

# Pemeriksaan Kadar hCG Metode ELISA pada Serum suhu 4°C dan 25°C

Herlisa Anggraini<sup>1</sup>, Erma Lestari<sup>1,2</sup>, \*Aprilia Indra Kartika<sup>1</sup>, Grevanmoy Febriani Kakiay<sup>1</sup>,  
Prisca Audri Telleng<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Diploma of Medical Laboratory Technology, Faculty of Nursing and Health Science, Universitas Muhammadiyah Semarang, Jl. Kedungmundu Raya No.18, Semarang City, Central Java, 50273, Indonesia

<sup>2</sup> RSUD Semarang, Semarang Regency.

## Abstrak

Suhu serum pada uji ELISA merupakan faktor pra analitik yang dapat mempengaruhi kadar parameter yang diukur. Serum yang tidak diperiksa secara langsung akan disimpan pada suhu 4°C, sedangkan pemeriksaan ELISA menggunakan spesimen serum suhu ruangan (25°C). Masa tunggu suhu serum menjadi 4°C hingga 25°C seringkali tidak tepat sehingga pemeriksaan tetap dilakukan meskipun serum masih berada pada suhu 4°C. Untuk mengetahui perbedaan suhu serum pada suhu 4°C dan 25°C pada uji ELISA maka dilakukan penelitian dengan menggunakan parameter *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG). hCG adalah salah satu parameter untuk mendiagnosis kehamilan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi apakah terdapat perbedaan kadar hCG serum pada suhu 4°C dan 25°C menggunakan metode ELISA. Sampel yang digunakan adalah ibu hamil trimester II sebanyak 10 orang yang akan diperiksa secara duplo. Masing masing 10 spesimen akan diperiksa kadar hCG menggunakan metode ELISA dalam kondisi suhu serum 4°C dan 25°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata hCG serum yang diperiksa pada suhu 25°C (385.677 IU/L) lebih tinggi dibandingkan dengan serum pada suhu 4°C (381.912 IU/L), namun hasil statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar HCG diperiksa pada suhu 4°C dan 25°C ( $p > 0,05$ ).

**Kata Kunci :** faktor pra analitik ELISA; serum suhu 4°C; serum suhu 25°C

## Test hCG Levels Using The ELISA Method With Serum Temperatures Of 4°C And 25°C

### Abstract

Serum temperature in the ELISA test is a pre-analytical factor that can affect the levels of the parameters measured. Serum that is not examined directly will be stored at 4°C, while ELISA tests use serum specimens at room temperature (25°C). The waiting period for serum temperature to be 4°C to 25°C is often inappropriate so that the examination is still carried out even though the serum is still at 4°C. To find out the difference in serum temperature at 4°C and 25°C in the ELISA test, a study will be carried out using the Human Chorionic Gonadotropin (hCG) parameter. hCG is one of the parameters for diagnosing pregnancy. The purpose of this study was to identify whether there were differences in serum hCG levels at 4°C and 25°C using the ELISA method. The sample used was second trimester pregnant women as many as 10 people who would be examined in duplicate. Each of the 10 specimens will be examined for hCG levels using the ELISA method at serum temperature conditions of 4°C and 25°C. The results showed that the average serum hCG examined at 25°C (385,677 IU/L) was higher than that of serum at 4°C (381,912 IU/L), but the statistical results showed that there was no significant difference between levels HCG was checked at 4°C and 25°C ( $P > 0.05$ ).

**Keywords: :** ELISA pre-analytical factors; serum temperature 4°C; serum temperature 25°C

---

**Korespondensi:** Aprilia Indra Kartika, Prodi D4 Analis Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang, Jl. Kedungmundu No.18, Kedungmundu, Kec. Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah 50273, *mobile* 085227496236, *e-mail* kartika.biotech@unimus.ac.id

## Pendahuluan

*Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) adalah hormon yang diproduksi selama kehamilan oleh sel sinsitiotrofoblas plasenta (Harti, Estuningsih, & Nurkusumawati, 2013). hCG berfungsi untuk mempertahankan kehamilan dengan memproduksi progesteron (Marfia, Iqbal, & Juliatia, 2018). hCG terkandung dalam urin dan darah (Suharlina, DIV Analisis Kesehatan, & Padang, 2018). Pemeriksaan hCG untuk mendeteksi kehamilan dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu aglutinasi lateks, ICT, ELISA (Marfia et al., 2018). Hormon hCG diproduksi oleh berbagai organ. Hormon hCG tidak hanya digunakan untuk mendeteksi kehamilan, tetapi juga kondisi patologis seperti kehamilan ektopik dan proses karsinogenik (Nwabuobi et al., 2017). Pemeriksaan hCG dengan ELISA dipilih karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) adalah metode pemeriksaan antigen dan antibodi dengan menggunakan enzim yang terkonjugasi pada antibodi (Marliana & Widhyasih, 2018). ELISA menggunakan prinsip pengikatan antigen-antibodi yang akan mengubah warna reaksi dari biru akibat reaksi enzimatis dengan substrat. Reaksi akan berubah warna menjadi kuning setelah penambahan *stop solution*. Warna yang terbentuk akan diukur berdasarkan absorbansi pada panjang gelombang tertentu. Nilai absorbansi mewakili konsentrasi antigen atau antibodi pada pemeriksaan. Pemeriksaan metode ELISA memiliki spesifisitas yang tinggi karena menggunakan antibodi monoklonal. Elemen yang berperan penting dalam deteksi adalah interaksi antara antigen-antibodi yang sangat spesifik (Ng et al., 2012).

Konsentrasi hCG yang diukur dengan metode ELISA dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu pra analitik, analitik dan pasca analitik. Tahap pra analitik yang paling berpengaruh adalah kondisi spesimen yang tidak lisis, lipemik, dan ikterik serta suhu spesimen. Suhu spesimen sering tidak dipertimbangkan selama pemeriksaan ELISA. Metode ELISA merekomendasikan agar reagen disimpan pada suhu 2-8°C dan saat digunakan pada suhu ruang 20-25°C (Siregar dkk, 2018). Suhu spesimen yang dianjurkan adalah suhu ruangan, tetapi spesimen sering disimpan pada suhu 4°C agar dapat bertahan selama 7 hari.

Spesimen pada suhu 4°C sering digunakan langsung untuk pemeriksaan tanpa

diubah ke suhu ruang karena membutuhkan waktu yang cukup lama. Proses pencairan spesimen dan mengubahnya menjadi suhu ruang (25°C) sebaiknya dibiarkan selama 1 jam (Raehun, Jiwintarum, & Pauzi, 2019) tanpa melalui proses *thawing* karena akan membuat protein serum menjadi tidak stabil (Kustiningsih, Megawati, Kartiko, & Lutpiatina, 2017). Suhu serum 4°C yang segera diperiksa dapat memberikan hasil negatif palsu sehingga pemeriksaan hCG pada pasien hamil dapat dideteksi tidak hamil. Hal ini sangat krusial karena hasil yang dikeluarkan oleh laboratorium akan menentukan tindakan selanjutnya oleh klinisi. Hasil pemeriksaan yang dikeluarkan oleh laboratorium harus tepat, padahal penggunaan suhu serum 4°C untuk pemeriksaan sangat banyak dijumpai di laboratorium dengan alasan membutuhkan hasil yang cepat untuk segera dikeluarkan ke klinisi.

Penelitian terkait penggunaan sampel serum SARS-CoV-2 yang diinaktivasi menunjukkan peningkatan nilai Ct yang signifikan dibandingkan dengan serum yang tidak diberi perlakuan (Woldesemayat, Gebremicael, Zealiyas, Yilma, & Adane, 2022). Penelitian sebelumnya juga tidak merekomendasikan pemanasan suhu serum 56°C selama 30 menit karena dapat menyebabkan negatif palsu (Hu, An, et al., 2020). Stabilitas antibodi (protein serum termasuk hormon hCG) memiliki pengaruh besar pada spesifisitas dan afinitas reaksi. Stabilitas merupakan masalah utama bagi peneliti dan asisten laboratorium dalam menentukan hasil pemeriksaan sampel untuk diagnosis dan deteksi (Ma, O'fagain, & Richard, 2020). Suhu penyimpanan antibodi yang dianjurkan adalah 4°C, -20°C, -80°C, namun saat serum digunakan harus dipastikan sudah dalam kondisi ruangan.

Penelitian terkait faktor suhu spesimen yang mempengaruhi kadar hCG dengan metode ELISA belum pernah dilakukan padahal hal ini penting untuk mengetahui kadar hCG yang tepat dan mengarah pada deteksi kehamilan. Kondisi suhu penyimpanan -20°C menggunakan spesimen urin untuk pemeriksaan hCG mempengaruhi konsentrasi  $\beta$ -hCG serta imunoreaktivitasnya setelah penyimpanan selama 3 bulan (Lempiäinen et al., 2012). Padahal  $\beta$ -hCG merupakan subunit spesifik penanda kehamilan jika dibandingkan dengan  $\alpha$ -hCG yang subunitnya sama dengan FSH dan LH sehingga tidak spesifik.

Tujuan penelitian untuk menganalisis perbedaan konsentrasi hCG pada

serum suhu 4 °C dan 25 °C menggunakan metode ELISA sehingga mendapatkan suhu spesimen yang tepat untuk pemeriksaannya.

**Metode**

Jenis penelitian eksperimental, dengan desain cross sectional. Variabel penelitian bebas adalah suhu serum ibu hamil rentang usia kehamilan 3-5 bulan sedangkan variable terikat adalah konsentrasi hCG. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2022. Tempat pengambilan sampel di Puskesmas Kedungmundu, sedangkan tempat pemeriksaan hCG metode ELISA di Laboratorium Biologi Molekuler, Analis Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang.

Penelitian dilakukan dengan menganalisis 10 sampel serum ibu hamil (duplo). Sampel yang digunakan adalah sampel serum ibu hamil dengan rentang usia kehamilan 3-5 bulan. Pada rentang usia kehamilan 3-5 bulan, terjadi puncak konsentrasi hCG dalam urin dan darah (Marfia et al., 2018). Kriteria inklusi sampel adalah ibu hamil dengan usia kehamilan 3-5 bulan. Spesimen serum yang digunakan tidak lisis, lipemik, maupun ikterik. Pemeriksaan hCG pada serum suhu 4°C dan 25°C dilakukan secara duplo.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah DiAlab hCG ELISA, mikroplate ELISA reader, tip, microwell, timer, dan kertas absorbansi.

**Prosedur**

**Persiapan sampel**

Sampel yang digunakan adalah sampel serum. Sampel serum dipisahkan dari spesimen whole blood tanpa ditambahkan antikoagulan. Spesimen darah diperoleh dengan cara disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Bagian serum kemudian dipipet ke dalam microtube. Kriteria sampel serum untuk pemeriksaan adalah tidak ada gumpalan, tidak lipemik dan tidak ada hemolisis, serta terhindar dari siklus freeze-thaw.

**Persiapan Reagen**

Reagen yang digunakan dalam pemeriksaan hCG dengan metode ELISA adalah sampel serum, standar, yang mengandung antigen murni yang diinginkan, antibodi pendeteksi terkonjugasi, konjugat enzim berupa streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase), substrat berupa HRP substrat A dan B, buffer cuci 20X diencerkan dengan deionisasi air, dan hentikan larutan.

**Prosedur ELISA**

Sejumlah microwell disiapkan, kontrol hCG standar dan sampel dipipet sebanyak 50µl (suhu sampel 4°C, dan suhu ruang 25°C) ke dalam well yang sesuai, ditambahkan 50µl conjugated reagent ke semua well yang diperiksa, diaduk rata setelah itu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Pencucian dilakukan dengan mengeluarkan cairan dari semua well dan pencucian sebanyak tiga kali dengan 250µl wash buffer, didiamkan selama 10 detik pada setiap langkah pencucian, sisa pencucian ditepuk-tepuk pada tisu kering dengan posisi well dibalik. 50µl masing-masing substrat HRP A dan B ditambahkan ke dalam microwell, dihomogenkan dan ditutup dengan pelat penutup, setelah itu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. 50µl stop solution dipipet ke dalam semua well, homogenkan well dengan hati-hati agar larutan tercampur, kemudian baca absorbansinya pada ELISA reader pada 450 nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan stop solution.

**Hasil**

Hasil penelitian tentang karakteristik ibu hamil yang meliputi umur, usia kehamilan, kehamilan anak beberapa dan rerata konsentrasi hCG suhu 4°C dan 25°C, dapat dilihat pada table dibawah ini

Tabel 1. Karakteristik sampel penelitian dan konsentrasi hCG

Sampel	Umur	Usia kehamilan (bulan)	Hamil anak ke	Rerata kons. hCG 4 °C (IU/L)	Rerata kons. hCG 25 °C (IU/L)
S1	25	3	1	468,53	418,87
S2	23	3	1	261,18	297,83
S3	35	5	2	413,69	400,96
S4	37	5	3	467,44	472,80
S5	34	5	1	234,17	210,44
S6	36	4	3	428,06	421,97
S7	23	3	1	415,05	426,60
S8	25	4	2	489,54	452,61
S9	31	3	2	402,05	468,98
S10	19	4	1	239,36	285,65

Hasil pemeriksaan hormone hCG ibu hamil pada suhu serum 4°C dan 25°C dapat dilihat distribusi frekuensi yang meliputi nilai rerata, nilai tertinggi dan nilai terendah, pada table dibawa ini

Tabel 2. Rata-Rata Konsentrasi Kadar hCG Ibu Hamil Pada Suhu Serum 4°C dan 25°C

Suhu serum	Konsentrasi hCG (IU/L)		
	Rerata	Nilai tertinggi	Nilai terendah
4°C	381,912	497,088	218,264
25°C	385,677	521,097	210,08

Tabel 2 menunjukkan rata-rata konsentrasi hCG dalam serum pada suhu 4°C lebih rendah dari 25°C. Berdasarkan analisis statistik uji normalitas, sebaran data konsentrasi hCG pada suhu 4°C dan 25°C adalah normal ( $p = 0,688$ ). Berdasarkan analisis perbedaan dengan menggunakan t-test menunjukkan nilai  $p = 0,901$  yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan antara hasil kedua variabel. Konsentrasi hCG dalam serum pada suhu 4°C memiliki rata-rata yang lebih rendah dibandingkan serum pada suhu 25°C. Kadar hCG yang diukur pada sampel serum pada suhu 4°C dan 25°C tidak menunjukkan hasil negatif palsu. Menurut FDA, kadar hCG  $>60$  IU/L mengindikasikan kehamilan. Tingkat hCG 20-60 IU/L menunjukkan hasil sedang, dan  $<20$  IU/L menunjukkan kehamilan negatif (Greene, Grenache, Committee, & Sam, 2015).

## Pembahasan

Kadar hCG berdasarkan karakteristik umur tidak menunjukkan konsistensi karena sebarannya bervariasi. Selain itu, jika dilihat dari usia kehamilan rentang 3-5 bulan juga memiliki kadar hCG yang bervariasi, termasuk karakteristik kehamilan yang ke sekian tidak menunjukkan trend kenaikan hCG yang konsisten. hCG merupakan hormone glikoprotein yang terdiri dari subunit  $\alpha$ -(hCG $\alpha$ ) dan subunit  $\beta$ -(hCG $\beta$ ). hCG $\alpha$  merupakan hormone glikoprotein yang tidak spesifik karena strukturnya hampir sama dengan *lutinizing hormone* (LH), *follicle stimulating hormone* (FSH), dan *thyroid-stimulating hormone* (TSH), sedangkan hCG $\beta$  spesifik dan bisa membedakan fungsi biologis dari hormone glikoprotein lain. hCG diekspresikan oleh trofoblas plasenta selama kehamilan dan menstimulasi produksi hormone steroid dalam korpus luteum (Lempiäinen et al., 2012).

Prinsip ELISA hCG adalah ikatan antara anti-hCG dan hCG dan perubahan warna akibat reaksi enzim dan substrat. Enzim adalah protein yang labil terhadap perubahan suhu. Enzim dapat bekerja optimal pada suhu optimal (37°C) (Encarnação, Barta, Fornstedt, & Andersson, 2017). Semakin tinggi suhu (mencapai suhu optimum) semakin cepat aktivitas enzim. Semakin rendah suhu yang digunakan maka aktivitas enzim semakin lambat (Kustiningsih et al., 2017). Lambatnya aktivitas enzim pada metode pemeriksaan ELISA mempengaruhi rendahnya konsentrasi HCG jika dibandingkan dengan menggunakan serum pada suhu 25°C. Konstanta laju kinetik terjadi ketika reaksi dilakukan menggunakan suhu 4°C (Fahisyah, Naim, & Armah, 2019; Johnstone et al., 1990; Krepper, Satzer, Maria, & Jungbauer, 2018). Kesetimbangan termal protein menggunakan metode ELISA *in vitro assay* akan meningkatkan afinitas pengikatan antibodi sesuai dengan kondisi suhu tertentu (Stan et al., 2019). Inkubasi membutuhkan suhu yang optimal agar interaksi antar protein dapat berlangsung (Encarnação et al., 2017).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi hCG yang diperiksa menggunakan serum suhu 25°C lebih tinggi dibandingkan suhu 4°C, hal ini menunjukkan kestabilan hCG pada serum suhu 25°C dibandingkan dengan 4°C. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa temperature penyimpanan spesimen suhu tinggi akan meningkatkan konsentrasi subunit hCG $\beta$  yang bebas karena degradasi HCG yang utuh. Pada darah yang disimpan dalam suhu ruang, rerata konsentrasi hCG $\beta$  bebas pada serum meningkat 10-15% setelah penyimpanan 24 jam, dan meningkat 25% pada penyimpanan 3 hari. Tingkat hCG pada darah akan stabil pada penyimpanan suhu ruang selama 34 jam (Cruz et al., 2010)

kadar hCG tidak berubah saat dikondisikan pada suhu kamar. hCG adalah hormone yang tersusun dari protein. Namun pada suhu serum yang rendah 4°C reaksi ELISA tidak dapat berjalan optimal. Penggunaan spesimen serum pada suhu ruang 25°C dengan metode ELISA 4°C tidak memberikan perbedaan konsentrasi hCG yang bermakna. Selain menggunakan serum pada suhu 4°C dan 25°C untuk pemeriksaan hCG dengan metode ELISA, penelitian sebelumnya juga menggunakan suhu reagen ELISA pada suhu 4°C dan 25°C, hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna kadar hCG yang diperiksa menggunakan reagen ELISA 4°C dan 25°C (Telleng et al., 2023). Hal ini sejalan dengan penelitian suhu inaktivasi serum pada pemeriksaan SARS-CoV-2 yang tidak memberikan perubahan signifikan pada konsentrasi IgG dan IgM anti-SARS-Cov-2 menggunakan metode sandwich ELISA (Hu, Zhang, et al., 2020). Selain itu, hasil pemeriksaan *in vitro* dengan metode ELISA untuk mendeteksi campak pada spesimen serum spot kering yang disimpan pada suhu 4°C dan 25°C hingga hari ke-3 menunjukkan perbedaan IgM yang tidak signifikan (Flannery et al., 2016; Puspa, Mursinah, & Budianto, 2013). Penelitian sebelumnya dengan membandingkan suhu pemeriksaan 4°C dan 25°C untuk berbagai parameter menggunakan metode ELISA tidak berpengaruh signifikan terhadap konsentrasi antigen dan antibodi. Ini berbeda dengan metode aglutinasi. Metode aglutinasi berpengaruh signifikan terhadap konsentrasi antibodi pada sampel 4°C dan 25°C. Dalam metode ELISA indirect, jumlah antibodi IgG terhadap SARS-CoV-2 meningkat secara signifikan dan antibodi IgM menurun dengan meningkatnya suhu serum inaktivasi. Namun saat menggunakan metode sandwich ELISA, konsentrasi IgM SARS-CoV-2 tidak berubah, suhu 56°C selama 1 jam dan 60°C selama 30 menit (Lin et al., 2021).

Penggunaan suhu serum 4°C dan 25°C pada beberapa penelitian untuk mengukur antibodi SARS-CoV-2 menggunakan metode ELISA menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ((Xue et al., 2006). Penyimpanan serum selama 10-14 hari pada suhu -70°C, -20°C, 4°C, dan 25°C tidak menunjukkan pengaruh apapun terhadap kestabilan antibodi SARS-CoV-2 (Kanji et al., 2021). Serum inaktif pada pemeriksaan hormone TSH, T3, FT4, dan FT3

juga tidak berbeda nyata bila dibandingkan dengan serum yang tidak diberi perlakuan (25°C)(Xu, Li, Chen, Wang, & Xu, 2021) . Suhu serum 4°C dan 25°C tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap struktur protein antibodi monoklonal (Kongmalai et al., 2021; Zhou et al., 2021).

Perbedaan suhu serum terhadap titer antibodi pada pemeriksaan aglutinasi sangat berpengaruh. Hasil penelitian sebelumnya yang berkaitan dengan hal tersebut adalah aglutinasi tifoid yang dipanaskan 60°C-62°C selama 1 jam, dapat mempengaruhi besarnya aglutinasi akibat kerusakan (Jones, 1927). Hasil titer aglutinasi O dengan metode widal tube pada suhu inkubasi 18°-25°C, 37°C, 50°C berpengaruh terhadap titer aglutinin O dalam serum penderita demam tifoid (Kalma, 2009). Namun penelitian sebelumnya juga menyatakan bahwa suhu serum yang diinaktivasi tidak berpengaruh terhadap reaksi ELISA dan aglutinasi. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa tidak terdapat perbedaan titer antibodi anti Salmonella O yang bermakna pada serum yang disimpan pada suhu 50°C selama 3 jam, 4 jam, dan 5 jam (Makalew, Hermanus, & Sunarti, 2013).

Hasil penelitian yang berbeda terkait penggunaan suhu menyatakan bahwa baik suhu serum dingin (4°C) maupun suhu inaktivasi serum memiliki pengaruh yang signifikan terhadap konsentrasi antigen dan antibodi yang diukur. Inaktivasi menggunakan pemanasan pada suhu 56°C selama 30 menit dan 60°C selama 60 menit mempengaruhi titer antibodi SARS-CoV2 (Pastorino, Touret, Gilles, & Lamballerie, 2020). Spesimen harus dialirkan untuk memastikan apakah pemanasan memengaruhi titer antibodi.

Kesimpulan penelitian ini adalah penggunaan spesimen serum pada suhu 4°C dan 25°C tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap pemeriksaan kadar hCG dengan metode ELISA, namun untuk menjaga kualitas hasil pemeriksaan hCG maka suhu serum yang direkomendasikan oleh ELISA *insert kit* harus digunakan.

Saran penelitian adalah menggunakan faktor pra analitik lain untuk pemeriksaan hCG metode ELISA, selain itu besar sampel penelitian dapat ditingkatkan dan pengerjaan pemeriksaan hCG metode ELISA sesuai dengan manual prosedur kit.

## Daftar Pustaka

- Cruz, J., Cruz, G., Minekawa, R., Maiz, N., & Nicolaidis, K. H. (2010). Effect of temperature on free  $\beta$ -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A concentration. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 36(2), 141–146. <https://doi.org/10.1002/uog.7688>
- Encarnação, J. C., Barta, P., Fornstedt, T., & Andersson, K. (2017). Impact of assay temperature on antibody binding characteristics in living cells: A case study. *Biomedical Reports*, 7, 400–406. <https://doi.org/10.3892/br.2017.982>
- Fahisyah, R. N., Naim, N., & Armah, Z. (2019). Pengaruh Variasi Lama Penyimpanan Reagen Enzim 1a Terhadap Hasil Pemeriksaan Ureum Darah Metode Berthelot. *Jurnal Media Analisis Kesehatan*, 10(1), 21. <https://doi.org/10.32382/mak.v10i1.980>
- Flannery, J., Benzinger, M. J., Jr, Bird, P., Crowley, E. S., Goins, D., & Agin, J. R. (2016). Validation of the RIDASCREEN® FAST Milk Kit. 495–503. [Lahttps://doi.org/10.570/jaoacint.15-0290](https://doi.org/10.570/jaoacint.15-0290)
- Greene, D. N., Grenache, D. G., Committee, E., & Sam, C. M. E. (2015). Pathology Consultation on Human Chorionic Gonadotropin Testing for Pregnancy Assessment. (villi), 830–836. <https://doi.org/10.1309/AJCP7O7VARED UYIJ>
- Harti, A. S., Estuningsih, & Nurkusumawati, H. (2013). Pemeriksaan HCG (human chorionic gonadotropin) untuk deteksi kehamilan dini secara imunokromatografi. *Jurnal Kesmadaska*, 1(1), 1–4.
- Hu, X., An, T., Situ, B., Hu, Y., Ou, Z., Li, Q., ... Zheng, L. (2020). Heat inactivation of serum interferes with the immunoanalysis of antibodies to SARS-CoV-2. *Wiley*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/jcla.23411>
- Hu, X., Zhang, R., An, T., Li, Q., Situ, B., Ou, Z., ... Zheng, L. (2020). Impact of heat-inactivation on the detection of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibody by ELISA. *Clinica Chimica Acta*, 509, 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.032>
- Johnstone, R. W., Andrew, S. M., & Hogarth, M. P. (1990). The Effect Of Temperature On The Binding Kinetics And Equilibrium Constants Of Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens. *Muolecular Immunology*, 21(4), 327–333.
- Jones, B. Y. F. S. (1927). *The effect of heat on antibodies*. 291–301.

- Kalma. (2009). Pengaruh Suhu Inkubasi Terhadap Titer Aglutinin O Dalam Serum Penderita Demam Tifoid Menggunakan Uji Widal Metode Tabung. *Media Analisis Kesehatan*, 3(2), 51–58.
- Kanji, J. N., Bailey, A., Fenton, J., Lindsay, L. R., Dibernardo, A., Pl, N., ... Charlton, C. (2021). Stability of SARS-CoV-2 IgG in multiple laboratory conditions and blood sample types. *Journal of Clinical Virology*, 142(April), 104933. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104933>
- Kongmalai, T., Chuanchaiyakul, N., Sripatumtong, C., Tansit, T., Srinoulprasert, Y., Klinsukon, N., & Thongtang, N. (2021). The effect of temperature on the stability of PCSK-9 monoclonal antibody: an experimental study. *Lipids in Health and Disease*, 3, 1–8.
- Krepper, W., Satzer, P., Maria, B., & Jungbauer, A. (2018). Temperature dependence of antibody adsorption in protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1551, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.059>
- Kustiningsih, Y., Megawati, N., Kartiko, J. J., & Lutpiatina, L. (2017). Pengaruh Variasi Suhu Awal Reagen terhadap Kadar Glukosa Darah Metode Enzimatik. *Medical Laboratory Technology Journal*, 3(1), 27. <https://doi.org/10.31964/mltj.v3i1.147>
- Lempiäinen, A., Hotakainen, K., Alfthan, H., & Stenman, U. H. (2012). Loss of human chorionic gonadotropin in urine during storage at -20°C. *Clinica Chimica Acta*, 413(1–2), 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.09.038>
- Lin, J., Dai, W., Li, W., Xiao, L., Luo, T., Guo, Y., ... Xia, X. (2021). Potential False-Positive and False-Negative Results for COVID-19 IgG / IgM Antibody Testing After heat inactivation. *Frontiers in Medicine*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.589080>
- Ma, H., O'fagain, C., & Richard, O. (2020). Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement. *Biochimie*, 177, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.08.019>
- Makalew, L. A., Hermanus, V. A., & Sunarti, N. M. (2013). Waktu Inkubasi Pemeriksaan WIDAL dan Antigen O Salmonella typhi dengan Metode Tabung. *JIK*, 8(1), 77–81.
- Marfia, N., Iqbal, M., & Juliatia, P. (2018). Identifikasi Hormon HCG pada Tes Kehamilan. *Jurnal Ipb*, 1(1), 35–55.
- Marliana, N., & Widhyasih, R. M. (2018). BAHAN AJAR TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK (TLM) IMUNOSEROLOGI. In *Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan*.
- Ng, A. H. C., Choi, K., Luoma, R. P., Robinson, J. M., Wheeler, A. R., Diagnostics, A., ... States, U. (2012). *Digital Microfluidic Magnetic Separation for Particle-Based Immunoassays*.
- Nwabuobi, C., Arlier, S., Schatz, F., Guzeloglu-Kayisli, O., Lockwood, C. J., & Kayisli, U. A. (2017). hCG: Biological functions and clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms18102037>
- Pastorino, B., Touret, F., Gilles, M., & Lamballerie, X. De. (2020). *Samples: What Protocols for Biosafety*, 6–13.
- Puspa, K. D., Mursinah, & Budianto, R. R. (2013). Stabilitas Immunoglobulin M ( IgM ) Campak pada Dried Serum Spots. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 3(2), 46–51.
- Raehun, Jiwintarum, Y., & Pauzi, I. (2019). Pengaruh Waktu Penyimpanan Antiserum Terhadap Daya Aglutinasi Metode Slide. *Jurnal Analisis Medika Bio Sains*.
- Siregar, M. T., Wulan, W. S., Setiawan, D., & Nuryati, A. (2018). Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medik (Tlm) Kendali Mutu. In *Pusat Pendidikan Sumber Daya*

*Manusia Kesehatan Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan.*

SARS-CoV-2: Virus inactivation , VTM selection , and sample preservation. *Biosafety and Health*, 3(5), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2021.09.001>

Stan, R. C., Francoso, K. S., Alves, R. P. S., Ferreira, L. C. S., Soares, I. S., & DeCamargo, Ma. M. (2019). Febrile temperatures increase in vitro antibody affinity for malarial and dengue antigens. *Neglected Tropical Diseases*, 1–10.

Suharlina, S., DIVAnalis Kesehatan, P., & Padang, Stik. (2018). Uji Kesesuaian Pemeriksaan Kehamilan Metode Strip Test Dengan Metode Aglutinasi. *Prosiding Seminar Kesehatan Perintis E*, 1(1), 2622–2256.

Telleng, P. A., Santosa, B., & Kartika, A. I. (2023). Comparison of HCG Levels in Reagents Temperature 25°C and 8°C Using ELISA Method. *Medicra (Journal of Medical Laboratory Science/Technology)*, 6(1), 10–14. <https://doi.org/10.21070/medicra.v6i1.1709>

Woldesemayat, B., Gebremicael, G., Zealiyas, K., Yilma, A., & Adane, S. (2022). *Effect of heat inactivation for the detection of severe acute respiratory syndrome - corona virus - 2 ( SARS - CoV - 2 ) with reverse transcription real time polymerase chain reaction ( rRT - PCR ) : evidence from Ethiopian study*. 7, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07134-7>

Xu, E., Li, T., Chen, Q., Wang, Z., & Xu, Y. (2021). *Study on the Effect and Application Value of Heat-Inactivated Serum on the Detection of Thyroid Function , Tumor Markers , and Cytokines During the SARS-CoV-2 Pandemic*. 8(October), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.742067>

Xue, Y., Zhang, X., Zhou, C., Zhao, Y., Cowan, D. A., Heaphy, S., ... Ventosa, A. (2006). *a novel alkalithermophilic bacterium from a hot spring in China*. 0, 1217–1221. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64105-0>

Zhou, H., Wang, C., Rao, J., Chen, L., Ma, T., Liu, D., ... Xu, S. (2021). Biosafety and Health The impact of sample processing on the rapid antigen detection test for