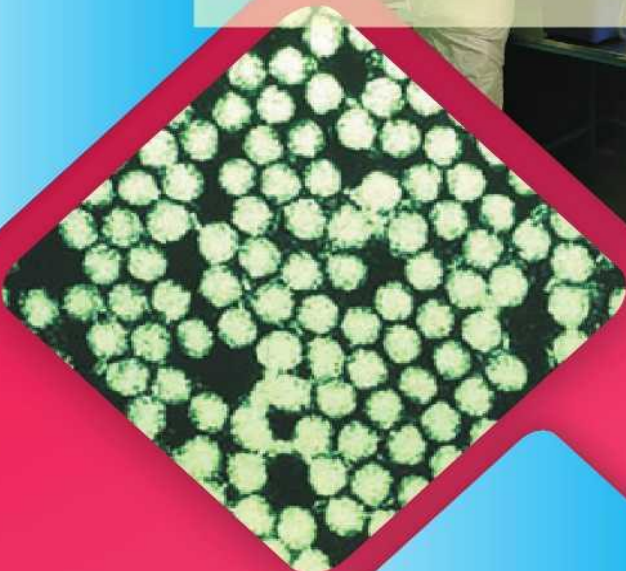


Prosedur Operasional Baku
Standard Operating Procedure

S O P



UJI ELISA
LIQUID PHASE BLOCKING (LPB)
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 LIQUID PHASE BLOCKING (LPB) 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 Liquid Phase Blocking 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 Liquid Phase Blocking 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 Liquid Phase Blocking 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,

Dr. 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
1.5. Daftar Pustaka	5
2. PERALATAN	5
3. BAHAN	6
3.1. Reagensia.....	6
3.2. Contoh Uji	6
3.3. Bahan Acuan	6
3.2.1. Antigen.....	6
3.2.2. Kontrol sera	6
4. PERSIAPAN	6
4.1. Kualifikasi Penguji	6
4.2. Pembuatan larutan... ..	7
4.3. Persiapan Contoh Uji	7
5. PROSEDUR	7
6. HASIL.....	8
7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH	9
8. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE.....	9
LEMBAR KERJA	10

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, Asia1, South African Teritorry (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.

2. PERALATAN

- a. Beberapa peralatan yang digunakan adalah:
- b. Komputer
- c. Ballpoint Marker
- d. Reader (Multickan TM FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific).
- e. ELISA Well Wash (Thermo ScientificTM),
- f. Glassware/Plasticware (glassbeaker 20-4000ml, flash 50-1000ml), fluid container,
- g. ELISA Plate, NUNC Immunoplate (atau dengan spesifikasi sama)
- h. Transfer plate; U bottom 96 well plate, (merek bebas)
- i. Timer,
- j. Handuk,
- k. Shaker,
- l. Singlechannel pipet,
- m. Multichannel pipet,
- n. Mikropipet stand,
- o. Microtip 5000 µl, 1000 µl, 200 µl, dan 100 µl.
- p. Microtube,
- q. Tabung ukur 100 ml - 1000 ml
- r. Refrigerator 1-8 °C
- s. Freezer, -30 - -5 °C
- t. Incubator Shaker
- u. Timbangan dengan akurasi 0,01 gr
- v. 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); Crhomogen (Ortho phenylenediamine (OPD) tablet; Recontstitution 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:

- a. Trapping antibody Stocks
- b. Detecting antibody stock
- c. Anti-Species Conjugate Stock
- d. Antigen Stocks
- e. Control serum Stocks
- f. Chromogen Buffer
- g. Chromogen Substrat
- h. Substrat Stock
- i. Coating buffer
- j. Diluent Buffer A
- k. Diluent Buffer B
- l. Wash buffer
- m. Stopping Solution
- n. Test Sera
- o. Desinfectan

4.3. Persiapan contoh uji

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

5. PROSEDUR

1. *Trapping antibody*, serum kontrol, *guinea pig*, *conjugate*, stok substrat, stok *chromogen*, *reconstitution diluent*#1 dan *reconstitution diluent*#2 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 sampel disimpan dalam *freezer* (suhu -30 s.d. -5°C) sedangkan kontrol antigen disimpan dalam *deep freezer* (suhu -90 s.d. -50°C)
2. ELISA *plate* di *coating* dengan 50 µl/lubang *trapping antibody* (*rabbit antiserum*) yang sudah diencerkan dengan *coating buffer*, dan diinkubasi semalam dalam 1-8°C.
3. Sampel, serum kontrol dan antigen dipersiapkan dengan *Diluent Buffer A*.
4. Serum sampel dan kontrol diencerkan 1:16, dan antigen diencerkan sesuai dengan titer antigen tersebut.
5. Serum sampel dan kontrol yang sudah diencerkan ditambahkan dengan antigen yang sudah diencerkan dalam *transfer plate*.

6. Diinkubasi di atas *shaker* dalam inkubator 37°C selama 1 jam, setelah itu diinkubasi semalam dalam 1-8°C.
7. ELISA *plate* dicuci 3 kali dengan *PBS*.
8. Campuran sampel dan antigen dipindahkan 50 μ l dari *transfer plate* ke ELISA *plate*.
9. Diinkubasi di atas *shaker* dalam inkubator 37°C selama 1 jam.
10. ELISA *plate* dicuci 3 kali dengan *PBS*.
11. Serum *guinea pig* yang diencerkan dengan *Diluent Buffer B* diisikan 50 μ l/lubang.
12. Diinkubasi di atas *shaker* dalam inkubator 37°C selama 1 jam.
13. ELISA *plate* dicuci 3 kali dengan *PBS*.
14. *Conjugate* yang sudah diencerkan dengan *Diluent Buffer B* diisikan 50 μ l/lubang.
15. Diinkubasi di atas *shaker* dalam inkubator 37°C selama 1 jam.
16. Substrat dipersiapkan, tetapi jangan diaktivasi.
17. ELISA *plate* dicuci 3 kali dengan *PBS*.
18. Substrat diaktivasi dengan ditambahkan H₂O₂ dan diisikan 50 μ l/lubang dan diinkubasi 15 menit dalam suhu ruang.
19. Reaksi substrat dihentikan dengan penambahan larutan *stopper* 50 μ l/lubang.
20. Nilai *OD* dan hasil ELISA dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 492 nm.

6. HASIL

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

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

Interpretasi hasil adalah :

PI > 50 : negatif

PI < 50 : positif

7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN SAMPEL/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. DAFTAR PUSTAKA

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

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

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

(.....)

(.....)