



Evaluasi Validitas *Human Cortisol Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit* dan Waktu Sentrifugasi Sampel Darah untuk Pengukuran Konsentrasi Hormon Kortisol pada Kambing Kacang

(Evaluation the Validity of Human Cortisol Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit and Centrifugation Time of Blood Sample for Measuring the Concentration of Cortisol in Kacang Goats)

Gholib^{1*}, Sri Wahyuni², Rahma Melinda³, dan Muslim Akmal⁴

¹Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

²Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

³Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

⁴Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

ABSTRAK. Penggunaan *human cortisol enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit* untuk pengukuran hormon kortisol pada hewan dan keterlambatan waktu sentrifugasi sampel darah untuk analisis hormon perlu dievaluasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi validitas *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887, DRG Instruments GmbH, Germany) untuk pengukuran konsentrasi kortisol dan menguji pengaruh keterlambatan waktu sentrifugasi sampel darah terhadap stabilitas konsentrasi kortisol pada kambing kacang. Sampel darah dikoleksi dari delapan ekor kambing kacang. Uji validitas kit EIA-1887 dilakukan secara: a) analitik (uji *parallelism*, akurasi, dan presisi), dan b) biologis (pengukuran kortisol sebelum dan setelah transportasi). Uji keterlambatan waktu sentrifugasi terhadap stabilitas konsentrasi kortisol dilakukan dengan 5 perlakuan yaitu disentrifugasi kurang dari 1 jam (P1/kontrol), 6 jam (P6), 12 jam (P12), 18 jam (P18), dan 24 jam (P24) setelah darah dikoleksi. Data uji *parallelism* dianalisis dengan uji persamaan kemiringan, uji presisi dihitung % CV (*coefficient variation*) *intra-assay* dan *inter-assay*, uji akurasi dihitung % *recovery*, uji T untuk validasi biologis, dan uji ragam (*One Way Anova*) untuk pengaruh waktu sentrifugasi. Hasil uji *parallelism* menunjukkan kurva sampel kambing kacang sejajar/paralel dengan kurva standar kortisol. Akurasi kit EIA-1887 adalah $103,43 \pm 7,85\%$, dan % CV *intra-assay* dan *inter-assay* adalah $<10\%$. Konsentrasi kortisol setelah transportasi secara signifikan lebih tinggi daripada sebelum transportasi ($p < 0,05$). Adanya penurunan secara nyata konsentrasi kortisol pada darah yang disentrifugasi 24 jam (P24) setelah koleksi ($p < 0,05$). Kesimpulan, *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887) memiliki validitas yang baik secara analitik dan biologis untuk digunakan dalam pengukuran konsentrasi kortisol pada kambing kacang. Keterlambatan waktu sentrifugasi selama 24 jam berpengaruh terhadap konsentrasi kortisol.

Kata kunci: *human cortisol ELISA kit*, kambing kacang, kortisol, validasi, waktu sentrifugasi

ABSTRACT. The use of *human cortisol ELISA kit* for measuring cortisol in animals and delayed to blood centrifugation time for hormone measurement need to be evaluated. This study aimed to evaluate the validity of *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887, DRG Instruments GmbH, Germany) for cortisol measurement and effect of delayed to blood centrifugation time on cortisol concentrations in kacang goats. Blood was collected from eight kacang goats. Validation test of EIA-1887 kit was performed through: a) analytical (*parallelism*, accuracy, and precision tests), and b) biological validations (measuring cortisol concentrations before and after transportation). Five treatments were performed to test delayed to centrifugation time: blood centrifuged at 1 h (control, P1), 6 h (P6), 12 h (P12), 18 h (P18), and 24 h (P24) after collection. *Parallelism* data were analyzed by *slope equality test*, precision and accuracy calculated by % CV of *intra-and inter-assay*, and % *recovery*, respectively. Data of biological validation and centrifugation time effects were analyzed by *Student t-test*, and *one way ANOVA*, respectively. Results of *parallelism* showed that serial dilution curve of kacang goat plasma was parallel with cortisol standard curves. Accuracy of EIA-1887 kit was $103.43 \pm 7.85\%$, and % CV of *intra-and inter-assay* were $<10\%$. Concentration of cortisol after transportation was significantly higher than before transportation ($p < 0.05$). Concentration of cortisol was significantly decreased when blood was centrifuged at 24 h after collection ($P < 0.05$). In conclusion, *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887) is a reliable assay for measuring cortisol in plasma of kacang goat. Delayed to blood centrifugation time affect cortisol concentrations.

Keywords: Cortisol, *human cortisol ELISA kit*, kacang goats, time of centrifugation, validation

PENDAHULUAN

Hormon kortisol merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh kelenjar adrenal bagian

korteks sebagai respon tubuh terhadap adanya *stressor* (Sheriff *et al.*, 2011). Hormon ini sering dijadikan sebagai indikator untuk memonitor adanya stres sebab konsentrasi kortisol akan meningkat ketika tubuh mengalami cekaman (Gholib *et al.*, 2020a). Stres yang bersifat kronis (berlangsung lama) akan menyebabkan penurunan imunitas tubuh dan gangguan kesehatan

*Email Korespondensi: gholib@unsyiah.ac.id
Diterima: 29 September 2020
Direvisi: 18 Februari 2021
Disetujui: 20 Maret 2021
DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v21i1.18183>

reproduksi seperti menghambat sekresi hormon reproduksi yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), *Luteinizing Hormone* (LH), estradiol, dan testosteron (Bova *et al.*, 2014). Pada betina, kortisol secara langsung berdampak pada gangguan ovulasi, fertilisasi, proses implantasi, bahkan kematian embrio (Siregar *et al.*, 2017). Pada jantan, kortisol akan mengganggu perilaku reproduksi, ereksi, dan penurunan sekresi testosteron (Wingfield & Sapolsky, 2003). Oleh karena itu, pengukuran kortisol sangat berguna untuk membantu manajemen pemeliharaan dan reproduksi serta memonitor kesejahteraan hewan.

Metode pengukuran konsentrasi kortisol yang paling umum digunakan adalah *radio immuno assay* (RIA) dan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). RIA merupakan metode yang telah lama digunakan, tetapi metode ini menggunakan bahan radioaktif sebagai konjugat, sehingga diperlukan penanganan khusus terhadap limbah yang dihasilkan. Metode ELISA merupakan metode imunologi dengan memanfaatkan enzim sebagai konjugat, sehingga metode ini lebih aman dan banyak digunakan untuk pengukuran hormon kortisol saat ini (Gholib *et al.*, 2020b). Hal ini karena metode ELISA tidak menggunakan bahan radioaktif, hanya memerlukan alat fotometri untuk deteksi aktivitas enzim, mudah dikerjakan, relatif murah, dan memiliki sensitivitas yang baik (Kinn Rød *et al.*, 2017).

Saat ini telah banyak dijual kit ELISA komersial untuk pengukuran kortisol, salah satunya adalah *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887, DRG Instruments GmbH, Germany). Hal ini semakin mempermudah aplikasi pengukuran konsentrasi kortisol menggunakan metode ELISA. Namun, *human cortisol ELISA kit* merupakan kit ELISA yang dikembangkan untuk pengukuran konsentrasi kortisol pada manusia. Oleh karena itu, penggunaan *human cortisol ELISA kit* pada hewan diperlukan evaluasi validitas kit ELISA tersebut. Namun, sampai saat ini belum ada informasi terkait evaluasi validitas *human cortisol ELISA kit* untuk digunakan pada kambing kacang. Oleh karena itu perlu dilakukan validasi secara analitik, dan biologis. Validasi analitik merupakan uji yang dilakukan untuk melihat sejauh mana kemampuan dan validitas antibodi pada *human cortisol ELISA kit* mampu berikatan dengan antigen (kortisol) pada sampel kambing kacang yang akan dianalisis (Gholib *et al.*, 2020a). Validasi analitik meliputi uji *parallelism* atau linieriti, sensitivitas dan spesifikasi, akurasi, dan presisi (Gholib *et al.*, 2020b). Validasi biologis merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui

kemampuan *human cortisol ELISA kit* dalam mengukur variasi konsentrasi kortisol sehingga mampu menggambarkan kondisi fisiologis hewan (Gholib *et al.*, 2020a). Validasi biologis pengukuran kortisol dapat dilakukan dengan membandingkan variasi kortisol pada hewan sebelum dan setelah mengalami stres seperti sebelum dan setelah transportasi atau translokasi hewan (Gholib *et al.*, 2020a).

Selain evaluasi validitas kit ELISA yang digunakan, faktor penting lain yang juga harus dievaluasi sebelum analisis konsentrasi kortisol adalah waktu sentrifugasi sampel darah setelah dikoleksi. Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa faktor teknis seperti penanganan sampel darah, jenis sampel yang digunakan (plasma atau darah), dan penyimpanan sampel dapat memengaruhi konsentrasi hormon (Hegstad-Davies 2006; Raff dan Sluss 2008; Ceglarek *et al.*, 2010). Terlambatnya waktu sentrifugasi darah dilaporkan menyebabkan perubahan pada konsentrasi hormon progesteron (De Castro *et al.*, 2004), hormon adrenokortikotropik (Christensen *et al.*, 2016; Preissner *et al.*, 2004), dan hormon paratiroid (Omar *et al.*, 2001). Akan tetapi, sampai saat ini belum ada penelitian terkait pengaruh keterlambatan waktu sentrifugasi sampel darah terhadap konsentrasi kortisol baik pada manusia, maupun hewan apalagi pada kambing kacang. Oleh karena itu, maka penting mengevaluasi ada tidaknya pengaruh keterlambatan waktu sentrifugasi sampel darah setelah dikoleksi terhadap stabilitas konsentrasi kortisol pada kambing kacang.

Kambing kacang merupakan kambing yang telah dibudidayakan secara luas di Indonesia. Kementerian Pertanian, Indonesia juga telah menetapkan kambing kacang sebagai salah satu plasma nutfah kambing asli Indonesia berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian tahun 2012 Nomor 2840/Kpts/LB.430/8/2012 (Deptan, 2012). Kambing kacang memiliki potensi yang baik untuk dikembangkan di Indonesia sebagai salah satu sumber daging sebab memiliki indeks reproduksi yang baik dan bersifat proliflik. Oleh karena itu pengukuran konsentrasi kortisol dapat digunakan untuk mendukung keberhasilan dalam manajemen pemeliharaan kambing kacang terutama memonitor tingkat stres, dan kesejahteraan hewan. Tujuan dari penelitian ini adalah 1) mengevaluasi validitas *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887, DRG Instruments GmbH, Germany) secara analitik dan biologis untuk digunakan dalam pengukuran konsentrasi kortisol pada kambing kacang, dan 2)

mengevaluasi pengaruh keterlambatan waktu sentrifugasi sampel darah terhadap stabilitas konsentrasi kortisol pada kambing kacang.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Sampel darah dikoleksi dari kambing kacang yang dipelihara peternak di Darussalam, Aceh Besar. Kambing kacang yang digunakan berumur 2-3 tahun dengan bobot badan 15-20 kg dan dalam kondisi sehat. Pada penelitian ini digunakan sebanyak delapan ekor kambing kacang untuk beberapa perlakuan dengan jumlah dan waktu pengambilan sampel darah yang berbeda pada tiap perlakuan. Untuk uji validasi analitik (uji *parallelism*) *human cortisol ELISA kit*, digunakan sampel darah dari dua ekor kambing kacang, sedangkan untuk validasi biologis dan uji akurasi digunakan sampel darah dari enam ekor kambing kacang. Untuk evaluasi pengaruh keterlambatan waktu sentrifugasi digunakan sampel darah dari lima ekor kambing kacang yang diambil dari delapan ekor kambing kacang untuk uji validasi di atas. Alat dan bahan yang digunakan adalah *centrifuge*, *ELISA reader* (*xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer*, *Bio-Rad Laboratories Inc.*), *ELISA washer* (*Bio-Rad Laboratories Inc.*), *ethylen diamine tetraacetic acid* (EDTA), dan kit *ELISA kortisol komersial EIA-1887 (DRG Instruments GmbH, Jerman)*.

Koleksi dan Preparasi Sampel Darah

Darah kambing kacang diambil sebanyak 4 ml melalui vena jugularis menggunakan spuit 5 ml yang telah diberi antikoagulan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA). Setelah dikoleksi, darah disentrifugasi dengan kecepatan 1200 x g (rcf) selama 10 menit pada suhu 4 °C. Plasma darah yang diperoleh dituang ke dalam tabung mikro 1,5 ml (*Eppendorf Safe-Lock tubes*) dan disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -20 °C sampai dilakukan analisis hormon kortisol.

Uji Validasi Analitik *Human Cortisol ELISA Kit (EIA-1887)*

Untuk menguji kemampuan dan ketepatan *human cortisol ELISA kit* dalam mengukur konsentrasi kortisol pada plasma darah kambing kacang, dilakukan uji validasi analitik seperti yang dijelaskan oleh Gholib *et al.*, (2020a). Validasi analitik yang dilakukan terdiri dari uji *parallelism* atau uji linieriti, akurasi, dan presisi, sedangkan spesifikasi dan sensitivitas dilaporkan sesuai data

yang tercantum pada buku panduan *human cortisol ELISA kit (EIA-1887)*.

Uji *Parallelism*

Dua sampel plasma dari kambing kacang sebelum dan setelah transportasi (sampel A: plasma sebelum transportasi, dan sampel B: plasma setelah transportasi) digunakan untuk uji *parallelism/ linieriti*. Transportasi kambing kacang dilakukan menggunakan kendaraan *pick up* selama 3 jam dengan kecepatan 40-60 km/jam. Kedua sampel plasma tersebut diencerkan secara bertingkat menggunakan larutan *assay buffer* dengan perbandingan 1:2; 1:4; 1:8; 1:16. Sampel plasma yang telah diencerkan kemudian diukur konsentrasi kortisol bersamaan dengan standar kortisol (konsentrasi standar kortisol *human cortisol ELISA kit (EIA-1887)* adalah 10-400 ng/mL). Selanjutnya hasil pengukuran dari plasma A, B, dan standar kortisol dibuat kurva regresi linier antara nilai absorbansi dan konsentrasi kortisol untuk standar dan antara nilai absorbansi dan pengenceran untuk sampel A dan B seperti yang dijelaskan oleh Gholib *et al.*, (2020a). Kurva regresi dari plasma A dan B yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan kurva regresi dari standar kortisol untuk melihat apakah posisi kurva plasma A dan B sejajar atau paralel dengan kurva standar kortisol dengan cara membandingkan nilai *slope* (kemiringan) masing-masing kurva.

Uji Akurasi

Untuk uji akurasi *human cortisol ELISA kit (EIA-1887)* digunakan enam sampel plasma yang dikoleksi dari enam kambing kacang. Dari masing-masing sampel diambil sebanyak 200ul dan dimasukkan ke dalam tabung mikro. Tahap selanjutnya ditambahkan standar kortisol yang telah diketahui konsentrasinya yaitu 100 ng/ml sebanyak 200ul. Campuran antara sampel plasma dengan standar kortisol dengan konsentrasi yang telah diketahui tersebut selanjutnya dianalisis konsentrasi aktualnya di laboratorium. Konsentrasi yang terukur di laboratorium selanjutnya dibandingkan dengan konsentrasi yang telah diketahui untuk menentukan tingkat akurasi dalam analisis hormon dengan menghitung % *recovery*.

Uji Presisi

Uji presisi dilakukan dengan menghitung nilai *coefficient variation* (CV) dalam satu *microplate* atau yang disebut *intra-assay-CV* dan antar *microplate* atau yang disebut *inter-assay-*

CV. Untuk uji presisi, digunakan dua jenis kontrol standar (*quality control*) yaitu *low* dan *high*. *Low quality control* (QC-L) merupakan standar kortisol dengan konsentrasi 20 ng/mL, sedangkan *high quality control* (QC-H) adalah 200 ng/mL. *Low quality control* dan QC-H masing-masing sebanyak 6 aliquot dimasukkan ke dalam sumur pada satu *microplate* dan selanjutnya diukur konsentrasi kortisolnya. Konsentrasi yang terukur dari QC-L dan QC-H kemudian digunakan untuk menghitung *intra-assay-CV*. Selain itu, sebanyak 6 aliquot QC-L dan 6 aliquot QC-H diukur konsentrasi kortisol pada 6 *microplate* yang berbeda. Konsentrasi yang terukur dari QC-L dan QC-H kemudian digunakan untuk menghitung CV pada *microplate* yang berbeda atau yang disebut *inter-assay-CV*.

Uji Validasi Biologis Human Cortisol ELISA Kit (EIA-1887)

Untuk mengevaluasi kemampuan *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887) dalam mengukur variasi konsentrasi kortisol sesuai dengan keadaan fisiologis hewan yaitu sebelum dan setelah stres, maka dilakukan uji validasi biologis. Validasi biologis dilakukan dengan cara perlakuan transportasi pada kambing kacang. Kambing kacang sebanyak enam ekor diambil sampel darah pada pukul 08.00-10.00 WIB sebelum dinaikkan ke atas kendaraan *pick up* (*pre-transportation*). Setelah diambil sampel darah, kambing kacang dinaikkan ke atas kendaraan dengan posisi berdiri. Transportasi dilakukan selama 3 jam (11.00 – 14.00) menelusuri jalan raya di Aceh Besar dan Banda Aceh dengan kecepatan 40-60 km/jam. Pada saat perlakuan transportasi, kambing kacang tidak diberi makan dan minum selama perjalanan. Satu jam setelah perjalanan (15.00 WIB), sampel darah kembali dikoleksi dari enam kambing kacang tersebut (*post-transportation*). Darah selanjutnya dipreparasi menjadi plasma dan disimpan di dalam freezer dengan suhu -20°C sampai dilakukan analisis hormon kortisol.

Percobaan Pengaruh Keterlambatan Waktu Sentrifugasi Sampel Darah

Percobaan pengaruh keterlambatan waktu sentrifugasi sampel darah dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap Pola Searah dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan. Banyaknya ulangan dihitung berdasarkan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$; t = jumlah perlakuan dan n = jumlah ulangan. Hasil perhitungan menggunakan rumus Federer diperoleh jumlah $n = 4,75 \sim 5$ ulangan. Sampel darah dikoleksi dari 5 ekor kambing

kacang yang diambil secara acak dari delapan ekor kambing pada penelitian ini. Darah diambil sebanyak 5 mL dari setiap kambing kacang dan dimasukkan ke dalam tabung berisi EDTA. Darah dari setiap individu tersebut selanjutnya dibagi menjadi lima bagian dan dimasukkan ke dalam 5 tabung Eppendorf yang berbeda (1 mL/tabung), sehingga total sampel darah 25 tabung (5 ekor x 5 tabung). Selanjutnya darah disentrifugasi dengan perlakuan sebagai berikut:

- P1 = Darah disentrifugasi kurang dari 1 jam setelah dikoleksi (kontrol, $n = 5$),
- P6 = Darah disentrifugasi 6 jam setelah dikoleksi ($n = 5$),
- P12 = Darah disentrifugasi 12 jam setelah dikoleksi ($n = 5$),
- P18 = Darah disentrifugasi 18 jam setelah dikoleksi ($n = 5$), dan
- P24 = Darah disentrifugasi 24 jam setelah dikoleksi ($n = 5$).

Sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan $1200 \times g$ selama 10 menit dengan suhu 4°C . Plasma yang diperoleh kemudian disimpan di dalam freezer -20°C sampai dilakukan analisis hormon kortisol.

Analisis Hormon Kortisol

Pengukuran konsentrasi kortisol dilakukan mengikuti petunjuk dari panduan *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887). Tahap awal disiapkan larutan standar kortisol dengan konsentrasi 10, 20, 50, 100, 200, dan 400 ng/mL, dan *Low Quality Control* (QC-L) dengan konsentrasi (20 ng/mL) dan QC-H (200 ng/mL). Sebanyak 20 μL larutan standar, sampel plasma, QC-L, dan QC-H dimasukkan ke dalam sumur-sumur (*wells*) *microplate* ELISA. Selanjutnya ditambahkan *enzyme conjugate* sebanyak 200 μL ke dalam setiap sumur kecuali sumur *blank*, dan ditutup dengan *cling film*. Setelah itu, larutan dihomogenkan selama 10 detik dengan cara digoyangkan perlahan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Setelah inkubasi, *microplate* ELISA dicuci menggunakan larutan pencuci (*washing solution*) masing-masing 300 μL sebanyak empat kali pencucian. *Microplate* ELISA kemudian ditambahkan larutan substart (*tetramethylbenzidine*) sebanyak 100 μL ke dalam setiap sumur dan ditutup dengan *cling film* lalu diinkubasi kembali selama 20 menit pada suhu ruang. Sebanyak 100 μL *stop solution* (0.5M H_2SO_4) ditambahkan ke dalam setiap sumur untuk menghentikan reaksi enzimatis. Tahap akhir dilakukan pengukuran *absorbance* menggunakan ELISA reader (*xMark™ Microplate Absorbance*

Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories Inc.) pada panjang gelombang 450 nm dan konsentrasi kortisol dihitung menggunakan program *Microplate Manager*® 6 Software (Bio-Rad Laboratories Inc.).

Analisis Data

Data yang diperoleh diuji normalitas sebaran data menggunakan *Shapiro-Wilk test* sebelum dilakukan analisis statistik. Data hasil uji *parallelism* dianalisis dengan membandingkan nilai *slope* (kemiringan) kurva sampel A dan B dengan kurva standar kortisol menggunakan uji persamaan kemiringan (*the test of equality of slope*) (Zar, 1996; Gholib *et al.*, 2020a). Data akurasi dihitung % *recovery* menggunakan rumus (konsentrasi hormon terukur/konsentrasi hormon sebenarnya x 100). Data uji presisi dihitung % CV *intra-* dan *inter-assay* dari QC-L dan QC-H dengan rumus [(standar deviasi/ rata-rata) x 100]. Data hasil validasi biologis dianalisis menggunakan uji T berpasangan/ *paired student t test* dengan membandingkan konsentrasi kortisol sebelum dan setelah transportasi. Data hasil percobaan waktu sentrifugasi dianalisis menggunakan uji ragam *One Way Anova* dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

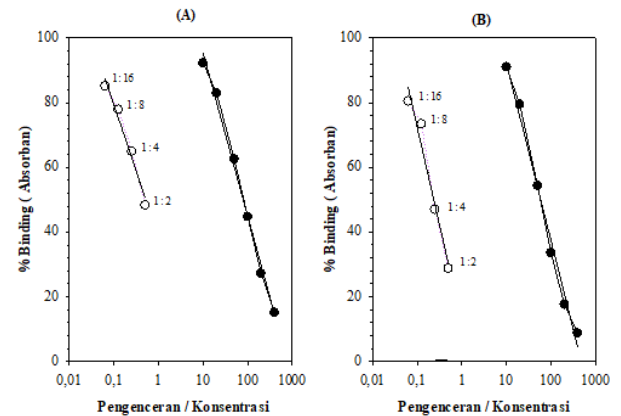
Validasi Analitik

Beberapa parameter validasi analitik yang dievaluasi dari *human cortisol ELISA kit* adalah *parallelism*/linieriti, akurasi, dan presisi. Hasil uji *parallelism*/linieriti menunjukkan kurva dari sampel sebelum transportasi (A) dan sampel setelah transportasi (B) yang diencerkan (1:2-1:16) sejajar/parallel dengan kurva standar kortisol (Gambar 1).

Hasil uji akurasi diperoleh nilai akurasi (% *recovery*) *human cortisol ELISA kit* untuk pengukuran hormon kortisol pada plasma darah kambing kacang sebesar 100,43±7,49 % (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa *human cortisol ELISA kit* memiliki akurasi yang baik untuk digunakan pada kambing kacang. Akurasi merupakan kedekatan konsentrasi kortisol yang diukur dengan konsentrasi yang sebenarnya. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada substansi pada plasma yang mengganggu pada proses pengikatan antara antibody (anti kortisol) pada *microplate* dengan antigen (kortisol) pada plasma darah.

Hasil uji presisi berdasarkan persentase nilai koefisien variasi (%CV) dari *QC Low* dan *QC high* disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan

Tabel 2 tersebut menunjukkan bahwa presisi pengukuran kortisol pada plasma kambing kacang menggunakan *human cortisol ELISA kit* (EIA-1887) sangat baik ditandai dengan nilai %CV dari *QC Low* dan *QC high* dalam satu *microplate* (*intra-assay*) maupun antar *microplate* (*inter-assay*) <10%.



Gambar 1. Hasil uji *parallelism*/linieriti pengenceran (1:2-1:16) dari sampel sebelum transportasi (A) dan sampel setelah transportasi (B) (lingkaran putih) dengan standar kortisol (lingkaran hitam).

Hal ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa presisi yang baik adalah jika %CV baik *intra-* maupun *inter-assay* <10% (Gholib *et al.*, 2020b). Presisi adalah pengulangan pengukuran kortisol (*QC low* dan *QC high*) pada kondisi yang sama akan mendapatkan hasil yang sama. Oleh karena itu semakin kecil nilai %CV *intra-* assay maupun *inter-assay* menunjukkan bahwa variasi yang diperoleh tidak besar (hasil yang diperoleh sama jika dilakukan berulang), sehingga *human cortisol ELISA kit* memiliki presisi yang baik untuk digunakan pada sampel plasma darah kambing kacang.

Tabel 1. Persentase *recovery* (akurasi) pengukuran kortisol pada plasma darah kambing kacang menggunakan *human cortisol ELISA kit*

Sampel	Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	<i>Recovery</i> (%)
1	88	79	89,77
2	61	63	103,28
3	58	61	105,17
4	60	59	98,33
5	106	101	95,28
6	168	186	110,71
Rataan (%)			100,43
Standar Deviasi (%)			7,49

Tabel 2. Persentase *coefficient variation* (%CV) *intra-assay* dan *inter-assay* human cortisol ELISA kit

%CV	Low-Quality	High-Quality
	Control (ng/mL)	Control (ng/mL)
<i>Intra-Assay</i> (n=6)	20,72	205,19
	20,25	196,64
	22,09	173,77
	20,06	191,14
	21,08	182,30
	22,35	181,39
Rataan	21,09	188,40
<i>Standar deviasi</i>	0,95	11,47
%CV	4,50	6,09
<i>Inter-Assay</i> (n=6)	18,80	196,78
	18,27	184,41
	22,69	193,85
	20,84	185,75
	22,12	200,27
	22,02	179,89
Rataan	20,79	190,16
<i>Standar deviasi</i>	1,86	7,97
%CV	8,92	4,19

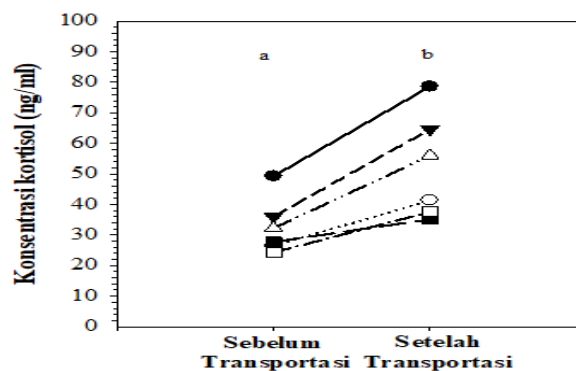
Berdasarkan hasil dari uji *parallelism*/linieriti, akurasi, dan presisi menunjukkan bahwa *human cortisol ELISA kit* memiliki validitas yang baik untuk digunakan dalam pengukuran konsentrasi kortisol pada plasma darah kambing kacang. Hal ini disebabkan *human cortisol ELISA kit* menggunakan antibody monoklonal yang spesifik terhadap kortisol. Hal ini didukung dengan informasi reaksi silang (*cross-reactivity*) dari *human cortisol ELISA kit* ini yaitu 100% dengan kortisol, 45% dengan *corticosterone*, 9% dengan progesteron, <2 % dengan *deoxycortisol* dan *dexamethazone*, 0,9% dengan *cortisone*, dan <0,01% dengan *estrone*, *estriol*, dan testosteron (DRG Instruments GmbH, Jerman). Selain itu, diduga struktur rantai karbon pada kortisol (C-21) pada vertebrata (manusia maupun hewan) memiliki kemiripan yaitu *cyclopentanoperhydrophenanthrene* (Gholib, et al.,2020a).

Validasi Biologis

Hasil uji validasi biologis menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi kortisol sebesar $58,3 \pm 18,4\%$ pada kambing kacang setelah transportasi (Gambar 2). Hasil analisis statistik menunjukkan rata-rata \pm SD konsentrasi kortisol setelah transportasi ($53,2 \pm 17,3$ ng/mL) lebih tinggi secara sangat signifikan ($p < 0,01$) dibandingkan sebelum transportasi ($32,7 \pm 9,2$

ng/mL). Menurut Werner dan Gallo (2008), peningkatan konsentrasi kortisol tertinggi terjadi ketika pemindahan domba dari kandang ke kendaraan. Dinyatakan lebih lanjut bahwa diawal perjalanan, konsentrasi kortisol meningkat 350% dibandingkan nilai awal. Hasil penelitian Gregory (1998), konsentrasi kortisol pada serum domba yang diangkut selama 24 jam menunjukkan 1-2 jam diawal perjalanan mencapai 60 mg/L dan menurun menjadi 20-30 mg/L pada jam ke 12 dan 25-35 mg/L pada jam ke 24 dari pengangkutan.

Adanya variasi konsentrasi kortisol sebelum dan setelah transportasi mengindikasikan bahwa *human kit EIA-1887* mampu mengukur variasi konsentrasi kortisol berdasarkan kondisi fisiologis tubuh hewan dalam merespon adanya cekaman stres akibat transportasi. Ketika tubuh mendapatkan *stressor*, poros hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA) akan mensekresi berbagai hormon untuk proses homeostatis tubuh diawali dengan sekresi hormone *corticotropic releasing hormone* (CRH) oleh hipotalamus. Pelepasan CRH kemudian akan memberikan stimulus ke kelenjar hipofisa bagian anterior untuk menghasilkan *adrenocorticothropic hormone* (ACTH) yang akhirnya menstimulus kelenjar adrenal bagian korteks melepaskan hormon kortisol (Sheriff et al., 2011).



Gambar 2. Konsentrasi kortisol sebelum dan setelah transportasi pada kambing kacang. Superskrip yang berbeda diatas garis menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Pengukuran konsentrasi kortisol metode ELISA menggunakan human ELISA kit EIA-1887 adalah teknik ELISA kompetitif tunggal (*a single competitive ELISA*). Pada teknik ELISA ini *microplate* dilapisi dengan antibody monoklonal terhadap molekul kortisol. Standar dan sampel yang diduga mengandung kortisol ditambahkan ke dalam *microplate*. Setelah itu, kortisol yang telah dilabel dengan *enzyme-conjugate* (*cortisol-*

horseradish peroxidase conjugate) ditambahkan ke dalam *microplate*. Pada saat inkubasi, antigen (kortisol pada sampel plasma atau serum) akan berkompetisi dengan *enzyme-conjugate* untuk berikatan dengan antibodi (anti-kortisol) yang ada di dalam *microplate*. Setelah inkubasi, *mikroplate* dicuci dan ditambahkan larutan substrat sebagai zat kromogen yang akan berikatan dengan enzim dan memberikan sinyal, sehingga setelah ditambahkan larutan substrat maka terjadi perubahan warna biru. Intensitas warna berbanding terbalik dengan konsentrasi hormon kortisol. Jika didapatkan intensitas warna yang pekat (biru pekat) maka konsentrasi hormon kortisol sedikit, sebaliknya jika intensitas warna terang maka jumlah hormon kortisol lebih banyak. Setelah itu ditambahkan larutan penyetop untuk menghentikan reaksi enzimatik (warna akan berubah menjadi kuning). Intensitas warna yang terbentuk selanjutnya dibaca menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Uji validasi penggunaan human *ELISA* kit untuk hewan juga telah berhasil dan dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya baik untuk pengukuran kortisol (Lendrawati *et al.*, 2019), maupun hormon steroid lain seperti testosteron (Wahyuni *et al.*, 2020); Akmal *et al.*, 2019), progesteron (Adam *et al.*, 2017), dan estradiol (Adam *et al.*, 2019). Ini membuktikan bahwa *human ELISA kit* juga dapat diaplikasikan pada hewan. Hal ini diduga karena hormon steroid baik pada manusia maupun hewan memiliki struktur yang mirip yaitu dari *cyclopentanoperhydrophenanthrene* dan jumlah atom karbon yang sama yaitu kortisol (C-21), testosteron (C-19), progesteron (C-21), dan estradiol (C-18). Meskipun demikian, penggunaan *human ELISA kit* untuk pengukuran hormon steroid pada hewan harus dilakukan uji validasi terlebih dahulu sebelum digunakan.

Pengaruh Penundaan Waktu Sentrifugasi Sampel Darah terhadap Stabilitas Konsentrasi Kortisol

Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi kortisol menurun sejalan dengan lamanya penundaan waktu sentrifugasi setelah sampel darah dikoleksi (Tabel 3). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu sentrifugasi berpengaruh secara signifikan terhadap konsentrasi kortisol ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut menunjukkan, darah yang disentrifugasi dalam waktu 24 jam setelah dikoleksi memperlihatkan penurunan sebesar 14,16% dan konsentrasi kortisolnya berbeda secara signifikan ($p < 0,05$)

dengan darah yang disentrifugasi kurang dari satu jam setelah dikoleksi (0 jam). Akan tetapi, darah yang disentrifugasi 6, 12, dan 18 jam setelah dikoleksi tidak menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi kortisol jika dibandingkan dengan darah yang disentrifugasi kurang dari satu jam setelah dikoleksi (0 jam) ($p > 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa preparasi darah menjadi plasma untuk pemeriksaan konsentrasi kortisol maka waktu sentrifugasi yang masih baik adalah kurang dari 24 jam setelah darah dikoleksi.

Tabel 3. Konsentrasi kortisol (rata-rata \pm SD) pada plasma darah yang disentrifugasi dengan waktu yang berbeda setelah dikoleksi

Waktu Sentrifugasi setelah Koleksi (jam)	Konsentrasi Kortisol (ng/mL)
0	34,40 \pm 4,64 ^a
6	32,12 \pm 3,75 ^{ab}
12	30,23 \pm 6,55 ^{ab}
18	30,03 \pm 3,10 ^{ab}
24	29,41 \pm 3,00 ^b

Faktor penyebab terjadinya penurunan konsentrasi kortisol diduga karena adanya degradasi konsentrasi kortisol selama proses penyimpanan di dalam cooler box sebelum dilakukan sentrifugasi. Hal ini karena, darah yang belum dipisahkan plasma atau serumnya sangat rentan mengalami degradasi akibat aktivitas *enzyme proteolitik* (Bielohuby *et al.*, 2012; Christensen *et al.*, 2016). Hal ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya seperti pada kortisol (Reimers *et al.*, 1983), dan progesterone (Reimers *et al.*, 1991). Hasil penelitian Christensen *et al.* (2016), konsentrasi hormon ACTH mengalami penurunan sekitar 12,5% ketika darah disimpan dengan ice pack dan 18,9% ketika darah disimpan pada suhu kamar. Hal yang sama juga pernah dilaporkan oleh Prutton *et al.* (2015) pada kuda bahwa konsentrasi ACTH mengalami penurunan secara signifikan setelah disimpan selama 24 jam pada suhu 4°C dan 21°C. Oleh karena itu, penting setelah dikoleksi darah disentrifugasi untuk mendapatkan plasma darah.

Selain itu, penyebab lain terjadinya penurunan konsentrasi kortisol pada darah yang disentrifugasi 24 jam setelah dikoleksi diduga karena terjadinya hemolisis pada darah yang tidak segera dilakukan sentrifugasi. Hal ini terlihat dari hasil penelitian, plasma yang diperoleh berwarna lebih merah dibandingkan dengan plasma dari darah yang disentrifugasi lebih cepat. Hemolisis merupakan pecahnya membran sel darah merah sehingga hemoglobin dan komponen intraseluler lainnya keluar ke dalam cairan di sekitarnya

(plasma). Hemolisis ini berpengaruh terhadap hasil pengukuran kimia darah termasuk hormon (Lippi *et al.*, 2008).

KESIMPULAN

Human cortisol ELISA kit (EIA-1887, DRG Instruments GmbH, Germany) memiliki validitas yang baik secara analitik dan biologis untuk digunakan dalam pengukuran konsentrasi kortisol pada kambing kacang. Selain itu, keterlambatan waktu sentrifugasi selama 24 jam berpengaruh terhadap stabilitas konsentrasi kortisol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Syiah Kuala atas dukungan dana untuk penelitian ini melalui Hibah Penelitian Laboratorium Unsyiah 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M., Gholib, G., Hafizuddin, H., Zamzami, R.S., Bahi, M., 2019. Characteristic of ovarian and estradiol concentrations in the follicular fluid of slaughtered Aceh cattle. *J. Ked. Hewan*. 13(4): 93-97.
- Adam, M., Siregar, T.N., Wahyuni, S., Gholib, G., Ramadhana, C.E., Ananda, R., Afifuddin, A., 2017. Steroid level and pregnancy rate of Aceh cows in response to ovulation induction using presynchovsynch method. *J. Ked. Hewan*. 11(4): 138-141.
- Akmal, M., Gholib, G., Rinidar, R., Fitriani, F., Helmi, T.Z., Sugito, S., Isa, M., Nurliana, N., Wahyuni, S., Dasrul, D., Yaman, M.A., 2019. The concentration of testosterone, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, and protamine 1 in the serum of male chicken following administration of epididymis and testicular extracts and their combination. *Vet. World*. 12(7): 1101-1107.
- Bielohuby, M., Popp, S., Bidlingmaier, M., 2012. A guide for measurement of circulating metabolic hormones in rodents: Pitfalls during the pre-analytical phase. *Mol. Metab*. 1:47-60.
- Bova, T.L., Chiavaccini, L., Cline, G.F., Hart, C.G., Matheny, K., Muth, A.M., Voelz, B.E., Kesler, B., Memili, E., 2014. Environmental stressors influencing hormones and systems physiology in cattle. *Repro. Biol. Endocrinol*. 12: 58.
- Ceglarek, U., Thiery, J., Werner, M., Kortz, L., Körner, A., Kiess, W., Kratzsch, J., 2010. Preclinical challenges in steroid analysis of human samples. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 121: 505-512.
- Christensen, M., Madsen, R.F., Møller, L.R., Knudsen, C.S., Samson, M.H., 2016. Whole blood samples for adrenocorticotrophic hormone measurement can be stored at room temperature for 4 hours. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*
- De Castro, T., Valdez, L., Rodriguez, M., Benquet, N., Rubianes, E., 2004. Decline in assayable progesterone in bovine serum under different storage conditions. *Trop. Anim. Health Prod*. 36: 381-384.
- Departemen Pertanian (Deptan)., 2012. Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2840/Kpts/LB.430/8/2012 Tentang Penetapan Rumpun Kambing Kacang. Deptan. Jakarta.
- Gholib, G., Wahyuni, S., Akmal, M., Hasan, M., Agil, Purwantara, B., 2020a. The validation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay and the effect of freeze-thaw cycles of serum on the stability of cortisol and testosterone concentrations in Aceh cattle [version 3; peer review: 2 approved]. *F1000Research*. 8:1220 <https://doi.org/10.12688/f1000research.19804.3>.
- Gholib, G., Wahyuni, S., Wahyudi, A., Silalahi, K.S., Akmal, M., Sabri, M., Nugraha, T.P., 2020b. Validation of commercial ELISA kit for non-invasive measurement of cortisol concentrations and the evaluation of the sampling time of blood and fecal sample in Aceh cattle. In *Proceeding of 1st ICVAES 2019, E3S Web of Conferences*. 151:01007. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202015101007>.
- Gregory, N.G., 1998. *Animal Welfare and Meat Science*. CABI Publishing: New York.
- Hegstad-Davies, R.L., 2006. A review of sample handling considerations for reproductive and thyroid hormone measurement in serum or plasma. *Theriogenology*. 66:592-598.

- Kinn Rød, A.M., Harketstad, N., Jellestad, F.K., Murison, R., 2017. Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum. *Sci. Rep.* 7(1): 6748
- Lendrawati, Priyanto, R., Yamin, M., Jayanegara, A., Manalu, W., Desrial, 2019. Respon fisiologis dan penyusutan bobot badan domba lokal jantan terhadap transportasi dengan posisi berbeda dalam kendaraan. *Jurnal Agripet.* 19(2): 113-121.
- Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassaults, A.J., Plebani, M., 2008. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46(6): 764-772.
- Omar, H., Chamberlin, A., Walker, V., Wood, P.J., 2001. Immulite 2000 parathyroid hormone assay: stability of parathyroid hormone in EDTA blood kept at room temperature for 48h. *Ann. Clin. Biochem.* 38: 561-563.
- Preissner, C.M., Reilly, W.M., Cyr, E.C., O'Kane, D.J., 2004. Plastic versus Glass Tubes: Effects on Analytical Performance of Selected Serum and Plasma Hormon. *Clin. Chem.* 50 (7);1245-1247.
- Prutton, J.S.W., Kass, P.H., Watson, J.L., Pusteria, N., 2015. Pre-analytical stability of adrenocorticotrophic hormone from healthy horses in whole blood, plasma, and frozen plasma samples. *Vet. J.* 204: 123-124
- Raff, H., Sluss, P.M., 2008. Pre-analytical issues for testosterone and estradiol assays. *Steroids.* 73: 1297-1304.
- Reimers, T.J., Lamb, S.V., Bartlett, S.A., Matamoros, R.A., Cowan, R.G., Engle, J.S., 1991. Effects of hemolysis and storage on quantification of hormones in blood samples from dogs, cattle, and horses. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1075-80.
- Reimers, T.J., McCann, J.P., Cowan, R.G., 1983. Effects of storage times and temperatures on T3,T4, LH, prolactin, insulin, cortisol and progesterone concentrations in blood samples from cows. *J. Anim. Sci.* 57(3): 683-691.
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., Boonstra, R., 2011. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia.* 166(4): 869-887.
- Siregar, T.N., Wajdi, F., Akmal. M., Fahrimal, Y., Adam, M., Panjaitan, B, Sutriana, A., Daud, R., Armansyah, T., Meutia, N., 2017. Embryonic death incidents due to heat stress and effect of therapy with gonadotropin releasing hormone (gnrh) in Aceh cattle. *Vet. Med. Zoot.* 75(97): 70-74.
- Wahyuni, S.,Jalaluddin, M., Gholib, G., Maulana, R., Dasrul, D., Siregar, T.N., Hamny, H., Gani, F.A., Ritonga, M.Z., Akmal, M., 2020. The correlation between spermatozoa morphometry and the testosterone levels in the epididymis of aceh cow. In Proceeding of 1st ICVAES 2019, *E3S Web of Conferences.* 151:01020. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202015101020>.
- Werner, M., Gallo, C., 2008. Effect of transport, lairage and stunning on the concentrations of some blood constitutions in horses destined for slaughter. *J. Liv. Sci.* 12: 23-29.
- Wingfield, J.C., Sapolsky, R.M., 2003. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinol.* 15: 711-24.
- Zar, J.H., 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.