



**LABORATORIUM
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.16
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 DETEKSI ANTIBODI TERHADAP
*Mycobacterium avium subs paratuberculosis***


1. Tujuan : Mendeteksi bakteri *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*

2. Bahan

- 1) Sampel serum yang akan diuji
- 2) Kit ELISA antibodi IDEXX
- 3) Aluminium foil
- 4) Uncoated microplate untuk preinkubasi
- 5) Aquades
- 6) Tissue
- 7) Disinfektan dan alcohol 70%
- 8) Disposable tips

3. Alat

- 1) Mikrotube
- 2) Gelas ukur
- 3) Tabung Erlenmeyer/Gelas Beker/ Flask
- 4) Mikropipet single 100 μ l, 200 μ l
- 5) Mikropipet multi 100 μ l, 300 μ l
- 6) Mikroplate cover (adhesive film/ aluminium foil)
- 7) Reservoir
- 8) Plate shaker atau vortex
- 9) Spectrofotometer (ELISA Reader)
- 10) Bak kecil dan wadah untuk peralatan kotor
- 11) Refrigerator

	LABORATORIUM BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN BELAWAN	Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.16 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 DETEKSI ANTIBODI TERHADAP <i>Mycobacterium avium subs paratuberculosis</i>		

4. Preparasi sampel, reagen dan alat

4.1. Persiapan sampel

Encerkan dan Pre-inkubasi sampel dan kontrol pada Uncoated Microplate :

- a. Encerkan Kontrol Negatif 1:20 dengan Dilution Buffer N.12 dan masukan ke dalam 1 sumur
- b. Encerkan Kontrol Positif 1:20 dengan Dilution Buffer N.12 dan masukan ke dalam 2 sumur
- c. Encerkan Sampel Serum/Plasma 1:20 dengan Dilution Buffer N.12 dan masukan ke dalam 1 sumur
- d. Encerkan Sampel susu sapi 1:2 dengan Dilution Buffer N.12 dan masukan ke dalam 1 sumur

4.2. Preparasi reagen

- a. **Wash solution** : Wash Concentrate (20X) diencerkan dengan aquades steril dengan perbandingan 1:20. Wash Solution stabil selama 3 hari jika disimpan suhu 2-8 °C
- b. **Conjugate** : Conjugate diencerkan dengan Dilution Buffer 1:100 untuk waktu pendek inkubasi. Atau diencerkan dengan perbandingan 1:200 untuk waktu inkubasi panjang. Conjugate Solution stabil selama 8 jam pada suhu 18-26 °C.

5. Prosedur Kerja

5.1. Melakukan pengujian ELISA

- 1) Homogenkan Pre-inkubasi sampel dan kontrol dengan shaker
- 2) Inkubasi 15 menit – 2 jam pada suhu ruang (18-26 °C)
- 3) Masukkan 100 µl kontrol negatif yang telah di encerkan ke A1, 100 µl kontrol positif ke B1 dan C1, serta 100 µl ke D1 dan seterusnya setiap sampel yang telah diencerkan (serum, plasma dan susu)



**LABORATORIUM
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.16
Edisi/Revisi : 1/0
Tanggal Terbit : 25 Juni 2020
Tanggal Revisi : -
Halaman Ke : 3 Dari 4
Paraf Kabid :
Wasdak

INSTRUKSI KERJA METODA

**UJI SEROLOGI ELISA DETEKSI ANTIBODI TERHADAP
*Mycobacterium avium subs paratuberculosis***

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

P= control positif
N= Kontrol neg
1,2,3 dst= sampel

- 4) Homogenkan dengan shaker
- 5) Tutup plate dan inkubasi selama 45 menit pada suhu ruang (18-26 °C) atau overnight (16-12 Jam) pada suhu (2-8°C)
- 6) Kosongkan sumur, cuci masing-masing *well* sebanyak 3x dengan 300 µl wash solution. Hindari mengeringkan *well* diantara pencucian (untuk sampel susu wash solution didiamkan dulu selama 2 menit)
- 7) Tambahkan 100 µl Conjugate Solution kedalam masing-masing sumur
- 8) Tutup microplate dan Inkubasi 30 menit ±3 menit pada suhu ruang (18-26 °C)
- 9) Kosongkan sumur, cuci masing-masing sumur sebanyak 3x dengan 300 µl wash solution (untuk sampel susu wash solution didiamkan dulu selama 2 menit)
- 10) Tambahkan 100 µl substrat kedalam masing-masing sumur
- 11) Inkubasi 10 menit ± 3 menit pada suhu ruang (18-26 °C) di ruang gelap
- 12) Tambahkan 100 µl stop solution N.3 kedalam masing-masing sumur untuk menghentikan reaksi
- 13) Baca hasilnya dengan panjang gelombang 450 nm



**LABORATORIUM
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.16
Edisi/Revisi : 1/0
Tanggal Terbit : 25 Juni 2020
Tanggal Revisi : -
Halaman Ke : 4 Dari 4
Paraf Kabid :
Wasdak

INSTRUKSI KERJA METODA

**UJI SEROLOGI ELISA DETEKSI ANTIBODI TERHADAP
*Mycobacterium avium subs paratuberculosis***

5.2. Validasi

Pengujian dikatakan valid jika:

- a. Rata-rata OD kontrol positif lebih dari atau sama dengan 0,350 ($OD_{PCx} \geq 0,350$)
- b. Perbandingan rata-rata kontrol positif dan kontrol negatif (OD_{PCx} dan OD_{NC}) lebih dari atau sama dengan 3 ($OD_{PCx}/OD_{NC} \geq 3,00$)

5.3. Analisis Hasil Uji

$$S/P\% = \frac{OD_{sampel} - OD_{NC}}{(OD_{PCx} - OD_{NC})} \times 100$$

Sampel serum

Titer	Interpretasi
$S/P\% \leq 45\%$	Negatif
$45\% < S/P\% < 55\%$	Dubius/Meragukan (perlu konfirmasi)
$S/P\% \geq 55\%$	Positif

Sampel susu :

- a. S/P lebih rendah atau sama dengan 30% hewan tidak terinfeksi MAP
- b. S/P antara 30% sampai 40% meragukan, perlu konfirmasi
- c. S/P lebih tinggi atau sama dengan 40% hewan terinfeksi MAP

6. Pustaka

- Ditjennakkeswan. 2014. Manual Penyakit Hewan Mamalia: Paratuberculosis. Kementerian Pertanian Indonesia.
- Elisa Paratuberculosis Verification. IDEXX Laboratories.
- OIE Terrestrial Manual. 2018. Chapter 3.1.15. Paratuberculosis (Johne's disease)