



**LABORATORIUM
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.21
Edisi/Revisi : 1/0
Tanggal Terbit : 29 April 2022
Tanggal Revisi : -
Halaman Ke : 1 Dari 4
Paraf Kabid :
Wasdak

INSTRUKSI KERJA METODA

**UJI SEROLOGI ELISA TERHADAP
BOVINE LEUCOSIS VIRUS (BLV) ANTIBODI**

1. Tujuan : Mendeteksi antibodi terhadap *Bovine Leucosis Virus* (BLV)

2. Bahan

- 1) Sampel serum yang akan diuji
- 2) Kit ELISA *Bovine Leucosis Virus* (BLV) antibodi merk IDEXX
- 3) Aquabides
- 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 10 μ l, 100 μ l
- 5) Mikropipet multichanel 100 μ l, 300 μ l
- 6) Mikroplate cover (adhesive film/ aluminium foil)
- 7) Reservoar
- 8) Plate shaker
- 9) Vortex
- 10) Inkubator
- 11) Spectrofotometer (ELISA Reader)
- 12) Bak kecil dan wadah untuk penampung cairan pencucian \
- 13) Water Bath
- 14) Refrigerator



**LABORATORIUM
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.21
Edisi/Revisi : 1/0
Tanggal Terbit : 29 April 2022
Tanggal Revisi : -
Halaman Ke : 2 Dari 4
Paraf Kabid :
Wasdak

INSTRUKSI KERJA METODA

**UJI SEROLOGI ELISA TERHADAP
BOVINE LEUCOSIS VIRUS (BLV) ANTIBODI**

4. Preparasi sampel, reagen dan alat

4.1. Persiapan sampel

- Sampel dan Kit ELISA dikeluarkan dari refrigerator dan diletakkan pada suhu ruang (25 ± 2 °C)
- Sampel dilakukan inaktivasi dengan pemanasan dengan water bath pada suhu 56°C selama 30 menit. Inaktivasi dilakukan cukup 1 kali. Apabila dilakukan pengujian ulang dengan sampel yang sama maka aktivasi tidak perlu dilakukan lagi.

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 diencerkan dengan cara sebagai berikut:
 - a) Masukkan 90 μ l “Sampel Diluent” ke semua sumur
 - b) Tambahkan 10 μ l kontrol positif pada sumuran A1 dan B1
 - c) Tambahkan 10 μ l kontrol negatif pada sumuran C1 dan D2
 - d) Tambahkan 10 μ l per sumur untuk setiap sampel serum/plasma yang akan di uji (hanya satu sumur per sampel/single test).

A	P	5										
B	P	dst.										
C	N											
D	N											
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



**LABORATORIUM
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.21
Edisi/Revisi : 1/0
Tanggal Terbit : 29 April 2022
Tanggal Revisi : -
Halaman Ke : 3 Dari 4
Paraf Kabid :
Wasdak

INSTRUKSI KERJA METODA

**UJI SEROLOGI ELISA TERHADAP
BOVINE LEUCOSIS VIRUS (BLV) ANTIBODI**

- 3) Plate ditutup lalu homogenkan dengan shaker secara lembut.
- 4) Inkubasi selama 60 menit (± 5 menit) pada suhu $37 (\pm 3) ^\circ\text{C}$ atau semalaman (14-18 jam) pada suhu $18-26^\circ\text{C}$ (suhu ruangan)
- 5) Buang (kosongkan) semua larutan dalam mikroplate kemudian cuci tiap lubang plate dengan larutan pencuci $300 \mu\text{l}$ sebanyak 3 (tiga) kali dan kemudian setelah pencucian terakhir pukulkan mikroplate sampai terbuang sempurna (hingga tidak ada busa gelembung).
- 6) Masukkan $100 \mu\text{l}$ Conjugate pada tiap sumuran.
- 7) Plate ditutup dan diinkubasikan selama 60 menit (± 2 menit) pada suhu $37 (\pm 3) ^\circ\text{C}$.
- 8) Buang (kosongkan) semua larutan dalam mikroplate kemudian cuci tiap lubang plate dengan larutan pencuci $300 \mu\text{l}$ sebanyak 3 (tiga) 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 15 (± 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 nm .
- 13) Hitunglah hasilnya dengan menggunakan rumus.

5.2. Validasi pengujian

1. Nilai rata-rata OD kontrol negatif (OD NC_x) = $(\text{OD NC}_1 + \text{OD NC}_2) / 2$
2. Nilai rata-rata OD kontrol positif (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 0.300 ($\text{OD PC}_x - \text{OD NC}_x \geq 0.300$)
 - Rata-rata kontrol negatif lebih kecil sama dengan 0.500 ($\text{NC}_x \leq 0.500$)
 - Rata-rata kontrol positif lebih kecil sama dengan 2.000 ($\text{PC}_x \leq 2.000$)



**LABORATORIUM
BALAI BESAR KARANTINA PERTANIAN
BELAWAN**

Nomor IKM : IKM.BBKP.BLW.21
Edisi/Revisi : 1/0
Tanggal Terbit : 29 April 2022
Tanggal Revisi : -
Halaman Ke : 4 Dari 4
Paraf Kabid :
Wasdak

INSTRUKSI KERJA METODA

**UJI SEROLOGI ELISA TERHADAP
BOVINE LEUCOSIS VIRUS (BLV) ANTIBODI**

5.3. Perhitungan Hasil

1. Perhitungan Nilai S/P% per sampel

$$OD \text{ sampel} - OD \text{ NC}$$

2. $S/P\% = \frac{(OD \text{ PCx} - OD \text{ NC})}{(OD \text{ sampel} - OD \text{ NC})} \times 100$

3. Interpretasi Hasil

Sampel Serum/Plasma per individu

Titer	Interpretasi
S/P% < 30%	Negatif
$30\% \leq S/P\% < 40\%$	Suspect/Meragukan (perlu diuji ulang)
S/P% $\geq 40\%$	Positif

Sampel Serum/Plasma pool 10 sampel

Titer	Interpretasi
S/P% < 20%	Negatif
S/P% $\geq 20\%$	Positif

6. Pustaka

OIE. 2018. Enzootic Bovine Leukosis Chapter 2.4.10. www.oie.int

IDEXX. 2019. Bovine Leucosis Virus (BLV) Antibody Test Kit. 06-40609-05