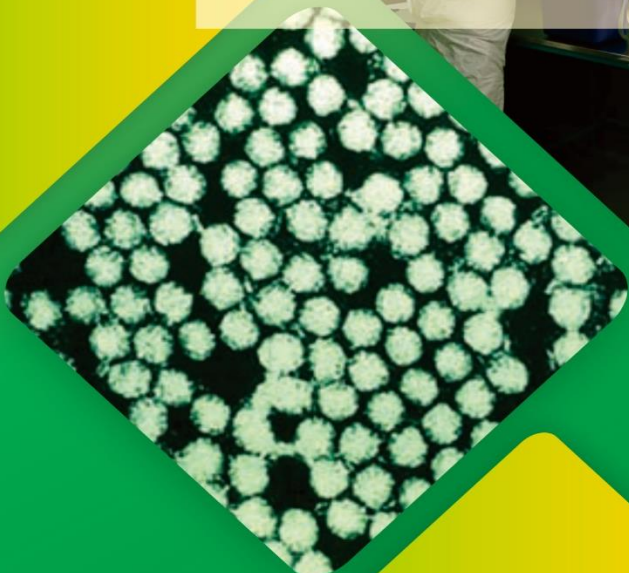


Prosedur Operasional Baku
Standard Operating Procedure

S O P



**UJI ELISA
STRUCTURAL PROTEIN (SP)
UNTUK DETEKSI ANTIBODI
PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK) SEROTIPE 0**



**KEMENTERIAN PERTANIAN
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karuniaNya PROSEDUR OPERASIONAL BAKU-STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) UJI ELISA STRUCTURAL PROTEIN (SP) UNTUK DETEKSI ANTIBODI PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK) SEROTIPE O menggunakan kit ELISA ID.VET, ID Screen® *FMD Type O Competition* Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma ini dapat tersusun.

Balai Besar 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 43 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Unit Pelaksana Teknis Lingkup Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan BAB II, Bagian Kesatu 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 SP PMK untuk Deteksi Antibodi Penyakit Mulut Dan Kuku (PMK) Serotipe O Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma ini disusun dengan maksud untuk memberikan pedoman bagi seluruh pegawai dan masyarakat pengguna layanan/pelanggan/stake holder Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma dalam menyelenggarakan pelayanan publik dan memberikan informasi yang terkait dengan pelayanan Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma khususnya Penyakit Mulut dan Kuku. Selain itu, dengan penetapan dan penerapan SOP Uji Elisa SP PMK untuk Deteksi Antibodi PMK Serotipe O Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma 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 Structural Protein PMK Serotipe O untuk Deteksi Antibodi PMK Pusat Veteriner Farma ini. Semoga dapat bermanfaat kita semua.

Surabaya, 5 Juli 2022

Kepala BBVF Pusvetma,



drh. EBY BUDI SUSILA, M.Si.
NIP. 197404132003121003

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	1
HALAMAN REVISI	2
DAFTAR ISI	3
1. PENDAHULUAN	4
1.1. Penyakit PMK	4
1.2. Etiologi	4
1.3. Diagnosa	4
1.4. Uji ELISA	5
2. ID Screen® FMD NSP Competition.....	5
2.1 Informasi Umum	5
2.2 Deskripsi dan Prinsip	6
2.3 Komponen Kit	6
2.4 Persiapan	7
2.5 Prosedur Pengujian	8
2.6 Hasil	8
3. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH	10
4. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE.....	10
5. LAMPIRAN	10
6. DAFTAR PUSTAKA.....	10
LEMBAR KERJA	11

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, 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. Kejadian wabah di Indonesia pada awal bulan April mengharuskan Pusvetma menyediakan pemeriksaan diagnostic terhadap serotype PMK yang kemungkinan beredar di 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 sampel serum darah, dapat dilakukan dengan 2 metoda yaitu metode ELISA *Non Struktural Protein* (NSP) dan metoda ELISA Liquid Phase Blocking (LPB). ELISA NSP adalah metoda ELISA yang digunakan untuk *screening* antibodi PMK pada sampel 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. Prosedur NSP Elisa yang digunakan sesuai petunjuk penggunaan dari Kit ELISA NSP PrioCHECK FMDVNS buatan Thermo Fisher Scientific, Pirbright. Sedangkan Prosedur Elisa Kompetitif *Structural Protein* (SP) berdasarkan Petunjuk Penggunaan yang terdapat pada KIT ELISA dari ID.VET, ID Screen® *FMD Type A dan O Competition*. Pemeriksaan dilakukan sebagai *screening test Competitive Elisa* untuk deteksi antibodi terhadap virus Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) serotipe A dan O (Penggunaan secara in vitro). Sampel positif tidak akan menunjukkan adanya perubahan warna (tetap bening) apabila direaksikan dengan substrat TMB dan stopper. Metode tersebut dapat digunakan untuk serum (atau plasma) dari sapi, domba, kambing, babi atau spesies rentan lainnya.

2. ID Screen® FMD Type O Competition – iD.vet KIT

Prosedur ini didasarkan pada Petunjuk Penggunaan yang terdapat dalam KIT ELISA dari ID.VET, ID Screen® FMD Type O Competition. Pemeriksaan dilakukan sebagai uji skrining Elisa Kompetitif untuk deteksi antibodi terhadap virus Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) serotipe O (in vitro use).

2.1 Informasi Umum

Kit diagnostik ini dirancang untuk mendeteksi antibodi terhadap virus Penyakit Kaki dan Mulut (FMDV) serotipe O oleh ELISA kompetitif.

Metode ini sesuai untuk serum atau plasma dari sapi, domba, kambing, babi dan semua spesies yang rentan.

2.2 Deskripsi dan Prinsip

- Microwell dilapisi dengan antigen FMDV tipe O yang tidak menular.
- Sampel yang akan diuji dan kontrol ditambahkan ke microwells. Antibodi anti-serotipe O, jika ada, membentuk kompleks antigen-antibodi yang menutupi epitop virus.
- Konjugat anti-serotipe O lobak peroksidase (HRP) ditambahkan ke sumur. Ini memperbaiki epitop bebas yang tersisa, membentuk kompleks antigen-konjugat-HRP.

- Konjugat berlebih dihilangkan dengan mencuci, dan ditambahkan larutan substrat (TMB).
- Warna yang dihasilkan tergantung pada jumlah antibodi spesifik yang ada dalam sampel yang akan diuji:
 - Bila tidak terdapat antibodi, larutan biru muncul yang menjadi kuning setelah penambahan larutan berhenti.
 - Bila terdapat antibodi, tidak ada warna yang muncul.
- Microplate dibaca pada panjang gelombang 450 nm.

2.3 Komponen Kit

Reagen
Microplate coated with inactive FMDV antigen serotype O
Concentrated conjugate (10X)
Positive Control
Negative Control
Dilution Buffer 13
Dilution Buffer 14
Wash Concentrate (20X)
Substrate Solution (TMB)
Stop Solution (0.5 M)

*Jumlah yang disediakan ditunjukkan pada label kit

1. Konjugat, kontrol dan larutan substrat harus disimpan pada suhu 5 ± 3 °C
2. Reagen lain dapat disimpan antara 2 °C – 26 °C.
3. Komponen dengan nama yang sama (*wash solution, dilution buffers*) dapat digunakan untuk seluruh rangkaian produk IDvet.

Keamanan hayati

IDvet memastikan bahwa semua komponen ID.VET, ID Screen® FMD Type O Competition tidak mengandung agen infeksi:

- Antigen FMD Serotipe O yang melapisi *microplates* adalah tidak aktif sesuai dengan protokol yang dijelaskan dalam manual OIE.
- Sera yang digunakan untuk kontrol positif berasal dari vaksin hewan dan diiradiasi dengan dosis 32 Kgy.

Bahan yang dibutuhkan tetapi tidak disediakan

1. Mono atau *multi-channel* mikropipetor yang mampu menghasilkan volume 20 μ L, 50 μ L, 100 μ L, dan 200 μ L.
2. Tips sekali pakai.
3. Air suling atau deionisasi.
4. Sistem pencucian manual atau otomatis.
5. *Elisa Reader 96 well*.

Tindakan pencegahan

1. Jangan lakukan pemipetan melalui mulut.
2. *Substrate solution* dapat mengiritasi kulit.
3. *Stop solution* (0,5 M) mungkin berbahaya jika tertelan. Ini dapat menyebabkan sensitisasi melalui kontak kulit (R22-43). Hindari kontak dengan kulit (S24-37).
4. Jangan biarkan larutan substrat terkena cahaya terang atau zat pengoksidasi.
5. Semua bahan sekali pakai yang digunakan untuk pengujian harus didekontaminasi dengan perendaman dalam natrium hipoklorit 5% yang baru disiapkan selama minimal 1 jam sebelum eliminasi, atau dengan autoklaf pada suhu 120 °C.

2.4 Persiapan

Persiapan sampel

Untuk menghindari perbedaan waktu inkubasi antar spesimen, *96-well plate* berisi spesimen uji dan kontrol, sebelum memindahkannya ke ELISA *microplate* menggunakan pipet *multichannel*.

Persiapan *Washing Solution*

Jika perlu, bawa *Wash Concentrate* (20X) ke suhu kamar dan aduk rata untuk memastikan bahwa *Wash Concentrate* (20X) benar-benar larut.

Siapkan *Washing Solution* (1X) dengan mengencerkan *Wash Concentrate* (20 X) hingga 1/20 dalam air suling/deionisasi.

2.5 Prosedur Pengujian

Biarkan semua reagen mencapai suhu kamar ($21\pm5^{\circ}\text{C}$) sebelum digunakan. Homogenisasi semua reagen dengan inversi atau *vortex*.

1. Tambahkan:
 - ✓ 50 μL *Dilution Buffer* 14 untuk setiap *well*.
 - ✓ 20 μL Kontrol Positif ke *well* A1 dan B1.
 - ✓ 20 μL Kontrol Negatif ke *well* C1 dan D1.
 - ✓ 20 μL dari setiap sampel yang akan diuji ke *well* yang tersisa.
2. Tutup *plate* dan inkubasi selama 45 ± 4 menit pada suhu 21°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$).
3. Kosongkan *wells*. Cuci setiap *well* 5 kali dengan sekitar 300 μL Larutan Cuci 1X. Hindari mengeringkan *well* di antara pencucian.
4. Siapkan *Conjugate* 1X dengan mengencerkan *Concentrated Conjugate* 10X hingga 1:10 dalam *Dilution Buffer* 13.
5. Tambahkan 100 μL *Conjugate* 1X ke masing-masing *well*.
6. Tutup *plate* dan inkubasi selama 30 menit $\pm$ 3 menit pada suhu $21\pm5^{\circ}\text{C}$.
7. Kosongkan *wells*. Cuci setiap *well* 5 kali dengan setidaknya 300 μL *Wash Solution*. Hindari mengeringkan *wells* di antara pencucian.
8. Tambahkan 100 μL *Substrate Solution* ke setiap *well*.
9. Tutup *plate* dan inkubasi selama 15 menit $\pm$ 2 menit pada suhu $21\pm5^{\circ}\text{C}$ dalam gelap.
10. Tambahkan 100 μL *Stop Solution* ke setiap *well* untuk menghentikan reaksi.
11. Baca dan rekam OD pada panjang gelombang 450 nm

2.6 Hasil

Validasi

Pengujian divalidasi jika:

- ✓ Nilai rata-rata OD Kontrol Negatif (ODNC) lebih besar dari 0,7

$$\text{OD}_{\text{NC}} > 0,7$$

- ✓ Nilai rata-rata OD Kontrol Positif (ODPC) kurang dari 30% dari ODNC

$$\text{OD}_{\text{PC}} / \text{OD}_{\text{NC}} < 0,3$$

Interpretasi

Untuk setiap sampel, hitung persentase *competition* (S/N%):

$$S/N \% = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{PC}}}{OD_{\text{NC}} - OD_{\text{PC}}} \times 100$$

Untuk sampel Bovine, Ovine, Caprine dan spesies lainnya:

Sampel yang disajikan dengan S/N%:

- ✓ Kurang dari atau sama dengan 35% dianggap positif.
- ✓ Lebih besar dari 35% dan kurang dari atau sama dengan 45% dianggap *doubtful*.
- ✓ Lebih besar dari 45% dianggap negatif.

Sampel Bovine, Ovine, Caprine	
Hasil	Status
$S/N\% \leq 35\%$	POSITIF
$35\% < S/N\% \leq 45\%$	<i>DOUBTFUL</i>
$S/N\% > 45\%$	NEGATIF

Untuk Sampel Porcine dengan S/N%:

- ✓ Kurang dari atau sama dengan 50% dianggap positif.
- ✓ Lebih besar dari 50% dan kurang dari atau sama dengan 60% dianggap *doubtful*.
- ✓ Lebih besar dari 60% dianggap negatif.

Sampel Porcine	
Hasil	Status
$S/N\% \leq 50\%$	POSITIF
$50\% < S/N\% \leq 60\%$	<i>DOUBTFUL</i>
$S/N\% > 60\%$	NEGATIF

3. RETENSI DAN PEMUSNAHAN SAMPEL/BIOSAFETY & BIOSECURITY

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

4. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE

Hasil uji ELISA dikatakan valid apabila memenuhi kriteria sesuai interpretasi hasil cara kerja kit tersebut, yaitu: Nilai OD Kontrol Negatif (OD_{NC}) lebih besar dari 0.7 dan Rasio nilai OD Kontrol Positif dan Negatif (OD_{PC} dan OD_{NC}) kurang dari 0.3. 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 dan negatif harus dilakukan sesuai dengan persyaratan yang tercantum dalam brosur penggunaan.

5. LAMPIRAN

Demineralized water yang digunakan untuk pencampuran bahan lain disediakan oleh masing masing Lab penguji.

6. DAFTAR PUSTAKA

Office International des Epizooties. OIE Terrestrial Manual Foot And Mouth Disease (Infection With Foot And Mouth Disease Virus. 2021.
Petunjuk Penggunaan Kit ELISA ID.VET, ID Screen® *FMD Type O Competition (FMDOC ver 0314 GB)*
Standar Sistem Manajemen Mutu dan Anti Penyuapan; SNI ISO 9001:2015, SNI ISO 37001:2016
Standar Sistem Manajemen Laboratorium Pengujian Mutu; ISO/IEC 17025:2017

1. 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

(.....)

(.....)