



Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan
Kementerian Pertanian

Prosedur Operasional Baku
Standard Operating Procedure

SOP

**UJI ELISA NSP 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
Website: <http://pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id/home>

HALAMAN REVISI

Revisi	Penulis	Mengesahkan	Tanggal pengesahan

Revisi	Tanggal	Rincian perubahan

Penulis	Drh. Firdaus Lingga Kusuma Drh. Agung Suganda, M.Si Drh. Sapto Rini Budi P, M. Imun Drh. Siti Hanifah	Agustus 2019
Disahkan oleh	Drh. Agung Suganda, M.Si Kepala Pusat Veteriner Farma	
Publikasi oleh	Laboratorium Rujukan PMK Pusvetma	

DAFTAR ISI

1. PENDAHULUAN	1
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
2. PERALATAN	2
3. BAHAN UJI	3
3.1 Reagensia	3
3.2 Contoh Uji	3
3.3 Bahan Acuan	3
4. PERSIAPAN	3
4.1 Kualifikasi Penguji	3
4.2 Pembuatan Larutan	4
4.3 Persiapan contoh uji	4
5. PROSEDUR	4
5.1 Hari Pertama	4
5.2 Hari Kedua	5
6. HASIL	6
6.1 Perhitungan Hasil Test	6
6.2 Interpretasi Hasil	6
6.3 Interpretasi PI	6
7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH	7
8. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE	7
9. LAMPIRAN	7
10. LEMBAR KERJA	8

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*), 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, 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, Asia, 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, lepuh² 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 Liquid Phase Blocking (LBP). ELISA NSP adalah metoda ELISA yang digunakan untuk *screening* antibodi PMK pada Contoh serum pada hewan yang terpapar virus lapangan. sedangkan ELISA LPB untuk konfirmasi spesifik antibody terhadap A,O atau Asia. 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. Contoh positif tidak akan menunjukkan adanya perubahan warna (tetap bening) apabila direaksikan dengan substrat TMB dan stopper.

1.5 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 Sistem Manajemen Mutu ISO 9001:2008

Standar Sistem Manajemen Mutu ISO 17025:2017

2. PERALATAN

Beberapa peralatan yang digunakan adalah:

1. Komputer
2. *Reader* (Multickan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific).
3. ELISA Well Wash (Thermo Scientific™),
4. *Shaker*,
5. *Single channel* pipet,
6. *Multichannel* pipet,
7. Mikropipet stand,
8. Microtip 5000 µl, 1000 µl, 200 µl, dan 100 µl.
9. Refrigerator, tabung effendorf

3. BAHAN UJI

3.1 Reagensia

Bahan Uji ELISA 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 antibody 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:

- 4.2.1. Pembuatan Larutan *working buffer*.
- 4.2.2. Pembuatan larutan *additive*
- 4.2.3. Buffer ELISA
- 4.2.4. Larutan Conjugate
- 4.2.5. Larutan pencuci (*washing buffer*)

4.3 Persiapan contoh uji

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

5. PROSEDUR

5.1 Hari Pertama

5.1.1. *Dilution Buffer Working Solution* (DBWS)

Larutkan “Dilution Buffer (2x)” (komponen 3) dengan demineralized water dengan perbandingan 1:1, misalnya untuk 1 “tes plate” perlu 24 ml DBWS maka campurkan 12 ml dilution buffer (2x) dengan 12 ml demineralized water.

5.1.2. *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.

5.1.3. *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±3 °C selama 24 jam.

5.1.4. 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.

5.1.5. Inkubasi serum tes

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

5.2 Hari Kedua

5.2.1. Inkubasi dengan konjugate

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

5.2.2. Inkubasi dengan Chromogen Substrat (TMB)

- Kosongkan “tes plate” setelah inkubasi, kemudian cuci dengan “washing solution” sebanyak 200-300 μl , diulang 6 kali.

- Masukkan 100 µl “Chromogen Substrat (TMB)” (komponen 10) ke semua sumuran dari “test plate”.
- Inkubasi selama 20 menit pada suhu 22±3° C
- Tambahkan “Stop Solution” (komponen 11) ke semua well
- Goyangkan test plate dengan lembut agar bercampur.

5.2.3. 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

6.1 Perhitungan Hasil Test

6.1.1. Perhitungan rata-rata OD₄₅₀ dari sumuran A1 dan B1 (kontrol Negatif) merupakan “OD₄₅₀ Max”

6.1.2. Hasil pembacaan OD₄₅₀ dari semua Contoh dihitung dengan “Presentasi Inhibisi” (PI) dengan rumus:

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

6.2 Interpretasi Hasil

Persyaratan validasi uji

- 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%
- Jika ada yang tidak memenuhi kriteria diatas maka hasil tes dinyatakan tidak valid dan dapat diabaikan

6.3 Interpretasi PI

- PI dari tes contoh apabila <50% adalah negatif yaitu tidak ada antibodi Non Struktural protein pada serum tes
- PI dari tes contoh apabila ≥50% adalah positif yaitu ada antibody Non Struktural protein pada serum tes.

7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH/BIOSAFETY & BIOSECURITY

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

8. 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, contoh yang di uji, kontrol positif, kontrol positif lemah dan negatif harus dilakukan sesuai dengan persyaratan yang tercantum dalam brosur penggunaan.

9. 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.

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