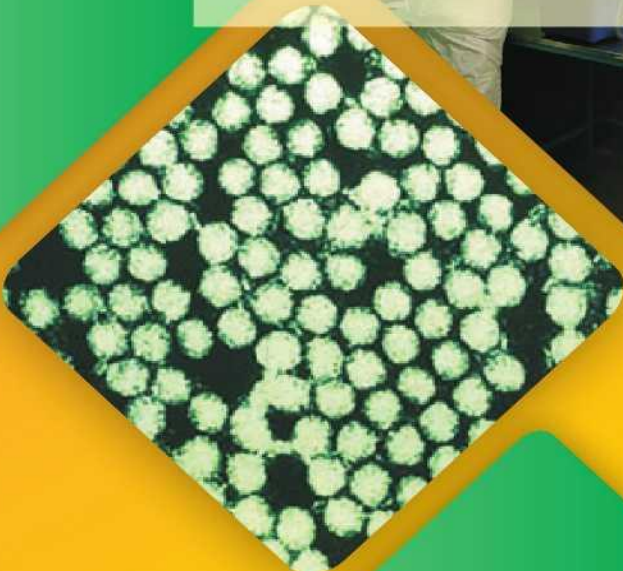


Prosedur Operasional Baku
Standard Operating Procedure

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 kehadiran 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	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. PrioCHECK FMDV NS KIT.....	5
2.1 Peralatan	5
2.2 Bahan Uji	5
2.3 Persiapan	6
2.4 Prosedur	7
2.5 Hasil	9
3. ID Screen® FMD NSP Competition.....	10
3.1 Informasi Umum	10
3.2 Deskripsi dan Prinsip	10
3.3 Komponen Kit	11
3.4 Persiapan	12
3.5 Prosedur Pengujian	12
3.6 Hasil	14
4. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH	15
5. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE.....	15
6. LAMPIRAN	15
7. DAFTAR PUSTAKA.....	15
LEMBAR KERJA	16

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, 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, Asia, South African Territories (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. Sampel positif tidak akan menunjukkan adanya perubahan warna (tetap bening) apabila direaksikan dengan substrat TMB dan stopper.

2. PrioCHECK FMDV NS KIT

2.1 PERALATAN

Beberapa peralatan yang digunakan adalah:

- a. Waterbath
- b. Elisa Reader (Multiskan TM FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific).
- c. Komputer
- d. ELISA Well Wash (Thermo ScientificTM),
- e. Shaker,
- f. Singlechannel pipet,
- g. Multichannel pipet,
- h. Mikropipet stand,
- i. Microtip 5000 µl, 1000 µl, 200 µl, dan 100 µl.
- j. Refrigerator, tabung effendorf

2.2 BAHAN UJI

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.

Contoh Uji

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

Bahan Acuan

Kontrol Serum positif (*Positive Control*)

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*.

Kontrol Serum positif Lemah (*Weak Positive Control*)

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

Kontrol serum Negatif (*Negative Control*)

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

Komponen
1. Test Plate
2. Conjugate [30x]
3. Dilution Buffer [5x]
4. Additive
5. Demineralized Water
6. Washing Fluid [200x]
7. Positive Control
8. Weak Positive
9. Negative Control
10. Chromogen (TMB)
11. Stop Solution
Additional kit contents

2.3 PERSIAPAN

Kualifikasi Penguji

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

Pembuatan Larutan

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

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

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.

2.4 PROSEDUR

Persiapan larutan (*Solution to be made in advance*)

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. Elisa buffer dapat disimpan pada suhu 5 ± 3 °C selama 24 jam.
2. Additive
Larutkan Additive (komponen 4) dengan 2,5 ml Demineralized Water (komponen 5). Additive yang sudah larut dapat disimpan pada suhu -20°C sampai tanggal ekspirasi berakhir.
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 $5\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

4. Conjugate dilution

Campurkan Conjugate (30x) (komponen 2) dan elisa buffer dengan perbandingan 1 :30. Misalnya untuk 2 strip perlu 2,1 ml conjugate dilution, maka campurkan 70 μl Conjugate (30x) dengan 2,03 ml elisa buffer.

5. Washing Solution

Tambahkan washing fluid (200x) (komponen 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. Penyimpanan selama 1 minggu pada suhu $22\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Inkubasi Serum Semalam (*Overnight Serum Incubation*)

1. Masukkan 80 μl elisa buffer ke semua sumuran tes plate (komponen 1)
2. Masukkan 20 μl kontrol negatif (komponen 9) ke sumuran A1 dan B1
3. Masukkan 20 μl kontrol positif lemah (komponen 8) ke sumuran C1 dan D1
4. Masukkan 20 μl kontrol positif (komponen 7) ke sumuran E1 dan F1
5. Masukkan 20 μl 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 $22\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$

Inkubasi Serum Sehari (*Single-day Serum Incubation*)

1. Masukkan 80 μl elisa buffer ke semua sumuran tes plate (komponen 1)
2. Masukkan 50 μl kontrol negatif (komponen 9) ke sumuran A1 dan B1
3. Masukkan 50 μl kontrol positif lemah (komponen 8) ke sumuran C1 dan D1
4. Masukkan 50 μl kontrol positif (komponen 7) ke sumuran E1 dan F1
5. Masukkan 50 μl 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 2 jam pada suhu $22\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$

Inkubasi dengan konjugate

1. Kosongkan tes plate setelah inkubasi serum, kemudian cuci dengan washing solution sebanyak 200-300 µl, diulang 6 kali.
2. Masukkan 100 µl conjugate dilution ke semua sumuran dari test plate.
3. Tutup tes plate dengan sealer
4. Inkubasi selama 60±5 menit pada suhu 22±3 °C

Inkubasi dengan Chromogen Substrat (TMB)

1. Kosongkan tes plate setelah inkubasi, kemudian cuci dengan washing solution sebanyak 200-300 µl, diulang 6 kali
2. Masukkan 100 µl Chromogen Substrat (TMB) (komponen 10) ke semua sumuran dari test plate (timer dinyalakan)
3. Inkubasi selama 20 menit pada suhu 22±3 °C
4. Tambahkan Stop Solution (komponen 11) ke semua well
5. Goyangkan test plate dengan lembut agar bercampur

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

2.5 HASIL

Perhitungan Hasil Test

- Perhitungan rata-rata OD₄₅₀ dari sumuran A1 dan B1 (kontrol Negatif) merupakan OD₄₅₀ Max
- Hasil pembacaan OD₄₅₀ 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:

- 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

Interpretasi PI (*Percent Inhibition*)

- 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

3. ID Screen® FMD NSP Competition – iD.vet KIT

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

3.1 INFORMASI UMUM

Kit diagnostik ini dirancang untuk mendeteksi antibodi spesifik terhadap protein nonstruktural virus Penyakit Mulut dan Kuku (NSP PMK) oleh ELISA kompetitif.

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

Sementara infeksi dan vaksinasi memperoleh antibodi terhadap antigen struktural, hanya hewan yang terinfeksi yang mengembangkan antibodi terhadap protein nonstruktural virus PMK (NSP). Oleh karena itu, ELISA NSP PMK dapat digunakan sebagai tes DIVA (Diferensiasi Hewan yang Terinfeksi dan Divaksinasi) ketika vaksin yang sangat murni digunakan.

Protein NSP yang sangat dilestarikan di antara 7 serotipe virus FCD (O, A, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2 dan SAT 3), tes ini dapat digunakan untuk mendeteksi semuanya.

3.2 DESKRIPSI DAN PRINSIP

- Microwell dilapisi dengan protein nonstruktural dari virus Penyakit Mulut dan Kuku (NSP PMK).
- Sampel yang akan diuji dan kontrol ditambahkan ke microwells. Antibodi anti-NSP, jika ada, membentuk kompleks antigen-antibodi yang menutupi epitop virus.
- Konjugat peroksidase lobak anti-NSP (HRP) ditambahkan ke wells. Ini memperbaiki epitop bebas yang tersisa, membentuk kompleks antigenkonjugat-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.

Catatan: Kit ini tidak mengandung bahan menular

3.3 KOMPONEN KIT

Reagen
Microplate coated with FMDV NSP
Concentrated conjugate (10X)
Positive Control
Negative Control
Dilution Buffer 18
Dilution Buffer 13
Wash Concentrate (20X)
Substrate Solution (TMB)
Stop Solution (0.5 M)

*Jumlah yang diberikan ditunjukkan pada label kit

1. Konjugat, kontrol dan larutan substrat harus disimpan pada suhu 5 ± 3 ° C
2. Reagen lain dapat disimpan antara 2–26 °C.
3. Untuk detail kondisi penyimpanan komponen yang terbuka dan/atau telah diencerkan, silakan lihat <https://www.idvet.com/fr/support/faq>.
4. *Wash* dan *Stop Solutions* dapat digunakan untuk seluruh rangkaian produk IDvet. *Substrate solutions* dan *dilution buffers* dengan nomor batch yang sama dapat dipertukarkan.

Bahan yang dibutuhkan tetapi tidak disediakan

1. Mono or multi-channel micropipettors capable of delivering volumes of 10 µL, 30 µL, 50µL, 100µL and 500 µL.
2. Disposable tips.
3. 96-well microplate reader
4. Distilled or deionized water.
5. Manual or automatic wash system.

Tindakan pencegahan

1. Jangan lakukan pemipetan melalui mulut.

2. *Substrate solution* dapat mengiritasi kulit.
3. Mengandung komponen yang dapat berbahaya bagi kulit dan mata serta dapat menimbulkan sensitisasi jika bersentuhan dengan kulit. Hindari kontak dengan kulit dan mata (*substrate and stop solution*). Gunakan jas lab pelindung, sarung tangan satu arah, dan kacamata pengaman. *Stop solution* (asam 0,5 M) bisa berbahaya jika tertelan.
4. Jangan biarkan *substrate solution* terkena cahaya terang atau zat pengoksidasi.
5. Semua limbah harus didekontaminasi dengan benar sebelum dibuang sesuai dengan peraturan yang berlaku

Catatan: silahkan merujuk ke *Material Safety Data Sheet*, tersedia berdasarkan permintaan di info@innovative-diagnostics.com, untuk informasi lebih rinci.

3.4 PERSIAPAN

Persiapan sampel

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

Persiapan larutan cuci

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

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

Kualitas langkah pencucian dapat mempengaruhi hasil. Pastikan *wells* benar-benar kosong di antara pencucian. Jika menggunakan *washer* otomatis, sangat penting untuk membuat parameter mesin dengan benar (mode, jenis aspirasi, tinggi aspirasi). Untuk informasi lebih lanjut, silakan baca "*IDvet Washing Guide*", tersedia berdasarkan permintaan.

3.5 PROSEDUR PENGUJIAN

Biarkan semua reagen mencapai suhu kamar (21 ± 5 °C) sebelum digunakan. Homogenisasi semua reagen dengan inversi atau vortex.

Serum and plasma: short incubation

1. Tambahkan:
 - 50 μ L *Dilution buffer* 18 untuk setiap *well*.
 - 30 μ L Kontrol Positif ke *well* A1 dan B1.
 - 30 μ L Kontrol Negatif ke *well* C1 dan D1.
 - 30 μ L dari setiap sampel yang akan diuji di *well* yang tersisa.
2. Tutup *plate* dan inkubasi selama 2 jam $\pm$ 10 menit pada suhu 37°C (± 3 °C).

3. Kosongkan *wells*. Cuci setiap *well* 5 kali dengan setidaknya 300 μ L *Wash Solution*. Hindari mengeringkan *wells* di antara pencucian.

Serum and plasma: overnight incubation

1. Tambahkan:
 - 90 μ L *Dilution Buffer* 18 untuk setiap *well*.
 - 10 μ L Kontrol Positif ke *well* A1 dan B1.
 - 10 μ L Kontrol Negatif ke *well* C1 dan D1.
 - 10 μ L dari setiap sampel yang akan diuji di *well* yang tersisa.
2. Tutup *plate* dan inkubasi selama 16-20 jam pada suhu 21°C ($\pm$ 5°C).
3. Kosongkan *wells*. Cuci setiap *well* 5 kali dengan setidaknya 300 μ L *Wash Solution*. Hindari mengeringkan *wells* di antara pencucian.

Untuk semua protokol:

4. Siapkan *Conjugate* 1X dengan mengencerkan *Concentrated Conjugate* 10X hingga 1:10 dalam *Dilution Buffer* 13.
5. Tambahkan 100 μ L *Conjugate* 1X ke masing-masing *well*.
6. Tutup *plate* dan inkubasi selama 30 menit $\pm$ 3 menit pada suhu 21°C ($\pm$ 5°C).
7. Kosongkan *wells*. Cuci setiap *well* 5 kali dengan setidaknya 300 μ L *Wash Solution*. Hindari mengeringkan *wells* di antara pencucian.
8. Tambahkan 100 μ L *Substrate Solution* ke setiap *well*.
9. Tutup *plate* dan inkubasi selama 15 menit $\pm$ 2 menit pada suhu 21°C ($\pm$ 5°C) dalam gelap.
10. Tambahkan 100 μ L *Stop Solution* ke setiap *well* dalam urutan yang sama seperti pada langkah No. 8, untuk menghentikan reaksi.
11. Baca dan rekam OD pada panjang gelombang 450 nm.

3.6 HASIL

Validasi

Pengujian divalidasi jika:

- ✓ Nilai rata-rata Negative Control O.D. (OD_{NC}) lebih besar dari 0,7

$$OD_{NC} > 0,7$$

- ✓ Nilai rata-rata Positive Control OD (OD_{PC}) kurang dari 30% dari OD_{NC}

$$OD_{PC} / OD_{NC} < 0,3$$

Interpretasi

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

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

Sampel yang menyajikan S/N%:

- ✓ Kurang dari atau sama dengan 50% dianggap positif.
- ✓ Lebih besar dari 50% dianggap negatif.

Hasil	Keadaan
S/N % ≤ 50%	POSITIF
S/N % > 50%	NEGATIF

Catatan: Program analisis data IDSoft™ tersedia secara gratis. Silakan hubungi, untuk informasi lebih lanjut, support.software@innovative-diagnostics.com.

Program perangkat lunak ini dapat menghitung banyak parameter (kriteria validasi, nilai S/P atau S/N, titer, umur vaksinasi, kelompok) dan menawarkan representasi grafis dari profil serologis hewan yang diuji

4. RETENSI DAN PEMUSNAHAN SAMPEL/BIOSAFETY & BIOSECURITY

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

5. 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.

6. 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.

7. DAFTAR PUSTAKA

Office International des Epizooties. OIE Terrestrial Manual Foot And Mouth Disease (Infection With Foot And Mouth Disease Virus. 2021.

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

Standar Sistem Manajemen Mutu dan Anti Penyuaian; 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

(.....)

(.....)