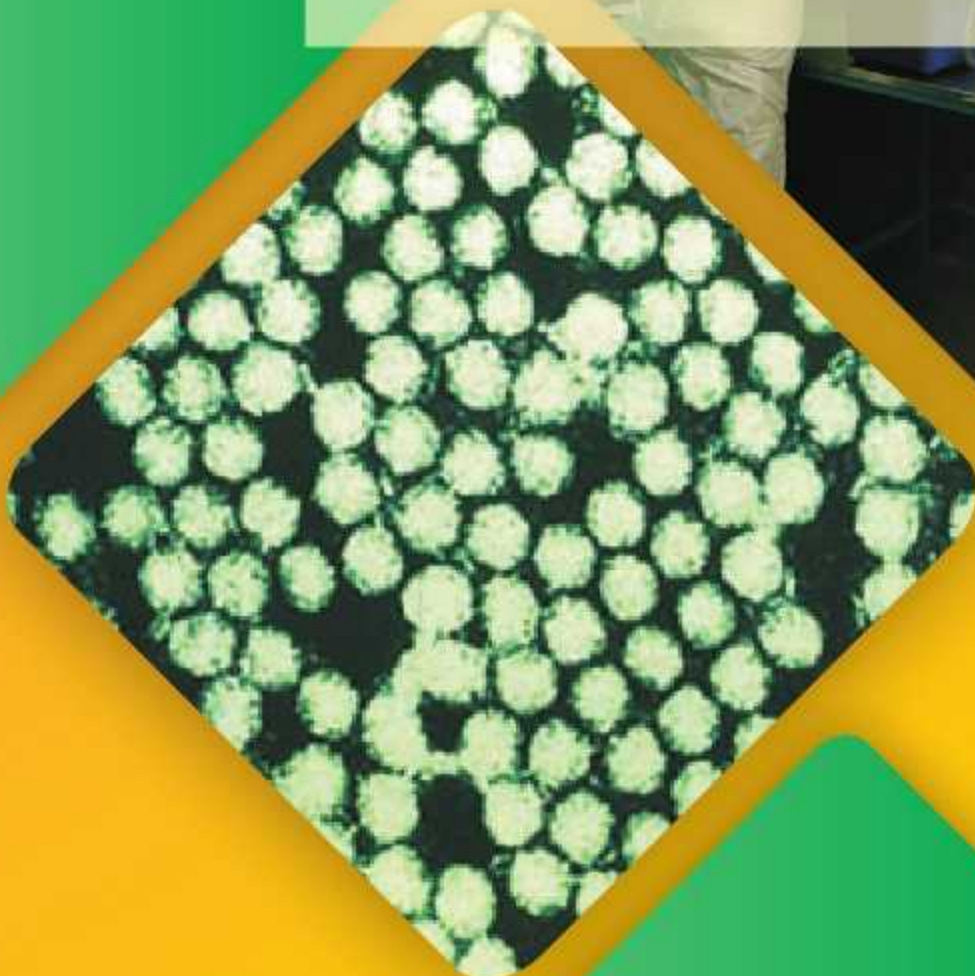


Prosedur Operasional Baku
Standard Operating Procedure

S O P



UJI ELISA
NON-STRUCTURAL PROTEIN (NSP)
UNTUK DETEKSI ANTIBODI
PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK)



KEMENTERIAN PERTANIAN
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
PUSAT VETERINER FARMA

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karuniaNya PROSEDUR OPERASIONAL BAKU-STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) UJI ELISA NON STRUCTURAL PROTEIN (NSP) UNTUK DETEKSI ANTIBODI PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK) Pusat Veteriner Farma ini dapat tersusun.

Pusat Veteriner Farma (Pusvetma) Surabaya merupakan Unit Pelaksana Teknis (UPT) Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian. yang bertanggung jawab kepada Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Sebagaimana tercantum pada Peraturan Menteri Pertanian Nomor 39/Permentan/OT.140/6/2012 tentang Organisasi dan Tata Kerja PUSAT VETERINER FARMA, menyebutkan bahwa tugas pokok dan fungsi Pusvetma adalah melaksanakan produksi, pengujian, distribusi dan pemasaran serta pengembangan produk vaksin, antisera, diagnostika dan bahan biologis lain serta bertanggung jawab atas pelaksanaan surveilans dan diagnosa penyakit mulut dan kuku; pelaksanaan uji rujukan penyakit mulut dan kuku; dan pelaksanaan pengendalian penyakit mulut dan kuku.

SOP Uji Elisa Non Structural Protein PMK untuk Deteksi Antibodi Penyakit Mulut Dan Kuku (PMK) Pusat Veteriner Farma ini disusun dengan maksud untuk memberikan pedoman bagi seluruh pegawai dan masyarakat pengguna layanan/pelanggan/stake holder Pusat Veteriner Farma dalam menyelenggarakan pelayanan publik dan memberikan informasi yang terkait dengan pelayanan Pusat Veteriner Farma khususnya Penyakit Mulut dan Kuku. Selain itu, dengan penetapan dan penerapan SOP Uji Elisa Non Structural Protein PMK untuk Deteksi Antibodi Penyakit Mulut Dan Kuku (PMK) Pusat Veteriner Farma ini maka akan tercipta pelayanan publik yang jelas, berkualitas, cepat, transparan, mudah, terjangkau dan terukur demi terwujudnya pelayanan prima dan diperolehnya kepercayaan masyarakat.

Pada akhirnya kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang secara aktif membantu kelancaran penyusunan SOP Uji Elisa Non Structural Protein PMK untuk Deteksi Antibodi Penyakit Mulut Dan Kuku (PMK) Pusat Veteriner Farma ini. Semoga dapat bermanfaat bagi kita semua.



Surabaya, 20 Januari 2020
Kepala Pusat Veteriner Farma,

Drh. Agung Suganda M.Si

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	1
1. PENDAHULUAN	2
1.1. Latar belakang	2
1.2. Etiologi	2
1.3. Diagnosa	3
1.4. Uji ELISA	3
2. PERALATAN	3
3. BAHAN	4
3.1. Reagensia.....	4
3.2. Contoh Uji	4
3.3. Bahan Acuan	4
3.2.1. Kontrol Serum Positif.....	4
3.2.2. Kontrol Serum Negatif.....	4
4. PERSIAPAN	4
4.1. Kualifikasi Penguji	4
4.2. Pembuatan larutan... ..	5
4.3. Persiapan Contoh Uji	5
5. PROSEDUR	5
6. HASIL.....	7
7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH	8
8. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE.....	8
9. DAFTAR PUSTAKA.....	8
LEMBAR KERJA	8

PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK)

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) adalah penyakit epizootika dengan daya tular tinggi (highly contagious) pada hewan berkuku genap/belah yang paling ditakuti di dunia karena menimbulkan kerugian ekonomi dan sosial yang tinggi. Penyakit ini ditandai dengan adanya pembentukan vesikel/lepuh dan erosi di mulut, lidah, gusi, nostril, puting, dan di kulit sekitar kuku. Penularan PMK melalui pernafasan, dapat tersebar melalui angin, lalu-lintas bahan-bahan makanan, ternak, vaksin yang tercemar virus PMK, dan melalui reproduksi. Gejala klinis yang ditimbulkan dapat bervariasi tergantung galur virus PMK yang menyerang, jumlah virus, umur dan jenis breed hewan, host dan derajat kekebalan dari host. Gejala bervariasi dari yang ringan sampai yang tidak tampak dan bahkan sampai berat. Pada sapi terjadi demam (pyrexia), tidak mau makan (anoreksia), gemetaran, pengurangan produksi susu selama 2-3 hari. Terjadi lepuh-lepuh yang terbentuk di dalam mulut. Lepuh-lepuh ini mudah pecah 24 jam setelah terbentuk sehingga isinya mudah keluar dan meninggalkan erosi. Adanya infeksi sekunder akan menunda kesembuhan lesi (Subronto 1997). (OIE 2018). Pada kambing dan domba, pyrexia, pincang dan lesi ringan pada oral, lesi pada kaki sepanjang mahkota band atau ruang interdigital lesi pada dental pad. Pada babi terjadi pyrexia. Setelah PMK dinyatakan bebas di Indonesia tahun 1986, maka saat ini PMK merupakan penyakit eksotis (penyakit yang tidak ada di suatu negara, tetapi dapat ditemukan di negara lain) bagi Indonesia.

1.2. Etiologi

Penyakit ini disebabkan oleh enterovirus yang sangat kecil dari famili Picornaviridae, Genus Aphthovirus. Ada tujuh tipe virus PMK, yakni A, O, C, Asia1, South African Territory (SAT) 1, 2, 3. Setiap tipe virus PMK masih terbagi lagi menjadi sub tipe dan galur (strain). Virus penyebab PMK ini berdiameter 10 – 20 milimikron dan terbentuk dari Ribonucleic acid (RNA) serta diselubungi oleh protein.

1.3. Diagnosa Penyakit

Diagnosa PMK di lapangan dilakukan berdasarkan gambaran epidemiologi PMK yang hanya menyerang ruminansia dan babi dengan morbiditas tinggi dan kasus kematian (case fatality) yang rendah, gejala klinis seperti pincang, lepuh-lepuh di mulut dan hypersalivasi yang disertai demam. Sedangkan diagnosa laboratoris bisa dilakukan dengan isolasi, serologis (ELISA) dan molekular (PCR). Mengingat penyebaran penyakit sangat tinggi, maka uji molekular PCR merupakan uji yang direkomendasikan OIE.

1.4. Uji Elisa Untuk Deteksi Antigen Dan Antibodi PMK

Uji ELISA untuk deteksi antibodi PMK pada sampel serum darah, dapat dilakukan dengan 2 metoda yaitu metode ELISA Non Struktural Protein (NSP) dan metoda ELISA LPB. ELISA NSP adalah metoda ELISA yang digunakan untuk screening antibodi PMK pada sampel serum, sedangkan ELISA LPB untuk konfirmasi spesifik antibody terhadap A,O atau Asia 1. Protein NSP PMK adalah antigen protein yang terdapat dalam virus PMK. Protein NSP ini tidak terdapat dalam virus PMK yang digunakan sebagai vaksin PMK karena protein tersebut hilang pada waktu proses inaktivasi virus untuk vaksin. Sampel positif tidak akan menunjukkan adanya perubahan warna (tetap bening) apabila direaksikan dengan substrat TMB dan stopper.

2. PERALATAN

Beberapa peralatan yang digunakan adalah:

- a. Incubator (37°C),
- b. Komputer
- c. Reader (Thermo scientific).
- d. ELISA Washer (Imunowash Bio-Rad model 1575),
- e. Shaker (Titertex),
- f. Multichanel pippet (effendorf),
- g. Microtip 200 ul dan 100 ul.
- h. Microtiter 96 lubang (Nunc),
- i. Refrigerator, tabung effendorf

3. BAHAN UJI

3.1. Reagensia

Bahan Uji ELISA untuk deteksi antibody untuk deteksi antibody menggunakan Kit ELISA PrioCHECK FMDVNS buatan Thermo Fisher Scientific yang didalamnya berisi:

Test plate (5), conjugate, dilution buffer, additive, demineralize water, washing fluid, positive control, weak positive control, negative control, chromogen (TMB) substrate, stop solution dan certificate analyse.

3.2. Contoh Uji

Contoh uji untuk pemeriksaan ELISA PMK adalah serum darah sapi, kambing, domba atau babi. Semua contoh uji harus dianggap berbahaya mengandung virus PMK sehingga penanganan pengujian dilakukan sesuai dengan standard Biosafety dan Biosecurity laboratorium PMK.

3.3. Bahan Acuan

3.3.1. Kontrol Serum positif

Bahan acuan kontrol positif yang digunakan adalah serum positif antibodi PMK terstandar bersertifikat yang sudah ada pada Kit ELISA PrioCHECK FMDVNS buatan Thermo Fisher Scientific.

3.3.2. Kontrol serum Negatif

Kontrol serum negatif yang digunakan adalah serum negatif terstandar dan bersertifikat yang sudah ada pada Kit ELISA PrioCHECK FMDVNS buatan Thermo Fisher Scientific.

4. PERSIAPAN

4.1. Kualifikasi Penguji

Penguji adalah petugas yang terlatih melakukan pengujian ELISA PMK dan bersertifikat melaksanakan pengujian ELISA PMK yang dikeluarkan oleh Pusvetma dan ditunjuk oleh Kepala Balai. Walaupun PMK bukan penyakit zoonosis tetapi untuk menjamin keamanan, maka pengujian PMK harus dilakukan pada biosafety containment laboratorium yang sesuai dengan pengujian ELISA PMK.

4.2. Pembuatan Larutan

Persiapan pengujian dilakukan dengan mengikuti acuan dari Kit ELISA (lihat cara penggunaan Kit – usage guideline) dan arahan Pusvetma sbb:

- a. Pembuatan Larutan working buffer.
- b. Pembuatan larutan additive
- c. Buffer ELISA
- d. Larutan Conjugate
- e. Larutan pencuci (washing buffer)

4.3. Persiapan contoh uji

Sampel yang diuji harus disiapkan dan ditangani dengan baik dengan memperhatikan rantai dingin selama transportasi sehingga sampel yang diuji dalam keadaan bagus. Kualitas dari sampel sangat berpengaruh terhadap hasil pengujian. Semua sampel uji harus dianggap berbahaya sehingga penanganan sampel harus dilakukan secara hati-hati dan desinfektan harus tersedia untuk mensterilkan semua bahan habis pakai.

5. PROSEDUR

Hari Pertama

a. Menyiapkan larutan / solution

1. Dilution Buffer Working Solution (DBWS)
"Dilution Buffer (2x)" (komponen 3) dilarutkan dengan demineralized water dengan perbandingan 1:1, misalnya untuk 1 "tes plate" perlu 24 ml DBWS maka campurkan 12 ml dilution buffer (2x) dan 12 ml demineralized water.
2. Additive
Larutkan "Additive" (component 4) dengan 2,5 ml Demineralized Water (komponen 5). Additive yang sudah larut dapat disimpan pada suhu -20°C sampai tanggal expirasi.
3. Elisa Buffer
Campurkan additive dan DBWS dengan perbandingan 1:10, misalkan untuk 1 "tes plate" perlu 24 ml "elisa buffer", maka campurkan 2,4 ml additive dengan 21,6 ml DBWS. "Elisa buffer" yang tersisa bisa disimpan pada suhu $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

4. Washing Solution

Tambahkan "washing fluid (200x)" (component 6) dengan demineralized water dengan perbandingan 1 : 200. Misalnya untuk 1000 ml "washing solution" campurkan 5 ml Washing fluid (200x) dengan 995 ml Demineralized Water.

b. Inkubasi serum tes

1. Masukkan 80 μ l "elisa buffer" ke semua sumuran "tes plate" (komponen 1). Sisa "elisa buffer" disimpan pada suhu $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.
2. Masukkan 20 μ l "kontrol negatif" (komponen 9) ke sumuran A1 dan B1
3. Masukkan 20 μ l "kontrol positif" lemah (komponen 8) ke sumuran C1 dan D1
4. Masukkan 20 μ l "kontrol positif" (komponen 7) ke sumuran E1 dan F1
5. Masukkan 20 μ l serum yang akan di tes ke sumuran yang tersisa
6. Tutup "tes plate" dengan sealer
7. Goyangkan tes plate dengan lembut
8. Lakukan inkubasi selama 16-18 jam pada suhu $22\pm 3^{\circ}\text{C}$

Hari Kedua

a. Inkubasi dengan konjugate

1. Siapkan "conjugate dilution", dengan mencampurkan "Conjugate (30x)" (komponen 2) dan "elisa buffer" dengan perbandingan 1 :30. Misalnya untuk 1 "tes plate" perlu 12 ml conjugate dilution, maka campurkan 400 μ l Conjugate (30x) dengan 11,6 ml "elisa buffer".
2. Kosongkan "tes plate" setelah inkubasi, kemudian cuci dengan "washing solution" sebanyak 200-300 μ l, diulang 6 kali.
3. Masukkan 100 μ l "conjugate dilution" ke semua sumuran dari "test plate".
4. Inkubasi selama 60 ± 5 menit pada suhu $22\pm 3^{\circ}\text{C}$

b. Inkubasi dengan Chromogen Substrat (TMB)

1. Kosongkan "tes plate" setelah inkubasi, kemudian cuci dengan "washing solution" sebanyak 200-300 μ l, diulang 6 kali.
2. Masukkan 100 μ l "Chromogen Substrat (TMB)" (komponen 10) ke semua sumuran dari "test plate".

3. inkubasi selama 20 menit pada suhu $22 \pm 3^\circ \text{C}$
4. Tambahkan "Stop Solution" (komponen 11) ke semua well
5. Goyangkan test plate dengan lembut agar bercampur.

c. Pembacaan hasil test

Lakukan pembacaan Optical density (OD) dengan panjang gelombang 450 nm. Lakukan pembacaan OD segera dan jangan melebihi 15 menit setelah penambahan "stop Solution"

6. HASIL

Perhitungan Hasil Test

- Perhitungan rata-rata OD_{450} dari sumuran A1 dan B1 (kontrol Negatif) merupakan " OD_{450} Max"
- Hasil pembacaan OD_{450} dari semua sampel dihitung dengan "Presentasi Inhibisi" (PI) dengan rumus :

$$PI = 100 - \left[\frac{OD_{450} \text{ sample tes}}{OD_{450} \text{ Max}} \right] \times 100$$

Interpretasi Hasil

Persyaratan validasi uji

- OD_{450} Max (rata rata OD_{450} kontrol negatif) harus $> 1,00$
- Rata rata nilai PI dari kontrol positif lemah $> 50\%$
- Rata rata nilai PI dari kontrol positif $> 70\%$
- Jika ada yang tidak memenuhi kriteria diatas maka hasil tes dinyatakan tidak valid dan dapat diabaikan

Interpretasi PI

- PI dari tes sampel apabila $< 50\%$ adalah negatif yaitu tidak ada antibody Non Struktural protein pada serum tes
- PI dari tes sampel apabila $\geq 50\%$ adalah positif yaitu ada antibody Non Struktural protein pada serum tes

6. RETENSI DAN PEMUSNAHAN SAMPEL/BIOSAFETY & BIOSECURITY

Pemusnahan sampel dilakukan sesuai dengan SOP pemusnahan sampel yang berlaku. Personel yang melakukan ELISA NSP merupakan personil yang telah mendapatkan pelatihan tentang biosafety dan biosecurity.

7. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE

Hasil uji ELISA dikatakan valid apabila memenuhi kriteria sesuai interpretasi hasil cara kerja kit tersebut, yaitu : OD450 Max (rata rata OD450 kontrol negatif) harus $>1,00$; rata rata nilai PI dari kontrol positif lemah $>50\%$; rata rata nilai PI dari kontrol positif $>70\%$. Apabila tidak memenuhi salah satu dari kriteria diatas maka hasil uji dianggap tidak valid, dan perlu dilakukan pengujian ulang. Penyimpanan bahan uji, sampel yang di uji, kontrol positif, kontrol positif lemah dan negatif harus dilakukan sesuai dengan persyaratan yang tercantum dalam brosur penggunaan.

8. LAMPIRAN

Pada kit Elisa NSP Priocek hanya disediakan demineralized water untuk pengenceran additive. Untuk demineralized water yang digunakan pencampuran bahan lain disediakan oleh masing masing Lab penguji.

9. DAFTAR PUSTAKA

Office International des Epizooties, Manual of Standards for Diagnostic Tests And Vaccines, 2012.

PrioCHECK FMDV NSP (*Non-Structural Protein*) Elisa Kit, version 1.0e.

Standar Terintegrasi Sistem Manajemen Mutu dan Anti Penyuapan; SNI ISO 9001:2015, SNI ISO 37001:2016

Standar Sistem Manajemen Laboratorium Pengujian Mutu; ISO IEC 17025:2017

LEMBAR KERJA

LEMBAR KERJA ELISA DETEKSI ANTIBODI PMK

Nomor Epi : Tanggal terima :
Kode Lab : Tanggal pengujian :
Jumlah contoh uji : Penguji :
Jenis contoh uji : Penyelia :
Jenis Hewan : Operator Input Data :
Kondisi contoh uji :

Identifikasi Reagen

Kit Elisa yang digunakan:Produksi.....Batch No.....

Perlakuan serum: Inaktifasi.....

Kesimpulan Reagen

.....
.....

HASIL UJI

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LAMPIRAN HASIL UJI

NO EPI	NAMA CONTOH	KODE LAB	ASAL CONTOH	HASIL	CATATAN
Dst					

KESIMPULAN

SARAN

.....

Tanggal

Penguji

Penanggung Jawab Lab

(.....)

(.....)