



Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan  
Kementerian Pertanian

**Prosedur Operasional Baku**  
*Standard Operating Procedure*

---

**SOP**

# **UJI ELISA LIQUID PHASE BLOCKING (LPB) UNTUK DETEKSI ANTIBODI PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK)**

## **Pusat Veteriner Farma**

Jl. Pusat Veteriner Farma Jl. Ahmad Yani 68 - 70 Surabaya, Jawa Timur 60231  
Telpon (031) 829 1124; Fax (0361) 829 1125  
Email: [pusvetma@pertanian.go.id](mailto:pusvetma@pertanian.go.id)  
Website: <http://pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id/home>

## HALAMAN REVISI

Revisi	Penulis	Mengesahkan	Tanggal pengesahan

Revisi	Tanggal	Rincian perubahan

<b>Penulis</b>	Drh. Firdaus Lingga Drh Siti Hanifah Drh Agung Suganda, M. Si Drh Dwi Kurnia L, M.Si	Agustus 2019
<b>Disahkan oleh</b>	Drh. Agung Suganda, M.Si	
<b>Publikasi oleh</b>	Pusat Veterinaria Farma	

# DAFTAR ISI

<b>1. PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1 Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)	1
1.2 Etiologi	1
1.3 Diagnosa Penyakit	1
1.4 Uji ELISA untuk Deteksi Antigen dan Antibodi PMK	2
1.5 Daftar Pustaka	2
<b>2. PERALATAN</b>	<b>2</b>
<b>3. BAHAN UJI</b>	<b>3</b>
3.1 Reagensia	3
3.2 Contoh Uji	3
3.3 Bahan Acuan	3
<b>4. PERSIAPAN</b>	<b>3</b>
4.1 Kualifikasi Penguji	3
4.2 Pembuatan Larutan	4
4.3 Persiapan contoh uji	4
<b>5. PROSEDUR</b>	<b>4</b>
<b>6. HASIL</b>	<b>5</b>
<b>7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH</b>	<b>6</b>
<b>8. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE</b>	<b>6</b>
<b>9. LAMPIRAN</b>	<b>6</b>
<b>10. LEMBAR KERJA</b>	<b>7</b>

# 1. PENDAHULUAN

## 1.1 Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)

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*), gemeteran, 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, pyreksia, 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 contoh 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 contoh serum, sedangkan ELISA LPB untuk konfirmasi spesifik antibody terhadap A,O atau Asia 1.

## 1.5 Daftar Pustaka

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

Standar Sistem Manajemen Mutu ISO 9001:2008

Standar Sistem Manajemen Mutu ISO IEC 17025:2017

## 2. PERALATAN

1. Beberapa peralatan yang digunakan adalah:
2. Komputer
3. Ballpoint Marker
4. Reader (Multickan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific).
5. ELISA Well Wash (Thermo Scientific™),
6. Glassware/Plasticware (glassbeaker 20-4000ml, flash 50-1000ml), fluid container,
7. ELISA Plate, NUNC Immunoplate (atau dengan spesifikasi sama)
8. Transfer plate; U bottom 96 well plate, (merek bebas)
9. Timer,
10. Handuk,
11. Shaker,
12. Singlechannel pipet,
13. Multichannel pipet,
14. Mikropipet stand,
15. Microtip 5000 µl, 1000 µl, 200 µl, dan 100 µl.
16. Microtube,
17. Tabung ukur 100 ml - 1000 ml
18. Refrigerator 1-8 °C
19. Freezer, -30 - -5 °C
20. Incubator Shaker
21. Timbangan dengan akurasi 0,01 gr
22. Ph Meter

## 3. BAHAN UJI

### 3.1 Reagensia

Bahan Uji ELISA untuk deteksi antibody menggunakan Kit ELISA LPB dari Phirbright, terdiri dari : Trapping Antibody (Rabbit anti FMDV serotype O,A, dan Asia 1); Control Antigen (FMDV serotype O, A dan Asia 1); Control Sera (Anti FMD serotype O, A, dan Asia 1); Detecting Antibody (Guinea pig anti FMDV serotype A, O, dan Asia 1); Anti spesies Conjugate (horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti guinea pig immunoglobulin); Coating buffer (carbonate/bicarbonate capsule); Wash diluent (PBS tablet), Blocking Detergent (Tween 200 ; Blocking Agen ( skim milk powder); Substrat (Hydrogen peroxidase tablets); Crhromogen (Ortho phenylenediamine (OPD) tablet; Reconstitution Diluent (air denan 0,02% merthiolate); reconstitution diluent 2 ( air dengan glycerol dan 0,02% merthiolate; Chromogen Buffer; Microplates (Nunc Immunoplate 1 Maxisorp dan U Bottom 96 well microplates.

### 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 Antigen

FMDV serotype O, A,

3.3.2. Kontrol Sera

Anti FMDV serotypes O, A, dan Asia 1

## 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:

- 4.2.1. Trapping antibody Stocks
- 4.2.2. Detecting antibody stock
- 4.2.3. Anti-Spesies Conjugate Stock
- 4.2.4. Antigen Stocks
- 4.2.5. Control serum Stocks
- 4.2.6. Chromogen Buffer
- 4.2.7. Chromogen Substrat
- 4.2.8. Substrat Stock
- 4.2.9. Coating buffer
- 4.2.10. Diluent Buffer A
- 4.2.11. Diluent Buffer B
- 4.2.12. Wash buffer
- 4.2.13. Stopping Solution
- 4.2.14. Test Sera
- 4.2.15. Desinfectan

## 4.3 Persiapan contoh uji

Semua contoh uji harus dianggap berbahaya, sehingga penanganan contoh harus dilakukan secara hati-hati dan bahan kimia (biohazard) seperti Virkon harus tersedia untuk mensterilkan semua bahan habis pakai.

# 5. PROSEDUR

5.3.1. *Trapping antibody*, serum kontrol, *guinea pig*, *conjugate*, stok substrat, stok *chromogen*, *recontitulation diluent#1* dan *recontitulation diluent#1* disimpan dalam *refrigerator* (suhu 1 s.d. 8°C). *Buffer carbonas*, *PBS*, *Tween 20*, *phosphate citrat buffer*, dan *stopper* disimpan dalam suhu ruangan. *Skim milk powder* dan serum contoh disimpan dalam *freezer* (suhu -30 s.d. -5°C) sedangkan kontrol antigen disimpan dalam *deep freezer* (suhu -90 s.d. -50°C)

5.3.2. Coating plate ELISA dengan 50 µl/lubang *trapping antibody* (*rabbit antiserum*) yang sudah diencerkan dengan *coating buffer*, dan diinkubasi semalam dalam 1-8°C.

5.3.3. Siapkan contoh, serum kontrol dan antigen dengan *Diluent Buffer A*.

- 5.3.4. Encerkan antigen sesuai dengan titernya dalam transfer plate.
- 5.3.5. Encerkan serum contoh dan kontrol 1:16 dengan diluent buffer A dan masukkan dalam antigen yang sudah diencerkan dalam *transfer plate*.
- 5.3.6. Inkubasi di atas *shaker* dalam inkubator 37°C selama 1 jam, setelah itu diinkubasi semalam dalam 1-8°C.
- 5.3.7. Cuci ELISA *plate* 3 kali dengan *PBS*.
- 5.3.8. Pindahkan 50  $\mu$ l campuran contoh dan antigen dari *transfer plate* ke ELISA *plate*.
- 5.3.9. Inkubasi di atas *shaker* dalam inkubator 37°C selama 1 jam.
- 5.3.10. Cuci ELISA *plate* 3 kali dengan *PBS*.
- 5.3.11. Tambahkan 50  $\mu$ l/lubang serum *guinea pig* yang telah diencerkan dengan *Diluent Buffer B*.
- 5.3.12. Inkubasi di atas *shaker* dalam inkubator 37°C selama 1 jam.
- 5.3.13. Cuci ELISA *plate* 3 kali dengan *PBS*.
- 5.3.14. Tambahkan 50  $\mu$ l/lubang *conjugate* yang sudah diencerkan dengan *Diluent Buffer B*.
- 5.3.15. Inkubasi di atas *shaker* dalam inkubator 37°C selama 1 jam.
- 5.3.16. Siapkan substrat tetapi jangan diaktivasi.
- 5.3.17. Cuci ELISA *plate* 3 kali dengan *PBS*.
- 5.3.18. Aktivasi substrat dengan  $H_2O_2$  dan masukkan 50  $\mu$ l/lubang dan inkubasi 15 menit dalam suhu ruang.
- 5.3.19. Hentikan reaksi substrat dengan menambah larutan *stopper* 50  $\mu$ l/lubang.
- 5.3.20. Baca nilai *OD* dan hasil ELISA pada ELISA *reader* dengan panjang gelombang 492 nm.

## 6. HASIL

Rumus berdasarkan *FMD Elisa Kit Liquid Phase Blocking Immunoassay*, Pirbright, adalah :

$$PI = 100 - \frac{(\text{OD rata-rata contoh serum} \times 100)}{\text{OD rata-rata kontrol antigen}}$$

**Interpretasi hasil adalah:**

PI > 50 : negatif

PI < 50 : positif

## **7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH/BIOSAFETY & BIOSECURITY**

Peralatan dan bahan sisa Elisa LPB PMK harus didesinfeksi dan di dekontaminasi dengan menggunakan autoclave.

## **8. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE**

Sebelum menghitung nilai PI, bandingkan nilai dari OD Ca Control dengan nilai UCL (upper control limit) dan LCL (lower control limit). Kedua nilai OD nya harus berada pada batasan tersebut, jika tidak maka uji tidak valid. Nilai UCL dan LCL dapat ditemukan pada tiap guidelines Kit Elisa

## **9. LAMPIRAN**

# 10. LEMBAR KERJA

## LEMBAR KERJA

### Elisa Deteksi Antibodi PMK

Nomor Epi : .....

Kode Lab : .....

Jumlah contoh uji : .....

Jenis contoh uji : .....

Jenis Hewan : .....

Tanggal terima : .....

Tanggal pengujian : .....

Penguji : .....

Penyelia : .....

Operator Input Data : .....

Kondisi contoh uji : .....

---

#### Identifikasi Reagen

Kit Elisa yang digunakan: .....

Produksi.....

Batch No.....

Perlakuan serum:

Inaktifasi.....

#### Kesimpulan Reagen

.....

.....

.....

.....

### Hasil Uji

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

### Lampiran Hasil Uji

NO	NO EPI	NAMA CONTOH	KODE LAB	ASAL CONTOH	HASIL	CATATAN
dst						

### Kesimpulan

.....  
 .....

### Saran

.....  
 .....

Tanggal .....

Penguji

Penanggung Jawab Lab

.....

.....



Food and Agriculture  
Organization of the  
United Nations



**USAID**  
FROM THE AMERICAN PEOPLE