



**LABORATORIUM  
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN  
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.15  
Edisi/Revisi : 1/1  
Tanggal Terbit : 25 Juni 2020  
Tanggal Revisi : 26 April 2021  
Halaman Ke : 1 Dari 4  
Paraf Kabid :  
Wasdak

**INSTRUKSI KERJA METODA**

**UJI SEROLOGI ELISA TERHADAP  
BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) ANTIGEN**

**1. Tujuan** : Mendeteksi virus Bovine Viral Diarrhea

**2. Bahan**

- 1) Sampel serum yang akan diuji
- 2) Kit ELISA antigen IDEXX
- 3) Aquades
- 4) Tissue
- 5) Disinfektan dan alcohol 70%
- 6) Disposable tips

**3. Alat**

- 1) Mikrotube
- 2) Gelas ukur
- 3) Tabung Erlenmeyer/Gelas Beker/ Flask
- 4) Mikropipet single 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l
- 5) Mikropipet multi 100  $\mu$ l, 300  $\mu$ l
- 6) Mikroplate cover (adhesive film/ aluminium foil)
- 7) Reservoir
- 8) Plate shaker atau vortex
- 9) Inkubator 37°
- 10) Spectrofotometer (ELISA Reader)
- 11) Bak kecil dan wadah untuk peralatan kotor
- 12) Refrigerator



**LABORATORIUM  
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN  
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.15  
Edisi/Revisi : 1/0  
Tanggal Terbit : 25 Juni 2020  
Tanggal Revisi : -  
Halaman Ke : 2 Dari 4  
Paraf Kabid :  
Wasdak

**INSTRUKSI KERJA METODA**

**UJI SEROLOGI ELISA TERHADAP  
BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) ANTIGEN**

**4. Preparasi sampel, reagen dan alat**

**4.1. Persiapan sampel**

- Sampel diinkubasi pada suhu ruang dan dihomogenkan

**4.2. Preparasi Washing Solution**

- Hitung dengan teliti volume pencuci yang dibutuhkan untuk pencucian saat pengujian
- Encerkan pencuci dengan perbandingan 1:10 (1 ml pencuci dan 9 bagian aquadest). Wash Solution dapat disimpan selama seminggu pada suhu 2-8 °C

**5. Prosedur Kerja**

**5.1. Melakukan pengujian ELISA**

- 1) Siapkan reagen, sampel serta tulis posisi sampel pada gambaran plate uji Siapkan sumuran A1-B1 sebagai kontrol negatif dan sumuran C1-D1 sebagai kontrol positif
- 2) Sampel Serum, Plasma dan whole blood diencerkan dengan cara sebagai berikut:
  - a) Masukkan 50 µl “detection antibodies” ke semua sumur
  - b) Tambahkan 50 µl kontrol negative pada sumuran A1 dan B1
  - c) Tambahkan 50 µl kontrol positif pada sumuran C1 dan D2
  - d) Tambahkan 50 µl per sumur untuk setiap sampel serum, plasma dan whole blood yang akan di uji (hanya satu sumur per sampel/single test).

|   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | N | 5    |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B | N | dst. |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C | P |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D | P |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E | 1 |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F | 2 |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G | 3 |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H | 4 |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |   | 1    | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

P= Kontrol positif

N= Kontrol negatif

1,2,3 dst= sampel

|   |   |  |
|---|---|--|
|  | <b>LABORATORIUM<br/>BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN<br/>BELAWAN</b> | Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.15<br>Edisi/Revisi : 1/0<br>Tanggal Terbit : 25 Juni 2020<br>Tanggal Revisi : -<br>Halaman Ke : 3 Dari 4<br>Paraf Kabid :<br>Wasdak |
|   | <b>INSTRUKSI KERJA METODA</b>                                       |  |
| <b>UJI SEROLOGI ELISA TERHADAP<br/>BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) ANTIGEN</b> |   |  |

- 3) Plate ditutup lalu homogenkan dengan shaker
- 4) Inkubasi selama 120 menit ( $\pm 5$  menit) pada suhu  $37 (\pm 3) ^\circ\text{C}$  atau semalaman (12-18 jam) pada suhu  $2-8^\circ\text{C}$  (refrigerator)
- 5) Buang (kosongkan) semua larutan dalam mikroplate kemudian cuci tiap lubang plate dengan larutan pencuci  $300 \mu\text{l}$  sebanyak 5 (lima) kali dan kemudian setelah pencucian terakhir pukulkan mikroplate sampai terbuang sempurna (hingga tidak ada busa gelembung).
- 6) Masukkan  $100 \mu\text{l}$  Konjugate pada tiap sumuran.
- 7) Plate ditutup dan diinkubasikan selama 30 menit ( $\pm 2$  menit) pada suhu  $18-26^\circ\text{C}$
- 8) Buang (kosongkan) semua larutan dalam mikroplate kemudian cuci tiap lubang plate dengan larutan pencuci  $300 \mu\text{l}$  sebanyak 5 (lima) kali dan kemudian setelah pencucian terakhir pukulkan mikroplate sampai terbuang sempurna (hingga tidak ada busa/gelembung).
- 9) Masukkan  $100\mu\text{l}$  larutan TMB substrate N.12 pada tiap sumuran.
- 10) Plate ditutup dan diinkubasikan selama 10 ( $\pm 1$  menit) menit pada suhu  $18-26^\circ\text{C}$  (ruang gelap), lihat perubahan warna yang terjadi .
- 11) Hentikan reaksi enzimatik yang terjadi dengan menambahkan stop solution  $100 \mu\text{l}$  N.3 pada tiap sumuran
- 12) Baca hasilnya dengan panjang gelombang  $450 \text{ nm}$  atau  $450 \text{ nm}$  dan  $650 \text{ nm}$  (dua panjang gelombang)
- 13) Hitunglah hasilnya dengan menggunakan rumus.

### 5.2. Validasi pengujian

1. Nilai rata-rata OD kontrol negatif ( $\text{OD NC}_x$ ) =  $(\text{OD NC}_1 + \text{OD NC}_2) / 2$
2. Nilai rata-rata OD kontrol positif ( $\text{OD PC}_x$ ) =  $(\text{OD PC}_1 + \text{OD PC}_2) / 2$
3. Hasil pengujian valid jika:
  - Selisih antara rata-rata OD kontrol positif dan rata-rata OD kontrol negatif lebih besar atau sama dengan  $0.150$  ( $\text{OD PC}_x - \text{OD NC}_x \geq 0.150$ )
  - Rata-rata kontrol negatif lebih kecil sama dengan  $0.250$  ( $\text{NC}_x \leq 0.250$ )

|   |   |  |
|---|---|--|
|  | <b>LABORATORIUM<br/>BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN<br/>BELAWAN</b> | Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.15<br>Edisi/Revisi : 1/0<br>Tanggal Terbit : 25 Juni 2020<br>Tanggal Revisi : -<br>Halaman Ke : 4 Dari 4<br>Paraf Kabid :<br>Wasdak : |
| <b>INSTRUKSI KERJA METODA</b>   |   |  |
| <b>UJI SEROLOGI ELISA TERHADAP<br/>BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) ANTIGEN</b> |   |  |

### 5.3. Perhitungan Hasil

1. Perhitungan Nilai S-N per sampel
2.  $S-N = OD \text{ Sampel} - OD \text{ NCx}$
3. Interpretasi Hasil  
 Sampel Serum, Plasma atau susu individu (Murni)  
 $S - N > 0.300$  : Hasil uji dinyatakan positif  
 $S - N \leq 0.300$  : Hasil uji dinyatakan negatif

### 6. Pustaka

Elisa Bovine Viral Diarrhea Verification. IDEXX Laboratories

OIE Terrestrial Manual. 2018. Chapter 3.4.7. Bovine Viral Diarrhoea