



REPUBLIK INDONESIA  
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

## SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : Dr. PURWATI, SpPD, FiNASIM.  
Rungkut Harapan E10,  
Surabaya, Jawa Timur,  
INDONESIA

Untuk Invensi dengan Judul : METODE PEMBUATAN PROTOTIPE SEL LIMFOSIT TCD4+  
YANG RESISTEN TERHADAP INFEKSI HIV

Inventor : Dr. Purwati, SpPD, FiNASM

Tanggal Penerimaan : 13 Februari 2015

Nomor Paten : IDP000063070

Tanggal Pemberian : 02 Oktober 2019

Perlindungan Paten untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.  
NIP. 196611181994031001

**KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA RI**  
**DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL**  
**DIREKTORAT PATEN, DESAIN TATA LETAK SIRKUIT TERPADU DAN RAHASIA DAGANG**  
 Jln. H.R. Rasuna Said, Kav. 8-9 Kuningan Jakarta Selatan 12940  
 Phone/Facs. (6221) 57905611; Website: www.dgip.go.id

**INFORMASI BIAYA TAHUNAN**

Nomor Paten : IDP000063070 Tanggal diberi : 02/10/2019 Jumlah Klaim : 6  
 Nomor Permohonan : P00201500864 IPAS Filing Date : 13/02/2015  
 Entitlement Date : 13/02/2015

Berdasarkan Peraturan Pemerintah Nomor 28 tahun 2019 tentang Jenis dan Tarif Atas Jenis Penerimaan negara Bukan Pajak Yang Berlaku Pada Kementerian Hukum dan Hak Asasi Manusia, biaya tahunan yang harus dibayarkan adalah sebagaimana dalam tabel di bawah.

| Biaya Tahunan Ke- | Periode Perlindungan  | Batas Akhir Pembayaran | Biaya Dasar | Jml Klaim | Biaya Klaim | Total     | Terlambat (Bulan) | Total Denda | Jumlah Pembayaran |
|-------------------|-----------------------|------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------------|-------------|-------------------|
| 1                 | 13/02/2015-12/02/2016 | 01/04/2020             | 1.000.000   | 6         | 450.000     | 1.450.000 | 0                 | 0           | 1.450.000         |
| 2                 | 13/02/2016-12/02/2017 | 01/04/2020             | 1.000.000   | 6         | 450.000     | 1.450.000 | 0                 | 0           | 1.450.000         |
| 3                 | 13/02/2017-12/02/2018 | 01/04/2020             | 1.000.000   | 6         | 450.000     | 1.450.000 | 0                 | 0           | 1.450.000         |
| 4                 | 13/02/2018-12/02/2019 | 01/04/2020             | 1.250.000   | 6         | 600.000     | 1.850.000 | 0                 | 0           | 1.850.000         |
| 5                 | 13/02/2019-12/02/2020 | 01/04/2020             | 1.250.000   | 6         | 600.000     | 1.850.000 | 0                 | 0           | 1.850.000         |
| 6                 | 13/02/2020-12/02/2021 | 01/04/2020             | 1.750.000   | 6         | 1.050.000   | 2.800.000 | 0                 | 0           | 2.800.000         |
| 7                 | 13/02/2021-12/02/2022 | 14/01/2021             | 2.250.000   | 6         | 1.350.000   | 3.600.000 | 0                 | 0           | 3.600.000         |
| 8                 | 13/02/2022-12/02/2023 | 14/01/2022             | 2.250.000   | 6         | 1.350.000   | 3.600.000 | 0                 | 0           | 3.600.000         |
| 9                 | 13/02/2023-12/02/2024 | 14/01/2023             | 3.000.000   | 6         | 1.800.000   | 4.800.000 | 0                 | 0           | 4.800.000         |
| 10                | 13/02/2024-12/02/2025 | 14/01/2024             | 4.000.000   | 6         | 1.800.000   | 5.800.000 | 0                 | 0           | 5.800.000         |
| 11                | 13/02/2025-12/02/2026 | 14/01/2025             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 12                | 13/02/2026-12/02/2027 | 14/01/2026             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 13                | 13/02/2027-12/02/2028 | 14/01/2027             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 14                | 13/02/2028-12/02/2029 | 14/01/2028             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 15                | 13/02/2029-12/02/2030 | 14/01/2029             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 16                | 13/02/2030-12/02/2031 | 14/01/2030             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 17                | 13/02/2031-12/02/2032 | 14/01/2031             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 18                | 13/02/2032-12/02/2033 | 14/01/2032             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 19                | 13/02/2033-12/02/2034 | 14/01/2033             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |
| 20                | 13/02/2034-12/02/2035 | 14/01/2034             | 6.500.000   | 6         | 3.000.000   | 9.500.000 | 0                 | 0           | 9.500.000         |

Biaya yang harus dibayarkan untuk pertama kali hingga tanggal 01/11/2019 (tahun ke-1 s.d 6) adalah sebesar 10.850.000 .

- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali wajib dilakukan paling lambat 6 (enam) bulan terhitung sejak tanggal diberi paten
- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali meliputi biaya tahunan untuk tahun pertama sejak tanggal penerimaan sampai dengan tahun diberi Paten ditambah biaya tahunan satu tahun berikutnya.
- Pembayaran biaya tahunan selanjutnya dilakukan paling lambat 1 (satu) bulan sebelum tanggal yang sama dengan Tanggal Penerimaan pada periode perlindungan tahun berikutnya.
- Permohonan penundaan pembayaran biaya tahunan akan diterima apabila diajukan paling lama 7 hari kerja sebelum tanggal jatuh tempo pembayaran biaya tahunan berikutnya, dan bukan merupakan pembayaran biaya tahunan pertama kali.
- Dalam hal biaya tahunan belum dibayarkan sampai dengan jangka waktu yang ditentukan, Paten dinyatakan dihapus



KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
REPUBLIK INDONESIA  
DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL  
Jl. H.R. Rasuna Said Kav 8-9, Kuningan, Jakarta Selatan, 12940  
Telepon: (021) 57905611 Faksimili: (021) 57905611  
Laman: <http://www.dgip.go.id> Surel: [dopatent@dgip.go.id](mailto:dopatent@dgip.go.id)

Nomor : HKI-3-HI.05.02.04.P00201500864-DP **63070**  
Lampiran : 1 (satu halaman)  
Hal : Pemberitahuan dapat diberi Paten

02 OCT 2019

Yth. GEORGE WIDJOJO, SH  
Jl. Kali Besar Barat No.5, Jakarta Kota. 11230

Dengan ini diberitahukan, bahwa sesuai dengan hasil pemeriksaan substantif terlampir, permohonan paten berikut ini dinyatakan dapat diberi Paten:

Nomor Permohonan : P00201500864  
Tanggal Penerimaan : 13 Februari 2015  
Pemohon : Dr. PURWATI, SpPD, FINASIM.  
Judul invensi : PROTOTIPE LIMFOSIT TCD4+ YANG RESISTEN TERHADAP INFEKSI HIV



00-2019-312835



Direktur Paten, Desain Tata Letak  
Sirkuit Terpadu dan Rahasia Dagang,

Dr. Dede Mia Yusanti, MLS.  
NIP. 196407051992032001

Tembusan:

1. Yth. Direktur Jenderal Kekayaan Intelektual (sebagai Laporan)
2. Dra. Johani Siregar  
NIP. 196805261995032001

(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000063070 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL  
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 02 Oktober 2019

51) Klasifikasi IPC<sup>8</sup> : C 12N 2501/505

1) No. Permohonan Paten : P00201500864

2) Tanggal Penerimaan: 13 Februari 2015

Data Prioritas :

(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

Tanggal Pengumuman: 10 Maret 2017

Dokumen Perbandingan:

Purwati et al., Characterization Of CD4 + T Lymphocyte From Bone  
Marrow Stem Cell Using Indirect Immunofluorescence For HIV &  
ART Treatment. Indonesian Journal of Tropical and Infectious  
Disease, Vol. 1, No. 3 Sept-Des 2010

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :  
Dr. PURWATI, SpPD, FINASIM.  
Rungkut Harapan E10,  
Surabaya, Jawa Timur,  
INDONESIA

(72) Nama Inventor :  
Dr. Purwati, SpPD, FINASM, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :  
George Widjojo, S.H.  
086/2006  
George Widjojo & Partners  
Jl. Kali Besar Barat No. 5,  
Jakarta Kota 11230  
INDONESIA

Pemeriksa Paten : Dra. Johani Siregar

Jumlah Klaim : 6

Invensi : METODE PEMBUATAN PROTOTIPE SEL LIMFOSIT TCD4+ YANG RESISTEN TERHADAP INFEKSI HIV

Invensi ini menghasilkan prototipe *stem cell* yang berisi gen yang telah resisten terhadap infeksi HIV melalui transfeksi mutan 32 pengkode CCR5 pada *stem cell* hematopoetik derivat dari darah tepi. Tahapan yang dilakukan untuk mencapai invensi ini adalah sebagai berikut: 1) isolasi, purifikasi dan kultur sel limfosit TCD4+ dari sel darah tepi (PBMC), 2) pemotongan gen pengkode CCR5 pada TCD4+ pada posisi 554-576 bp sehingga terbentuk CCR5 yang mutan menggunakan enzim restriksi EcoRI, 3) pemotongan plasmid dengan menggunakan *pGMT easy vector* dan dilakukan sub-klon dengan menggunakan *pTarget mamalian vector*, 4) transfeksi gen pengkode CCR5 ke dalam *stem cell* hematopoetik dari darah tepi pada pasase 2 saat usia sel mencapai 8 hari, 5) uji sel limfosit TCD4+ yang telah mutan terhadap infeksi HIV berdasarkan *focus forming unit* (FFU).





## Deskripsi

### **METODE PEMBUATAN PROTOTIPE SEL LIMFOSIT TCD4+ YANG RESISTEN TERHADAP INFEKSI HIV**

5

#### **Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berkenaan dengan suatu metode pembuatan prototipe sel Limfosit TCD4+ yang resisten terhadap infeksi HIV. Selanjutnya invensi ini berkenaan dengan prototipe stem cell yang berisi gen yang telah resisten terhadap infeksi HIV melalui transfeksi mutan 32 bp gen pengkode CCR5 pada stem cell hematopoetik derivat dari darah tepi atau *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC).

15

#### **Latar Belakang Invensi**

Epidemi AIDS telah meluas ke seluruh wilayah Indonesia, dimana berdasarkan laporan unit layanan kesehatan didapatkan peningkatan kasus. Pada akhir tahun, 2000 dilaporkan hanya 16 provinsi dengan kasus AIDS, akhir 2003 meningkat menjadi 25 provinsi, kemudian tahun 2006 ditemukan 32 provinsi yang melaporkan kasus AIDS. Sementara itu, keadaan infeksi HIV di dunia berdasarkan laporan UNAID akhir tahun 2000 telah ditemukan 150 negara dengan infeksi HIV/AIDS (Depkes, 2009).

HIV merupakan virus ss-RNA, dimana struktur yang paling luar adalah *envelop* yang terdiri dari glikoprotein gp120 yang melekat pada glikoprotein gp4. Infeksi HIV pada sel target dapat terjadi karena adanya interaksi antara gp120 virus dengan reseptor CD4+ yang terdapat pada permukaan sel target. Interaksi gp120 dengan CD4+ menyebabkan terjadinya ikatan dengan reseptor kemokina yang bertindak sebagai ko-reseptor spesifik CXCR4 atau X4 dan CCR5 atau R5 yang juga terdapat



pada membran sel target. Mutasi gen pengkode CCR5 dapat merupakan protektor atau resistensi terhadap infeksi HIV.

5 Bertolak dari hal tersebut, maka invensi ini membuat prototipe *stem cell* yang berisi gen yang telah resisten terhadap infeksi HIV. Kemudian *stem cell* yang telah berisi gen yang telah resisten tersebut dicek resistensinya dengan mengko-kultivasi sel tersebut dengan HIV.

10 Masalah yang ditimbulkan oleh HIV/AIDS sangat kompleks, dimulai masuknya HIV ke dalam sel target melalui CCR5 yang berada pada membran sel target sehingga hal ini mengakibatkan sel target pada tubuh *host* terinfeksi. Dengan demikian, maka jumlah penderita HIV/AIDS juga meningkat. Perjalanan penyakit ke stadium yang lebih berat mengakibatkan penderita usia produktif kehilangan daya produktivitasnya. Terapi HIV/AIDS yang menggunakan obat ARV banyak kendala yang harus dihadapi baik dari segi *host*, lingkungan maupun agennya sendiri.

20 Pengembangan penelitian untuk terapi HIV/AIDS, dimana pada tahun 1987 ditemukan obat ARV yang pertama yaitu Zidovudin yang selanjutnya dilakukan riset untuk terapi dengan kombinasi berbagai macam ARV. Dalam perjalanannya, ternyata ditemukan adanya resistensi terhadap ARV, keterbatasan jangkauan penderita dalam penggunaan obat tersebut serta efek sampingnya, sehingga kasus HIV/AIDS bertambah banyak. Riset tentang vaksin juga dilakukan. Tahun 1998 dilakukan uji coba vaksin di Amerika tetapi gagal, demikian pula di Thailand dan beberapa negara lain juga terdapat kegagalan. Hal tersebut diduga terkait dengan mutasi yang cepat dari HIV itu sendiri. Tahun 2009 di Jerman, dilakukan transplantasi sumsum tulang pada kasus HIV/AIDS yang menderita *chronic myeloid leukemia* (CML), dimana donor yang diambil ternyata mempunyai mutasi pada gen pengkode CCR5

30



yaitu delesi 32 bp, setelah dilakukan transplantasi maka pasien tersebut sembuh.

Pendekatan dengan terapi gen yang didasarkan dari analisis tersebut diatas dimasa depan dapat merupakan salah satu alternatif yang menjanjikan untuk mengatasi merebaknya infeksi HIV secara global. Invensi ini dilakukan dalam upaya untuk mencegah masuknya virus HIV ke dalam tubuh manusia dengan pendekatan terapi gen (genomik, molekuler dan *stem cell*) yaitu membuat sel target dalam hal ini limfosit TCD4+ menjadi resisten terhadap infeksi HIV.

Dalam studi sebelumnya, telah dilakukan karakterisasi sel limfosit TCD4+ dari *stem cell* derivat darah tepi dengan menggunakan *immunofluorescence* dimana didapatkan sel limfosit T yang telah terdiferensiasi secara signifikan yang kemudian dapat digunakan sebagai dasar terapi imunodefisiensi seperti HIV/AIDS (Purwati et al., 2010). Invensi ini merupakan tahap lanjutan, dimana dilakukan pembuatan prototipe sel limfosit TCD4+ yang resisten terhadap HIV dengan melakukan isolasi dan kultur sel limfosit TCD4+ dari darah tepi, pemotongan gen pengkode CCR5 yang mutan hingga uji resistensi secara *in vitro* dengan cara mengko-kultivasikannya dengan darah tepi pasien HIV/AIDS.

25

#### **Uraian Singkat Invensi**

Invensi ini berkaitan dengan pembuatan *stem cell* yang berisi gen yang telah resisten terhadap infeksi HIV. Tahapan yang dilakukan untuk mencapai invensi ini adalah sebagai berikut: 1) isolasi, purifikasi dan kultur sel limfosit TCD4+ dari sel darah tepi (PBMC), 2) pemotongan gen pengkode CCR5 pada limfosit TCD4+ pada posisi 554-576 bp sehingga terbentuk CCR5 yang mutan menggunakan enzim restriksi EcoRI, 3)



perotongan dilakukan kloning dengan menggunakan *pGMT easy vector* dan dilakukan sub-klon dengan menggunakan *pTarget mamalian vector*, 4) dilakukan transfeksi gen pengkode CCR5 ke dalam *stem cell* hematopoetik dari darah tepi pada pasase 2 ketika usia sel mencapai 8 hari, 5) uji resistensi secara in vitro pada sel limfosit TCD4+ yang telah mutan terhadap infeksi HIV berdasarkan *focus forming unit* (FFU).

#### Uraian Singkat Gambar

10

**Gambar 1** mengungkapkan Analisis resistensi berdasarkan FFU pada *full gene* CCR5 yang diko-kultivasi dengan darah tepi (PBMC) pasien HIV, (a) FFU pada hasil transfeksi *full gene* CCR5 kloning, (b) FFU pada hasil transfeksi *full gene* CCR5 sub-klon

15

**Gambar 2** mengungkapkan Analisis resistensi berdasarkan FFU pada CCR5 mutan (delesi 32) yang diko-kultivasi dengan darah tepi (PBMC) pasien HIV, (a) FFU pada hasil transfeksi CCR5 mutan 32 kloning, (b) FFU pada hasil transfeksi CCR5 mutan 32 sub-klon

20

#### Uraian Lengkap Invensi

Uji resistensi secara in vitro terhadap sel limfosit TCD4+ dilakukan dengan teknik *focus forming unit* (FFU). Uji dilakukan dengan membandingkan hasil transfeksi CCR5 gen yang masih utuh (*full gene*) dan CCR5 yang telah mutan (delesi 32) yang diko-kultivasi dengan darah tepi pasien HIV setelah 72 jam. Pada gambar (terlampir), didapatkan bahwa CCR5 yang *full gene* terbentuk FFU yang artinya banyak sel terinfeksi, baik pada DNA hasil kloning maupun sub-klon, sedangkan pada CCR5 mutan 32 pada hasil ko-kultivasi tidak didapatkan FFU, yang artinya tidak ada sel terinfeksi, baik itu hasil kloning

30



maupun sub-klon. Sehingga dapat disimpulkan bahwa deleksi 32 bp basa nukleotida gen pengkode CCR5 pada posisi 554-576 bp, yang telah dilakukan kloning dan sub-klon kemudian ditransfeksikan ke dalam *stem cell* hematopoetik dari darah tepi akan membentuk sel limfosit TCD4+ yang sudah membawa sifat gen yang baru yaitu CCR5 mutan 32 bp sehingga virus HIV tidak dapat masuk ke dalam sel target.

Invensi ini menghasilkan inovasi baru yaitu rekayasa genetik dan inovasi teknologi dengan pendekatan genomik, molekuler dan *stem cell* dalam pembuatan prototipe limfosit TCD4+ yang resisten terhadap infeksi HIV. Invensi ini berhubungan dengan penggunaan prototipe sel yang didesain sedemikian rupa sehingga sel tersebut bisa resisten terhadap infeksi HIV. Dimana pada ras kulit putih yaitu Amerika dan Eropa, pada mutasi gen tertentu, maka dia menjadi resisten terhadap infeksi HIV, tetapi hal ini hanya didapatkan pada sebagian kecil saja, dan tidak pada ras Asia.

Tahapan yang dilakukan untuk mencapai invensi ini secara garis besar terdiri dari:

1. Isolasi, purifikasi dan kultur sel limfosit TCD4+

Limfosit TCD4+ diisolasi dari darah tepi atau *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC). PBMC diisolasi dengan menggunakan larutan *ficoll* gradien 1,007 sebanyak 10 ml. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menggunakan salin buffer fosfat (PBS = *phosphate buffer saline*). Dari 10 ml darah tepi, didapatkan lapisan mononuklear (*buffy coat*) sebanyak 2,5 mm<sup>3</sup> yang secara keseluruhan jumlah sel yang terkandung di dalamnya adalah  $2 \times 10^7$  sel *mononucleated*.



Selanjutnya dilakukan purifikasi limfosit TCD4+ dengan menggunakan *magnetic beads* yang mengandung anti CD4+ untuk mendapatkan sel limfosit TCD4+ yang murni. Setelah dilakukan purifikasi, sel dikultur pada medium penumbuh sel tanpa serum menggunakan medium *Roswell Park Memorial Institute (RPMI)*, sehingga sel melekat pada dasar cawan petri. Setelah proses kultur, sel akan tampak mengambang karena sebagian besar sifat *stem cell* hematopoetik adalah adheren yaitu tidak melekat pada dasar cawan petri. Dalam waktu 24 jam setelah kultur didapatkan  $2 \times 10^7$  sel limfosit TCD4+. Setelah itu, dilakukan karakterisasi limfosit TCD4+ dengan *flowcytometry*.

## 2. Desain prototipe limfosit TCD4+

Tujuan pada tahap ini adalah untuk menghasilkan limfosit TCD4+ yang resisten terhadap infeksi HIV. Pada tahapan ini dilakukan delesi atau pemotongan kromosom 32 bp basa nukleotida gen pengkode CCR5 pada posisi 554-576 bp sehingga terbentuk CCR5 yang mutan dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Digunakan enzim restriksi *EcoRI* karena enzim tersebut pada pemetaan plasmid terletak mengapit *multiple cloning site (MCS)* plasmid. Selanjutnya hasil delesi dicek dengan pemeriksaan *polymerase chain reaction (PCR)* untuk membuktikan apakah susunan basa nukleotida sudah terdelesi dilihat dari adanya untaian cDNA yang lebih rendah letaknya pada CCR5 mutan 32 bp dibanding dengan CCR5.

Kemudian dilakukan kloning dengan menggunakan *pGMT Easy vector* dan dilanjutkan dengan sub-klon ke dalam *pTarget mamalian vector* untuk memberikan hasil yang baik pada saat ditransfeksi ke dalam sel mamalia yang dalam invensi ini menggunakan *stem cell* hematopoetik dari darah tepi.



Pada tahap selanjutnya dilakukan transfeksi, yaitu memasukkan *nucleic acid* ke dalam sel mamalia tanpa menggunakan virus. Pada tahap ini, sub-klon CCR5 mutan 32 bp ditransfeksikan ke dalam *stem cell* hematopoetik dari darah tepi atau *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC). Sebelum dilakukan transfeksi ke dalam *stem cell* hematopoetik, maka terlebih dahulu disiapkan *stem cell* hematopoetik yang diambil dari darah tepi pada pasase 2 dimana usia sel telah mencapai 8 hari.

10

3. Uji resistensi prototipe limfosit TCD4+

Uji resistensi secara *in vitro* prototipe limfosit TCD4+ yang telah mutan terhadap infeksi HIV dilakukan dengan cara mengko-kultivasinya dengan darah tepi (PBMC) pasien HIV/AIDS dan analisis dilakukan berdasarkan *focus forming unit* (FFU). FFU menggunakan teknik *immunostaining* dengan fluoresensi untuk mendeteksi sel yang terinfeksi. Melalui ko-kultivasi diharapkan agar sel limfosit TCD4+ yang normal HIV masih dapat menginfeksi, sedangkan limfosit TCD4+ yang resisten HIV tidak dapat menginfeksi.

Uji dilakukan dengan membandingkan hasil transfeksi CCR5 gen yang masih utuh (*full gene*) dan CCR5 yang telah mutan (delesi 32) yang diko-kultivasi dengan darah tepi (PBMC) pasien HIV setelah 72 jam. Dari hasil uji didapatkan bahwa CCR5 yang *full gene* terbentuk FFU, yang artinya banyak sel terinfeksi, baik pada DNA hasil kloning maupun sub-klon, sedangkan pada CCR5 mutan 32 pada hasil ko-kultivasi tidak didapatkan FFU, yang artinya tidak ada sel terinfeksi, baik itu hasil kloning maupun sub-klon. Sehingga dapat disimpulkan bahwa delesi 32 bp basa nukleotida gen pengkode CCR5 pada posisi 554-576 bp, yang telah dilakukan kloning dan sub-klon kemudian ditransfeksikan ke dalam *stem cell* hematopoetik dari

25

30



darah tepi akan membentuk sel limfosit TCD4+ yang sudah membawa sifat gen yang baru yaitu CCR5 mutan 32 bp sehingga virus HIV tidak dapat masuk ke dalam sel target.

### 5 Contoh 1

Seseorang yang mengalami mutasi secara alamiah pada gen pengkode CCR5 akan menjadi resisten terhadap infeksi HIV. Dengan demikian, terapi gen berguna untuk mencegah masuknya  
10 HIV ke dalam sel target yang dihubungkan dengan mutasi pada CCR5 yang berupa delesi 32 bp gen pengkode CCR5. Dipilihnya CCR5 bukan CXCR4 dengan pertimbangan bahwa CXCR4 mempunyai banyak fungsi biologis di dalam tubuh, sehingga bila dilakukan mutasi pada CXCR4 maka banyak sistem fisiologis  
15 tubuh yang terganggu.

### Contoh 2

Delesi 32bp CCR5 mengakibatkan reseptor tersebut tidak  
20 berfungsi lagi, sehingga HIV tidak dapat masuk ke dalam sel target. Dua salinan dari alel ini terbukti memberikan efek proteksi yang kuat terhadap infeksi HIV. Alel ini ditemukan pada 5-14% populasi di Eropa, namun sangat jarang pada populasi di Afrika dan Asia. Beberapa riset menunjukkan bahwa  
25 individu dengan alel satu salinan mampu menghambat progresivitas ke arah AIDS dalam kurun waktu kurang lebih dua tahun. Delesi 32bp CCR5 pada permukaan luar dari CD4+ memberikan pengaruh besar pada progresifitas infeksi HIV.

### 30 Contoh 3

Tahun 2008, seorang dokter di German melakukan transplantasi sumsum tulang pada pasien leukemia yang terinfeksi HIV dari donor yang homozigot delesi 32 CCR5-.

Setelah 600 hari, didapatkan bahwa pasien tersebut sembuh dengan HIV yang tidak terdeteksi di dalam darahnya, jaringan otak dan anusya.

5        Ini akan dipahami bahwa uraian di atas dari perwujudan yang disukai diberikan dengan cara contoh saja dan bahwa berbagai modifikasi dapat dibuat oleh orang-orang yang ahli di bidangnya. Meskipun perwujudan invensi ini telah dijelaskan di atas dengan tingkat kekhususan tertentu, orang  
10 yang ahli dalam bidang ini bisa membuat banyak perubahan pada perwujudan yang diungkapkan tanpa menyimpang dari lingkup invensi ini.

15

20

25

30

**Referensi**

1. Anderson, J., Akkina, R. 2007. *Complete Knockdown of CCR5 by lentiviral vector-expressed RNAs and protection of transgenic macrophages against HIV-1 infection*. Gene Therapy, Vol. 14, No. 14, pp. 1287-1297.
2. Depkes RI. 2009. *Perkembangan Kasus AIDS 2000-2009. Pada: Situasi HIV & AIDS di Indonesia*. Komisi Penanggulangan AIDS. Jakarta, pp. 1-6.
3. Purwati, Rantam, F. A., Nasronudin. 2010. *Characterization Of Cd4+ T Lymphocyte From Bone Marow Stem Cell Using Indirect Immunofluoresence For Hiv & Aids Treatment*. Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease, Vol. 1, No. 3 Sept-Des 2010.
4. Purwati, Rantam, F. A., Nasronudin. 2010. *Promising Hematopoetic Stem Cell for Treatment in Immunocompreimized Condition: Focus on HIV/AIDS*. Pada: Konas PETRI Bali 2010.
5. Rantam, F. A., Ferdiansyah, Nasronudin, Purwati. 2009. *Stem Cells and Exploration*. Airlangga University Press, Surabaya.
6. Rantam F.A., Ferdiansyah, Purwati, Nasronudin. 2010. *Protokol Isolasi dan Kultur Sel Punca Hematopoetik*. Airlangga University Press, Surabaya.

**Klaim**

1. Metode pembuatan prototipe sel Limfosit TCD4+ yang resisten terhadap infeksi HIV melalui tahapan:
- 5
- a) mengisolasi sel limfosit TCD4+ dari darah tepi sebanyak 10 ml menggunakan larutan *ficoll* 10 ml bergradien 1,007, kemudian didapatkan lapisan mononuklear (*buffy coat*) sebanyak 2,5 mm<sup>3</sup>, selanjutnya
- 10 dipurifikasi menggunakan *magnetic beads* dan dikultur pada medium penumbuh *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) untuk diperoleh *stem cell* hematopoetik sebanyak 2x10<sup>7</sup> sel dan dilakukan karakterisasi menggunakan *flowcytometry*,
- 15
- b) memotong gen pengkode CCR5 pada limfosit TCD4+ pada posisi 554-576 bp sehingga terbentuk CCR5 yang mutan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* sesuai pemetaan,
- 20
- c) memotong gen pengkode CCR5 pada bagian b) kemudian dilakukan kloning dengan menggunakan *pGMT easy vector* dan dilakukan sub-klon dengan menggunakan *pTarget mamalian vector*,
- 25
- d) melakukan transfeksi gen pengkode CCR5 ke dalam *stem cell* hematopoetik derivat dari darah tepi pada pasase 2 dimana usia sel mencapai 8 hari, sehingga dihasilkan prototipe limfosit TCD4+ yang telah mutan terhadap infeksi HIV.
- 30
2. Metode menurut klaim 1 menghasilkan prototipe limfosit TCD4+ dimana dilakukan uji resistensi secara *in vitro* dengan cara mengko-kultivasi dengan darah tepi pasien



HIV/AIDS selama 72 jam dan dianalisis berdasarkan *focus forming unit* (FFU).

3. Metode menurut klaim 1 dan 2 dimana pengujian dilakukan  
5 dengan membandingkan hasil transfeksi CCR5 *full gene* dan CCR5 mutan (delesi 32).
4. Metode menurut klaim 1 sampai 3 dimana CCR5 *full gene*  
10 terbentuk FFU (*focus forming Unit*) yang menunjukkan banyak sel terinfeksi baik pada DNA hasil kloning maupun sub-klon.
5. Metode menurut klaim 1 sampai 4 dimana CCR5 mutan tidak  
15 didapatkan FFU (*focus forming Unit*) yang menunjukkan tidak ada sel terinfeksi baik pada DNA hasil kloning maupun sub-klon.
6. Metode menurut klaim 1 sampai 5 dimana memperoleh  
20 prototipe limfosit TCD4+ yang memiliki sifat gen resisten terhadap HIV.

25

30

Abstrak**METODE PEMBUATAN PROTOTIPE SEL LIMFOSIT TCD4+  
YANG RESISTEN TERHADAP INFEKSI HIV**

5

Invensi ini menghasilkan prototipe *stem cell* yang berisi gen yang telah resisten terhadap infeksi HIV melalui transfeksi mutan 32 bp gen pengkode CCR5 pada *stem cell* hematopoetik derivat dari darah tepi. Tahapan yang dilakukan untuk mencapai invensi ini adalah sebagai berikut: 1) isolasi, purifikasi dan kultur sel limfosit TCD4+ dari sel darah tepi (PBMC), 2) pemotongan gen pengkode CCR5 pada limfosit TCD4+ pada posisi 554-576 bp sehingga terbentuk CCR5 yang mutan menggunakan enzim restriksi EcoRI, 3) pemotongan dilakukan kloning dengan menggunakan *pGMT easy vector* dan dilakukan sub-klon dengan menggunakan *pTarget mamalian vector*, 4) dilakukan transfeksi gen pengkode CCR5 ke dalam *stem cell* hematopoetik dari darah tepi pada pasase 2 saat usia sel mencapai 8 hari, 5) uji resistensi sel limfosit TCD4+ yang telah mutan terhadap infeksi HIV berdasarkan *focus forming unit* (FFU).

25

