konsentrasi hormon dalam sampel.

Menurut Bowen *et al.*, (2010), ketika plasma yang digunakan untuk asai diagnostik, hendaknya harus hati-hati dalam memilih antikoagulan yang tepat, umumnya yang dipergunakan adalah EDTA, heparin, dan sitrat.

Antikoagulan yang ditambahkan harus dalam konsentrasi tepat untuk melindungi analit guna mencegah intervensi terhadap pengikatan atau presipitasi antigen-antibodi (Haab *et al.*, 2005).

SIMPULAN

Hasil pengujian memperlihatkan bahwa kit ELISA komersial estradiol dan progesteron (DRG International Inc., Jerman) untuk manusia, cocok dan dapat digunakan untuk pengujian sampel plasma kambing kacang dengan perbandingan pengenceran 1:2 dan 1:4.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi hormon E2 dan P4 yang dikandung oleh kambing kacang selama siklus estrus/berahi sehingga diketahui profil hormonalnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh Laboratorium Analisa Hormon, Unit Rehabilitasi Reproduksi, Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, FKH-IPB tahun 2012, untuk itu semua kami mengucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Botus D, Samarineanu M, Turcu A. 2009. The validation of an ELISA kit for ruminant paratuberculosis diagnostic. *Lucrari Stiintifice Medicina Vet* 42 (1) : 241-248
- Bowen RAR, Hartin GL, Csako G, Otanez OH, Remaley AT. 2010. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clin Biochem* 43 (1-2): 4-25
- Brown J, Walker S, Steinman K. 2005. *Endocrine Manual for Reproductive Assessment of Domestic and Non-Domestic Species*. Virginia. Smithsonian's National Zoological Park.
- Entwistle KW, Ridd CAJ. 1995. *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian : Asai Hormon dengan ELISA*. Editor G. W. Burgess. Terjemahan : WT Artama dan E Moeljono. Yogyakarta. Gajah Mada University Press.

- Ederveen. 2010. *A Practical Approach to Biological Assay Validation: Assay Validation Parameters*. Progress Project Management and Engineering.
- Fazielawanie NMR, Siraj SS, Harmin SA, Ina-Salway MY and Nik Daud NS. 2011. Development and validation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) vitellogenin in *Lates calcarifer*. *J Fisheries and Aquatic Scie* 6 (7):715-727
- Fleming SA, Steven DVC, Heath MC. 1990. Serum progesterone determination as an aid for pregnancy diagnosis in goats bred out of season. *J Can Vet* 31 (2): 104-107
- Graham L, Schwarzenberger F, Mostl E, Galama W, and Savage A. 2001. A Versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. *Zoo Biology* 20 (3):227–236
- Haab BB, Geierstanger BH, Michailidis G. 2005. Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO plasma proteome project reference specimens; systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. *Proteomics* 5 (13): 3278-3291
- Haisenleder DJ, Schoenfelder AH, Marcinko ES, Geddis LM, Marshall JC. 2011. Estimation of estradiol in mouse serum samples: evaluation of commercial estradiol immunoassays. *Ndicrine Society* 152 (11): 4443
- Heistermann M, Tari S, Hodges JK. 1993. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in new world primates, callitrichidae. *J Reprod Fertil* 99: 243-251
- Koivunen ME, Krogsrud RL. 2006. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine* 37 (8): 490-497
- Lee JW. 2009. Method validation and application of protein biomarkers; basic similarities and differences from biotherapeutics. *Bioanalysis* 1 (8): 1461-1474
- LT (Life Technologies). 2007. *Plasma and Serum Preparation*. [1 Januari 2007]. BioSource. p 1107.
- Lundblad RL. 2005. Consideration for the use of blood plasma and serum for proteomic analysis. *J Internet Genomics and Proteomics* 2 : 1-16
- Mishra A, Goswami TK, Shukla DC. 2007. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure growth hormone level in serum and milk of buffaloes (*Bubalus bubalis*). *J Indian Exp Biol* 45 : 594-598
- PB (Pierce Biotechnology). 2007. *Spike-and-Recovery and Linearity of Dilution Assessment*. Thermo Fisher Scientific Inc. Pierce Biotechnology. Rockford. USA.
- Perez GC, Laita SGB, Illera del Portal JC and Leisa JP. 2004. Validation of an EIA technique for the determination of salivary cortisol in cattle. *J Span of Agri Research* 2 (1): 45-51
- Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL and Carlone GM. 1994. Determination of parallelism and nonparallelism in bioassay dilution curves. *J Clin Microbiol* 32 (10): 2441-2447.
- Relave F, Lefebvre RC, Beaudoin S, Price C. 2007. Accuracy of rapid enzyme-linked immunosorbent assay to measure progesterone in mares. *J Can Vet*. 48 (8): 823-826
- Risvanli A, Orkun D, Murat A, Nevzat S, Tayfur B, Fatih K, Secil N and Tansel AB. 2010. Effect of different forms of prostaglandin F₂ analogues administration on hormonal profile, prostaglandin F₂ binding rate and reproductive traits in Akkaraman sheep during the breeding season. *Acta Scie Vet* 38 (4): 391-398
- Savage JA, Paspaliaris B, Silvestrini R, Davies D, Nikoloutsopoulos T, Sturgess A, Neil J, Pollock W, Dunster K, Hendle M. 1998. A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J Clin Pathol* 51 (8):568-75
- Simontacchi C, Marinelli L, Gabai G, Bono G and Angeletti R. 1999. Accuracy in naturally occurring anabolic steroid assays in cattle and first approach to quality control in Italy. *Analyst* 124 (3): 307-312
- Todini L, Terzano GM, Malfatti A. 2007. Validation of ELISA kits for determination of inhibin-A and estradiol 17-beta concentrations in buffalo plasma. *Ital. J Anim Sci* 6(Suppl.2): 585-588
- Widiyono I, Putro PP, Sarmin, Astuti P, Airin CM. 2011. Kadar estradiol dan progesteron serum, tampilan vulva dan sitologi apus vagina kambing bligon selama siklus birahi. *J Veteriner* 12 (4): 263-268.