



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

: LPPM UNIVERSITAS AIRLANGGA
Kampus C Unair,
Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115
INDONESIA

Untuk Inovasi dengan Judul

: KLON REKOMBINAN SAG-1 TOKSOPLASMA SERTA PROSES PEMBUATANNYA

Inventor

: Dr. Mufasirin, M.Si. ✓
Dr. Suwarno, drh., M.Si.
Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.
Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S.
Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

Tanggal Penerimaan

: 03 Maret 2014

Nomor Paten

: IDP000056626

Tanggal Pemberian

: 12 Februari 2019

Perlindungan Paten untuk inovasi 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 inovasi 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

(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000056626 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 12 Februari 2019

(51) Klasifikasi IPC⁸ : C 07K 14/45, C 12N 15/30, A 61K 38/00, A 61K 39/00

(21) No. Permohonan Paten : P00201401220

(22) Tanggal Penerimaan: 03 Maret 2014

(30) Data Prioritas :
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

(43) Tanggal Pengumuman: 23 Oktober 2015

56) Dokumen Pembanding:
EP1086228 (A1)
NZ241043 (A)
US5578453 (A)
CN101508999 (A)

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
LPPM UNIVERSITAS AIRLANGGA
Kampus C Unair,
Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115
INDONESIA

(72) Nama Inventor :
Dr. Mufasirin, M.Si., ID
Dr. Suwarno, drh., M.Si., ID
Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P., ID
Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S., ID
Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes., ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Drs. Ahmad Muniri

Jumlah Klaim : 4

Judul Invensi : KLON REKOMBINAN SAG-1 TOKSOPLASMA SERTA PROSES PEMBUATANNYA

Abstrak :

Suatu Klon Rekombinan *Surface Antigen-1* (SAG -1) Toksoplasma, adalah suatu bakteri yang membawa plasmid rekombinan SAG-1 dimana pembuatan rekombinan tersebut menggunakan sumber DNA *insert* yang dirancang dengan urutan primer dengan *amplicon* sepanjang 1004 bp. Tahapan proses pembuatan Klon Rekombinan SAG-1 Toksoplasma meliputi: kultivasi takzoit *Toxoplasma gondii*, perancangan primer untuk mendapatkan DNA *amplicon* 1004 bp, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemurnian DNA 1004 bp, kloning an pengujian hasil klon rekombinan Toksoplasma. Klon Rekombinan SAG-1 Toksoplasma yang membawa DNA *insert* 1004 bp, dapat digunakan lebih lanjut untuk memproduksi protein rekombinan P30 *Toxoplasma gondii*. Produk tersebut dapat digunakan untuk pembuatan kit diagnostik dan antibodi terhadap *Toxoplasma gondii* yang nantinya dapat digunakan untuk pengendalian toksoplasmosis pada manusia dan hewan.





Formulir Permohonan Paten

Diisi oleh petugas

Tanggal Pengajuan :

03 MAR 2014

Nomor permohonan :

P00201401220

Dengan ini saya/kami ¹⁾ (71) Nama : LPPM Universitas Airlangga Alamat ²⁾ : Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115 Warga Negara : Indonesia Telepon : 081553156033 NPWP :	
Mengajukan permohonan paten/ paten sederhana	[✓]
Yang merupakan permohonan paten Internasional/PCT dengan nomor :	
(74) melalui /tidak melalui *) Konsultan Paten Nama Badan Hukum ³⁾ : = = Alamat Badan Hukum ²⁾ : = = Nama Konsultan Paten : = Alamat ²⁾ : Nomor Konsultan Paten : = Telepon / fax :	[✓]
(54) dengan judul invensi: KLON REKOMBINAN SAG-1 TOXOPLASMA SERTA PROSES PEMBUATANNYA	[✓]
Permohonan Paten ini merupakan pecahan dari permohonan paten nomor :	[]

<p>(72) Nama dan kewarganegaraan para inventor :</p> <p>..Dr. Mufasirin, drh., M.Si.....warga negara... Indonesia....</p> <p>..Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.warga negara.....Indonesia....</p> <p>..Dr. Suwarno, drh., M.Si.....warga negara.....Indonesia....</p> <p>..Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.....warga negara.....Indonesia...</p> <p>..Prof. Dr.Dewa Ketut Meles, drh., M.S.....warga negara.....Indonesia...</p>	<p>Diisi oleh petugas</p> <p>[✓]</p>
<p>(30) Permohonan paten ini diajukan dengan/tidak dengan *) Hak prioritas ⁴⁾</p> <p>Negara : Tgl. Penerimaan permohonan Nomor prioritas</p> <p>..... </p> <p>..... </p> <p>..... </p>	<p>[]</p>
<p>Bersama ini saya lampirkan ⁵⁾ :</p> <p>1 (satu) rangkap :</p> <p>[] surat kuasa</p> <p>[X] surat pengalihan hak atas penemuan</p> <p>[] bukti pemilikan hak atas penemuan</p> <p>[] bukti penunjukan negara tujuan (DO/EO)</p> <p>[] dokumen prioritas dan terjemahannya</p> <p>[] dokumen permohonan paten internasional/PCT</p> <p>[] sertifikat penyimpanan jasad renik dan terjemahannya</p> <p>[] dokumen lain (sebutkan) :</p> <p>Dan 3 (tiga) rangkap invensi yang terdiri dari :</p> <p>[X] uraian8..... halaman</p> <p>[X] klaim4..... buah</p> <p>[X] abstrak</p> <p>[X] gambar3..... buah</p>	<p>[]</p> <p>[✓]</p> <p>[]</p> <p>[]</p> <p>[]</p> <p>[]</p> <p>[]</p> <p>[]</p>
<p>Saya/kami usulkan, gambar nomor2..... dapat Menyertai abstrak pada saat dilakukan pengumuman atas Permohonan paten (UU No. 14 Tahun 2001)</p>	<p>[✓]</p>

Demikian permohonan paten ini saya/kami ajukan
Untuk dapat diproses lebih lanjut

Pemohon,

PPM Universitas Airlangga



(Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi. ⁶)

Keterangan :

1. Jika lebih dari satu orang maka cukup satu saja yang dicantumkan dalam formulir ini sedangkan lainnya harap ditulis pada lampiran tambahan.
2. Adalah alamat kedinasan/surat-menyurat
3. Jika konsultan Paten yang ditunjuk bekerja pada Badan Hukum tertentu yang bergerak dibidang konsultan paten maka sebutkan nama Badan Hukum yang bersangkutan.
4. Jika lebih dari ruang yang disediakan agar ditulis pada lampiran tambahan
5. Berilah tanda silang pada jenis dokumen yang saudara lampirkan
6. Jika permohonan paten diajukan oleh :
 - Lebih dari satu orang, maka setiap orang ditunjuk oleh kelompok /group
 - Konsultan Paten maka berhak menandatangani adalah konsultan yang terdaftar di Kantor Paten.

*) Coret yang tidak sesuai.

Form No. 001/P/HKI/2000

Tidak boleh diperbanyak dengan foto copy.

SURAT PERNYATAAN PENGALIHAN HAK ATAS INVENSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

1. Nama : Dr. Mufasirin, drh., M.Si.
Pekerjaan : Dosen Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Alamat : Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

2. Nama : Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.
Pekerjaan : Dosen Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Alamat : Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

3. Nama : Dr. Suwarno, drh., M.Si.
Pekerjaan : Dosen Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Alamat : Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

4. Nama : Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.
Pekerjaan : Dosen Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Alamat : Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

5. Nama : Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S.
Pekerjaan : Dosen Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Alamat : Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

dalam hal ini bertindak untuk dan atas nama para inventor yang bertanda tangan di bawah ini, selaku para inventor dari invensi berjudul :

KLON REKOMBINAN SAG-1 *TOXOPLASMA* SERTA PROSES PEMBUATANNYA

dan untuk selanjutnya disebut sebagai **PARA INVENTOR**,
bersama ini menyatakan mengalihkan hak sebagai pemohon pengajuan paten atas invensi tersebut diatas kepada :

Nama : LPPM UNIVERSITAS AIRLANGGA
Alamat : Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

dalam hal ini, sesuai dengan kewenangan diwakili oleh Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi. selaku Ketua LPPM Universitas Airlangga.

Demikian Surat Pernyataan ini kami buat secara sadar dan tanpa paksaan dari pihak manapun untuk dimanfaatkan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 26 Februari 2014

UNTUK DAN ATAS NAMA

Ketua LPPM Universitas Airlangga,



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi.

NIP : 19590805 198701 1 001

PARA INVENTOR,

1. Dr. Mufasirin, drh., M.Si

2. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P

3. Dr. Suwarno, drh., M.Si.

4. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

5. Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S.

Deskripsi

KLON REKOMBINAN SAG-1 *TOXOPLASMA* SERTA PROSES PEMBUATANNYA

5

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan suatu Klon Rekombinan SAG-1 *Toxoplasma*, lebih khusus lagi invensi ini mengenai suatu bakteri yang membawa plasmid rekombinan SAG-1 dimana proses pembuatan rekombinan tersebut menggunakan sumber DNA *insert* yang dirancang dengan urutan primer dengan *amplicon* sepanjang 1004 bp. Klon Rekombinan SAG-1 *Toxoplasma* yang membawa DNA *insert* 1004 bp tersebut, dapat digunakan lebih lanjut untuk memproduksi protein rekombinan P30 *Toxoplasma gondii*.

15 Latar Belakang Invensi

Toksoplasmosis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan oleh *Toxoplasma gondii*. Penyakit ini bersifat zoonotik dan pada umumnya asimtomatik. Pada ibu hamil dan hewan betina bunting dapat menyebabkan resiko yang serius yaitu kegagalan reproduksi dan kelainan kongenital, berupa resorpsi fetus, mumifikasi fetus, abortus, lahir mati, lahir lemah dan penularan pada fetus. Pada individu dengan gangguan sistem kekebalan seperti penderita *Human Infectious Virus - Autoimun Diseases Syndrome* (HIV-AIDS) dapat menjadi masalah yang serius dan bersifat oportunistik yang dapat menyebabkan ensefalitis fatal. Diagnosis secara serologik menggunakan metode *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan diagnosis penyakit yang sering dilakukan. Sampai sekarang belum ada diagnosis cepat, murah, praktis dan akurat serta pengobatan yang efisien untuk penderita toksoplasmosis.

Selama ini, pencegahan toksoplasmosis dilakukan hanya dengan cara mencegah kontak dengan sumber penularan (kotoran kucing) dan menghindari mengkonsumsi daging yang kurang masak dari hewan yang terinfeksi. Program vaksinasi belum sepenuhnya memberikan perlindungan, sedangkan efektifitas pengobatan dari berbagai penelitian memberikan hasil yang tidak sama. Bersumber dari penelitian mulai tahun 1966-1995 diperoleh hasil dua versi

yang kontradiktif. Pertama, pengobatan efektif menurunkan penularan dari ibu ke anak, dan kedua, pengobatan tidak efektif. Menurut Sciammarella (2002), pengobatan prenatal masih mempunyai peluang terjadi penularan kongenital sebesar 25%. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa pengobatan masih perlu dievaluasi.

5 Salah satu protein *T. gondii* yang bersifat immunogenik adalah *Surface Antigen-1* (disingkat SAG -1) atau Protein 30 kDa (disingkat P30), merupakan protein yang berperan dalam proses infeksi. Protein P30 *T. gondii* merupakan protein dominan yang menginduksi respons humoral dan seluler (Rachinel *et al.*, 2004). Aubert *et al.* (2000) dan Beghetto *et al.*, (2006) telah membuktikan bahwa rekombinan P30 dapat digunakan untuk mendeteksi adanya
10 IgG dan IgM anti *T. gondii*. Carvalho *et al.* (2008) menambahkan bahwa SAG-1 selain dapat mendeteksi IgG dan IgM juga IgA. Baik Aubert *et al.* (2000), Beghetto *et al.*, (2006) maupun Carvalho *et al.* (2008), menggunakan P30 sebagai kit diagnostik menggunakan metode ELISA.

Sampai saat ini, diagnosis toksoplasmosis menggunakan metode ELISA (*gold standard*)
15 masih merupakan diagnosis pilihan, karena memiliki sensitivitas dan spesifitas tinggi. Kekurangan dari metode ELISA yaitu membutuhkan waktu lama, peralatan dan teknisi khusus serta biaya mahal. Uji imunologik lain yang cepat, murah dan mudah dapat dilakukan dengan memanfaatkan teknologi imunokromatografi. Teknik ini sudah banyak dilakukan seperti uji kehamilan, diagnosis HIV-AIDS (Beristain *et al.*, 2005), penyakit demam berdarah (Adnin,
20 2002) dan malaria (Arum dkk, 2006). Dewi dkk (2010) telah menggunakan teknologi *Gold Immuno-chromatographic Assay* (GICA) untuk mendeteksi toksoplasmosis, tetapi masih harus disempurnakan. Salah satu model teknik imunokromatografi untuk deteksi antigen atau antibodi pada analit dengan hasil deteksi berupa warna yang dapat dilihat mata telanjang adalah *dipstick*. Penggunaan protein P30 *T. gondii* sebagai bahan dalam pembuatan *dipstick*
25 merupakan peluang yang dapat dikembangkan untuk perangkat diagnosis.

Toxoplasma gondii merupakan agen intraseluler obligat. Untuk dapat masuk ke dalam sel induk semang, parasit harus menempel pada membran sel induk semang. Salah satu protein yang berperan pada tahap penempelan parasit pada membran induk semang adalah SAG-1 (Black dan Boothroyd, 2000) yang merupakan ligan dari reseptor sel induk semang. Untuk
30 menghalangi supaya parasit tidak masuk ke dalam sel diperlukan strategi antara lain pemberian antibodi yang berfungsi untuk memblokir masuknya parasit. Pemanfaatan antibodi

untuk pengendalian penyakit (pencegahan melalui imunisasi pasif dan pengobatan dengan imunoterapi) sudah banyak dikaji.

Invensi yang diajukan adalah suatu klon rekombinan serta proses pembuatannya. Adanya klon rekombinan dapat menghasilkan protein yang bisa digunakan untuk pengembangan vaksin, kit dignostik dan produksi antibodi yang mendukung pengendalian toksoplasmosis. Pembuatan Klon Rekombinan SAG-1 *Toxoplasma* pada invensi ini meliputi: kultivasi takizoit *Toxoplasma gondii*, perancangan primer untuk mendapatkan *DNA amplicon* 1004 bp, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemurnian DNA 1004 bp, kloning dan pengujian hasil klon rekombinan *Toxoplasma*.

Uraian Singkat Invensi

Seperti yang telah diuraikan pada Latar Belakang Invensi bahwa invensi ini menyediakan suatu Klon Rekombinan SAG-1 *Toxoplasma* serta proses pembuatannya.

Suatu Klon Rekombinan *Surface Antigen-1* (SAG -1) *Toxoplasma* pada invensi ini menggunakan DNA 1004 bp yang berasal dari stadium takizoit *Toxoplasma*, dibuat melalui tahapan-tahapan berikut:

- a) perancangan primer untuk mendapatkan *DNA amplicon* 1004 bp;
- b) melakukan kultivasi *Toxoplasma gondii* stadium takizoit pada mencit *Mus musculus* strain Balb/C;
- c) melakukan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan rancangan susunan suhu yang digunakan tertentu;
- d) melakukan pemurnian DNA 1004 bp;
- e) melakukan kloning pada inang *E. coli* TOP10;
- f) melakukan pengujian hasil klon rekombinan *Toxoplasma* dengan PCR menggunakan rancangan primer spesifik.

Rancangan primer untuk mendapatkan *DNA amplicon* 1004 bp, menggunakan rancangan primer sebagai berikut:

Forward primer: 5'-TCG GTT TCG CTG CAC CAC TTC ATT-3'

Reverse primer: 5'-CAC GCG ACA CAA GCT GCG ATA-3'.

Rancangan suhu Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang digunakan secara bertahap meliputi: program persiapan dengan suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C

selama 20 detik, annealing dengan suhu 65°C selama 20 detik, pemanjangan rantai 72°C selama 65 detik, dan terminasi 72°C selama 7 menit. Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dilakukan sebanyak 35 siklus reaksi.

5 Klon Rekombinan *Surface Antigen-1* (SAG -1) *Toxoplasma* yang dihasilkan pada invensi ini, membawa DNA rekombinan 1004 bp yang menyandi protein P30 *Toxoplasma gondii*, dapat digunakan untuk pengembangan vaksin, kit diagnostik, dan produksi immunoglobulin terhadap *Toxoplasma*.

Uraian Singkat Gambar

10 Gambar 1, adalah hasil elektroforesis sampel *Polymerase Chain Reaction* (PCR) gen *sag*. Gambar 2, adalah klon yang membawa plasmid rekombinan P30. Gambar 3, adalah Hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR) plasmid rekombinan dari klon bakteri hasil kloning.

15

Uraian Lengkap Invensi

15 Seperti dikemukakan dalam Latar Belakang Invensi bahwa invensi ini menyediakan klon Rekombinan SAG-1 *Toxoplasma* serta proses pembuatannya, dimana proses pembuatan Klon Rekombinan *Surface Antigen-1* (disingkat SAG -1) *Toxoplasma* meliputi: perancangan
20 primer untuk mendapatkan *DNA amplicon* 1004 bp, *Polymerase Chain Reaction* (disingkat PCR), pemurnian DNA 1004 bp, kloning dan pengujian hasil klon rekombinan *Toxoplasma*. Berikut diberikan detil tahapan dan proses pembuatannya.

Kultivasi in vivo takizoit T. gondii

25 Sebanyak 1×10^7 takizoit *T. gondii* strain RH (koleksi Departemen Parasitologi Veteriner, FKH Unair) diinfeksi pada mencit *Mus musculus* Balb/C, umur 8-12 minggu secara *intraperitoneal*. Mencit dipelihara 72 jam, dan setelah menunjukkan sakit, mencit dikorbankan dan rongga peritoneum dicuci dengan 5 ml PBS sehingga takizoit dapat
30 dikumpulkan. Cairan hasil pencucian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan pellet digunakan untuk isolasi DNA (Mufasirin, 1999).

Isolasi DNA *T. gondii*

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nage, Germany). Pellet yang mengandung takizoit yang didapat dari kultivasi *in vitro* digunakan sebagai bahan isolasi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Pellet ditambahkan buffer lysis dan proteinase K dan dicampur dengan baik. Campuran kemudian ditambahkan 200 µl larutan B3 dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Larutan ditambahkan 210 µl ethanol absolut dan divortek. NucleoSpin® Column disiapkan dan diletakkan di atas tabung kolektor. Sampel dipindahkan ke dalam NucleoSpin® Column dan dilakukan sentrifugasi 4000 rpm selama 1 menit. Cairan dalam tabung kolektor dituang dan ditambahkan 500 µl larutan *washing buffer*, dan disentrifugasi selama 1 menit. Larutan dalam tabung kolektor dibuang. Ke dalam NucleoSpin® Column, ditambahkan 600 µl larutan *washing buffer*, disentrifugasi 4000 rpm 1 menit dan larutan dalam tabung kolektor dibuang. NucleoSpin® Column disentrifugasi kembali 4000 rpm selama 1 menit sehingga sisa ethanol hilang. NucleoSpin® Column dipindahkan dan diletakkan di atas tabung Eppendorf baru. Sebanyak 100 µl larutan buffer elusi yang sudah dihangatkan dengan suhu 70°C ditambahkan pada NucleoSpin® Column dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit. Tabung disentrifugasi 4000 rpm selama 1 menit. Larutan dalam tabung Eppendorf adalah larutan yang mengandung DNA dan disimpan dalam suhu -20°C dan siap digunakan sebagai cetakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

20 Perancangan Primer

Perancangan primer dimulai dengan mendapatkan urutan nukleotida SAG-1 *Toxoplasma gondii* di GenBank: HM776940.1. Selanjutnya memasukkan urutan nukleotida awal mulai no. 4-30 untuk mendapatkan *forward primer* dengan persentase GC lebih dari 50% dengan suhu *annealing* 65°C selama 20 detik. Urutan *forward primer* yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 2, dimana arah panah adalah koloni rekombinan. Memasukkan urutan nukleotida awal mulai no. 980-1011 untuk mendapatkan *forward primer* dengan persentase GC lebih dari 50% dengan suhu *annealing* 65°C selama 20 detik. Urutan *forward primer* yang didapatkan adalah *Forward primer*: 5'-TCG GTT TCG CTG CAC CAC TTC ATT-3' dan *Reverse primer*: 5'-CAC GCG ACA CAA GCT GCG ATA-3'. Urutan primer tersebut kemudian dikirim ke pabrik pembuatan primer (Genetika Science Indonesia).

Isolasi DNA *T. gondii*

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nage, Germany). Pellet yang mengandung takozoit yang didapat dari kultivasi *in vitro* digunakan sebagai bahan isolasi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Pellet ditambahkan buffer lysis dan proteinase K dan dicampur dengan baik. Campuran kemudian ditambahkan 200 µl larutan B3 dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Larutan ditambahkan 210 µl ethanol absolut dan divortek. NucleoSpin® Column disiapkan dan diletakkan di atas tabung kolektor. Sampel dipindahkan ke dalam NucleoSpin® Column dan dilakukan sentrifugasi 4000 rpm selama 1 menit. Cairan dalam tabung kolektor dituang dan ditambahkan 500 µl larutan *washing buffer*, dan disentrifugasi selama 1 menit. Larutan dalam tabung kolektor dibuang. Ke dalam NucleoSpin® Column, ditambahkan 600 µl larutan *washing buffer*, disentrifugasi 4000 rpm 1 menit dan larutan dalam tabung kolektor dibuang. NucleoSpin® Column disentrifugasi kembali 4000 rpm selama 1 menit sehingga sisa ethanol hilang. NucleoSpin® Column dipindahkan dan diletakkan di atas tabung Eppendorf baru. Sebanyak 100 µl larutan buffer elusi yang sudah dihangatkan dengan suhu 70°C ditambahkan pada NucleoSpin® Column dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit. Tabung disentrifugasi 4000 rpm selama 1 menit. Larutan dalam tabung Eppendorf adalah larutan yang mengandung DNA dan disimpan dalam suhu -20°C dan siap digunakan sebagai cetakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

20 Perancangan Primer

Perancangan primer dimulai dengan mendapatkan urutan nukleotida SAG-1 *Toxoplasma gondii* di GenBank: HM776940.1. Selanjutnya memasukkan urutan nukleotida awal mulai no. 4-30 untuk mendapatkan *forward primer* dengan persentase GC lebih dari 50% dengan suhu *annealing* 65°C selama 20 detik. Urutan *forward primer* yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 2, dimana arah panah adalah koloni rekombinan. Memasukkan urutan nukleotida awal mulai no. 980-1011 untuk mendapatkan *forward primer* dengan persentase GC lebih dari 50% dengan suhu *annealing* 65°C selama 20 detik. Urutan *forward primer* yang didapatkan adalah *Forward primer*: 5'-TCG GTT TCG CTG CAC CAC TTC ATT-3' dan *Reverse primer*: 5'-CAC GCG ACA CAA GCT GCG ATA-3'. Urutan primer tersebut kemudian dikirim ke pabrik pembuatan primer (Genetika Science Indonesia).

Polymerase Chain Reaction

Campuran reaksi PCR dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang terdiri dari atas 10 µl 2xPCR Master mix Solution, 2 µl DNA sampel, 1 µl primer spesifik SAG 1 (F: 10 pmol/µl), 1 µl primer spesifik SAG-1(R: F: 10 pmol/µl) dan *distilled water* 6 µl sehingga total volume 20 µl. Campuran reaksi PCR dicampur sampai homogen, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm beberapa detik agar larutan terkumpul di dasar tabung. Tabung Eppendorf selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin PCR menggunakan program persiapan dengan suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 20 detik, annealing dengan suhu 65°C selama 20 detik, pemanjangan rantai 72°C selama 65 detik dan terminasi 72°C selama 7 menit. Proses PCR menggunakan 35 siklus reaksi. Hasil PCR dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Elektroforesis

Larutan agarose (1% agarose dalam *TAE buffer*) dipanaskan sampai mendidih. Setelah suhu larutan 60°C, ditambahkan ethidium bromide sehingga konsentrasi akhir 0,5 mg/ml dan dicampur dengan menggoyang Erlenmeyer. Sisir (*comb*) dipasang pada kaca gel dengan pinggir telah diberi *isolasi tape*. Larutan agarose dituangkan dengan ketinggian 3-5 mm. Bila agarose mengeras, sisir diambil dan *isolasi tape* dilepas. Kaca gel dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi *TAE buffer* buffer TAE. Campuran DNA dengan *loading buffer* (5 µl DNA dan 3 µl *loading buffer*) dimasukkan ke dalam sumuran gel. Tangki elektroforesis ditutup dan *power supply* dinyalakan (100 V, 50 mA, 60 menit). Tahap terakhir, *power supply* dimatikan kemudian gel diambil dari tangki dan dibaca pada *UV-transluminator*. Hasil PCR dibandingkan dengan *DNA marker*, pada posisi 1004 bp. Pada Gambar 1, diberikan hasil elektroforesis sampel *Polymerase Chain Reaction* (PCR) gen *sag* (tanda panah adalah pita 1004 bp yang diambil dan dimurnikan, M=marker, S=sampel hasil PCR).

Pemurnian Hasil PCR

Pemurnian hasil PCR menggunakan *SNAP Gel Purification Kit* (Invitrogen). Pita hasil elektroforesis sampel PCR (1004bp), di bawah *UV-transluminator* dipotong menggunakan pisau steril. Hasil potongan gel kemudian ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan 2,5X volume 6,6M Sodium Iodine (250 µl), dicampur dengan cara menggerus dan divortek.

Polymerase Chain Reaction

Campuran reaksi PCR dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang terdiri dari atas 10 μl 2xPCR Master mix Solution, 2 μl DNA sampel, 1 μl primer spesifik SAG 1 (F: 10 pmol/ μl), 1 μl primer spesifik SAG-1(R: F: 10 pmol/ μl) dan *distilled water* 6 μl sehingga total volume 20 μl . Campuran reaksi PCR dicampur sampai homogen, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm beberapa detik agar larutan terkumpul di dasar tabung. Tabung Eppendorf selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin PCR menggunakan program persiapan dengan suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 20 detik, annealing dengan suhu 65°C selama 20 detik, pemanjangan rantai 72°C selama 65 detik dan terminasi 72°C selama 7 menit. Proses PCR menggunakan 35 siklus reaksi. Hasil PCR dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Elektroforesis

Larutan agarose (1% agarose dalam *TAE buffer*) dipanaskan sampai mendidih. Setelah suhu larutan 60°C, ditambahkan ethidium bromide sehingga konsentrasi akhir 0,5 mg/ml dan dicampur dengan menggoyang Erlenmeyer. Sisir (*comb*) dipasang pada kaca gel dengan pinggir telah diberi *isolasi tape*. Larutan agarose dituangkan dengan ketinggian 3-5 mm. Bila agarose mengeras, sisir diambil dan *isolasi tape* dilepas. Kaca gel dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi *TAE buffer* buffer TAE. Campuran DNA dengan *loading buffer* (5 μl DNA dan 3 μl *loading buffer*) dimasukkan ke dalam sumuran gel. Tangki elektroforesis ditutup dan *power supply* dinyalakan (100 V, 50 mA, 60 menit). Tahap terakhir, *power supply* dimatikan kemudian gel diambil dari tangki dan dibaca pada *UV-transluminator*. Hasil PCR dibandingkan dengan *DNA marker*, pada posisi 1004 bp. Pada Gambar 1, diberikan hasil elektroforesis sampel *Polymerase Chain Reaction* (PCR) gen *sag* (tanda panah adalah pita 1004 bp yang diambil dan dimurnikan, M=marker, S=sampel hasil PCR).

Pemurnian Hasil PCR

Pemurnian hasil PCR menggunakan *SNAP Gel Purification Kit* (Invitrogen). Pita hasil elektroforesis sampel PCR (1004bp), di bawah *UV-transluminator* dipotong menggunakan pisau steril. Hasil potongan gel kemudian ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan 2,5X volume 6,6M Sodium Iodine (250 μl), dicampur dengan cara menggerus dan divortek.

Polymerase Chain Reaction

Campuran reaksi PCR dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang terdiri dari atas 10 µl 2xPCR Master mix Solution, 2 µl DNA sampel, 1 µl primer spesifik SAG 1 (F: 10 pmol/µl), 1 µl primer spesifik SAG-1(R: F: 10 pmol/µl) dan *distilled water* 6 µl sehingga total volume 20 µl. Campuran reaksi PCR dicampur sampai homogen, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm beberapa detik agar larutan terkumpul di dasar tabung. Tabung Eppendorf selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin PCR menggunakan program persiapan dengan suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 20 detik, annealing dengan suhu 65°C selama 20 detik, pemanjangan rantai 72°C selama 65 detik dan terminasi 72°C selama 7 menit. Proses PCR menggunakan 35 siklus reaksi. Hasil PCR dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Elektroforesis

Larutan agarose (1% agarose dalam *TAE buffer*) dipanaskan sampai mendidih. Setelah suhu larutan 60°C, ditambahkan ethidium bromide sehingga konsentrasi akhir 0,5 mg/ml dan dicampur dengan menggoyang Erlenmeyer. Sisir (*comb*) dipasang pada kaca gel dengan pinggir telah diberi *isolasi tape*. Larutan agarose dituangkan dengan ketinggian 3-5 mm. Bila agarose mengeras, sisir diambil dan *isolasi tape* dilepas. Kaca gel dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi *TAE buffer* buffer TAE. Campuran DNA dengan *loading buffer* (5 µl DNA dan 3 µl *loading buffer*) dimasukkan ke dalam sumuran gel. Tangki elektroforesis ditutup dan *power supply* dinyalakan (100 V, 50 mA, 60 menit). Tahap terakhir, *power supply* dimatikan kemudian gel diambil dari tangki dan dibaca pada *UV-transluminator*. Hasil PCR dibandingkan dengan *DNA marker*, pada posisi 1004 bp. Pada Gambar 1, diberikan hasil elektroforesis sampel *Polymerase Chain Reaction* (PCR) gen *sag* (tanda panah adalah pita 1004 bp yang diambil dan dimurnikan, M=marker, S=sampel hasil PCR).

Pemurnian Hasil PCR

Pemurnian hasil PCR menggunakan *SNAP Gel Purification Kit* (Invitrogen). Pita hasil elektroforesis sampel PCR (1004bp), di bawah *UV-transluminator* dipotong menggunakan pisau steril. Hasil potongan gel kemudian ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan 2,5X volume 6,6M Sodium Iodine (250 µl), dicampur dengan cara menggerus dan divortek.

Selanjutnya diinkubasi 45°C selama sekitar 5 menit, sampai meleleh. Larutan kemudian diletakkan pada suhu ruang dan ditambahkan 1,5 kali volume *binding buffer* (525 µl) dan dicampur dan dilanjutkan ke proses isolasi DNA.

5 Kolum A diletakkan di atas tabung koleksi (Kolum B). Sebanyak 875 µl larutan yang mengandung DNA kemudian dimasukkan ke kolum A dan disentrifugasi 20.000 g selama 30 detik, pada suhu ruang. Cairan yang ditampung kemudian dimasukkan kembali ke kolum A dan disentrifugasi kembali dengan cara yang sama. Tampung cairan kemudian dibuang, dan ditambahkan 400 µl 1X *final wash* pada kolum A dan selanjutnya disentrifugasi dengan cara yang sama. Penambahan 400 µl 1X *final wash* pada kolum A diulangi lagi dan selanjutnya 10 disentrifugasi dengan cara yang sama. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan maksimum di atas 10.000 g minimal 1 menit untuk mengeringkan resin dan cairan hasil tampungan dibuang. Kolum A dipindahkan di atas tabung Eppendorf 1,5 ml baru, selanjutnya ditambahkan 40 µl aquadest steril dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan minimal 10.000 g selama 1 menit. Hasil larutan elusi 15 adalah larutan yang mengandung DNA. Pengukuran kadar DNA dan kemurnian hasil menggunakan nanodrop spectrophotometer. DNA hasil elusi dan kemudian disimpan pada suhu -20°C.

Kloning

20 Kloning gen dilakukan menggunakan *CT-GFP Fusion TOPO[®] Expression Kit* (Invitrogen). Campuran reaksi yang terdiri dari 4 µl produk PCR, 1 µl *Salt solution* dan 1 µl TOPO[®]Vector, dicampur dengan baik pada suhu kamar selama 15 menit. Campuran reaksi ditempatkan pada es dan selanjutnya dilakukan transformasi. Sebanyak 2 µl campuran reaksi ditambahkan ke dalam tabung *One[®] Shot chemically Competent E. coli* dan dicampur (tidak 25 menggunakan pipet), dan diinkubasi di dalam es selama 5-30 menit. Campuran reaksi dimasukkan ke dalam *water bath* suhu 42°C selama 30 detik tanpa digoyang. Segera dimasukkan tabung ke dalam es dan ditambahkan 250 µl *SOC medium* pada suhu kamar. Tabung diletakkan pada *shaker incubator* suhu 37°C (digoyang horizontal dengan 200 rpm) selama 1 jam. Campuran kemudian ditanam pada cawan Petri yang berisi LB agar yang 30 mengandung ampisilin dan diinkubasi 37°C semalam. Koloni yang tumbuh dianalisis lebih lanjut untuk memastikan kesesuaian panjang DNA yang diharapkan.

Isolasi dan Pengujian Plasmid Rekombinan

Isolasi plasmid menggunakan *S.N.A.P Miniprep Kit* (Invitrogen). Sebanyak 3 ml pertumbuhan semalam koloni tunggal dalam media LB disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Pellet yang didapatkan diresuspensi dengan 150 μ l *resuspension buffer* dan divortek. Sebanyak 150 μ l *lysis buffer* ditambahkan dan campur dengan baik dengan cara membolak-balikkan tabung 5-6 kali dan diinkubasi selama 3 menit, temperatur kamar. Sebanyak 150 μ l *precipitation salt* dingin ditambahkan dan dibolak-balik 6-8 kali sehingga tercampur rata, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 g selama 5 menit. Supernatan diambil dan masukkan ke dalam tabung Eppendorf steril. Sebanyak 600 μ l *binding buffer* ditambahkan dan dicampur dengan cara membolak-balikkan tabung 5-6 kali. Dengan pipet, campuran larutan dimasukkan ke dalam kolom *S.N.A.P. Miniprep Kit* dan disentrifugasi dengan 1000-3.000 g, 30 detik. Larutan pada tabung penampung dibuang. Sebanyak 500 μ l *wash buffer* ditambahkan pada kolom dan disentrifugasi 1000-3000 g selama 10-30 detik pada suhu kamar. Sebanyak 900 μ l *final wash* ditambahkan dan disentrifugasi dengan cara yang sama. Sentrifugasi diulang dengan kecepatan tinggi selama 1 menit pada suhu ruang sehingga resin pada kolom kering. Kolom *S.N.A.P. Miniprep Kit* dipindahkan di atas tabung Eppendorf steril dan ditambahkan 60 μ l *steril water*. Inkubasi dilakukan selama 3 menit pada temperatur kamar, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan tinggi selama 30 detik. Larutan yang didapatkan adalah larutan yang mengandung plasmid rekombinan dan disimpan pada suhu -20 $^{\circ}$ C.

Keberadaan *insert* gen *Sag1 Toxoplasma gondii* dibuktikan dengan cara dilakukan PCR menggunakan primer yang sesuai dengan DNA target. Hasil PCR plasmid rekombinan dielektroforesis dan dilihat pada *UV-transluminator*. Hasil PCR dibandingkan dengan DNA marker, pada posisi 1004 bp. Pada Gambar 3 disajikan hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR) plasmid rekombinan dari klon bakteri hasil kloning (M=Marker, 1,2=sampel plasmid klon 1 dan 2, tanda panah adalah *insert* 1004 bp).

Klaim

1. Suatu Klon Rekombinan *Surface Antigen-1* (SAG -1) *Toxoplasma* yang membawa DNA rekombinan 1004 bp yang menyandi protein P30 *Toxoplasma gondii*, yang dapat digunakan untuk pengembangan vaksin, kit diagnostik, dan produksi immunoglobulin terhadap *Toxoplasma*.
2. Suatu Klon Rekombinan *Surface Antigen-1* (SAG -1) *Toxoplasma* sebagaimana pada klaim 1, dimana pembuatan klon tersebut menggunakan DNA 1004 bp yang berasal dari stadium takizoit *Toxoplasma*, dibuat melalui tahapan-tahapan berikut:
 - a. perancangan primer untuk mendapatkan *DNA amplicon* 1004 bp;
 - b) melakukan kultivasi *Toxoplasma gondii* stadium takizoit pada mencit *Mus musculus* strain Balb/C;
 - c) melakukan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan rancangan suhu yang digunakan tertentu, sebanyak 35 siklus reaksi;
 - d) melakukan pemurnian DNA 1004 bp;
 - e) melakukan kloning pada inang *E. coli* TOP10;
 - f) melakukan pengujian hasil klon rekombinan *Toxoplasma* dengan PCR menggunakan rancangan primer spesifik.
3. Suatu rancangan primer untuk mendapatkan *DNA amplicon* 1004 bp sebagaimana disebutkan pada klaim 2, menggunakan rancangan primer sebagai berikut:

Forward primer: 5'-TCG GTT TCG CTG CAC CAC TTC ATT-3'

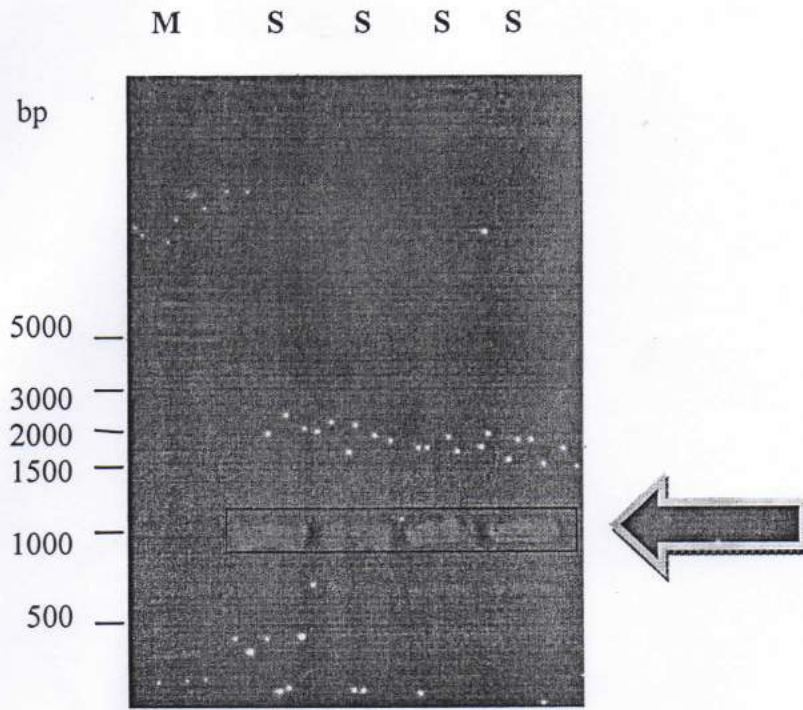
Reverse primer: 5'-CAC GCG ACA CAA GCT GCG ATA-3'.
4. Suatu proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sebagaimana klaim 2, dimana rancangan suhu yang digunakan secara bertahap meliputi: program persiapan dengan suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 20 detik, annealing dengan suhu 65°C selama 20 detik, pemanjangan rantai 72°C selama 65 detik, dan terminasi 72°C selama 7 menit, serta proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan sebanyak 35 siklus reaksi.

Abstrak**KLON REKOMBINAN SAG-1 *TOXOPLASMA* SERTA PROSES PEMBUATANNYA**

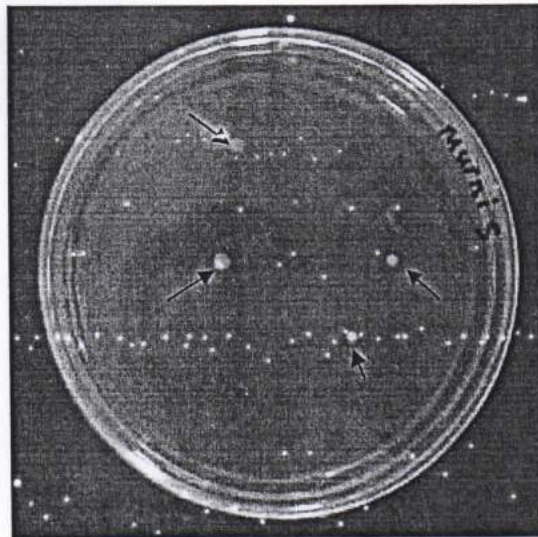
5

Suatu Klon Rekombinan *Surface Antigen-1* (SAG -1) *Toxoplasma*, adalah suatu bakteri yang membawa plasmid rekombinan SAG-1 dimana pembuatan rekombinan tersebut menggunakan sumber DNA *insert* yang dirancang dengan urutan primer dengan *amplicon* sepanjang 1004 bp. Tahapan proses pembuatan Klon Rekombinan SAG-1 *Toxoplasma* meliputi: kultivasi takizoit *Toxoplasma gondii*, perancangan primer untuk mendapatkan DNA *amplicon* 1004 bp, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemurnian DNA 1004 bp, kloning dan pengujian hasil klon rekombinan *Toxoplasma*. Klon Rekombinan SAG-1 *Toxoplasma* yang membawa DNA *insert* 1004 bp, dapat digunakan lebih lanjut untuk memproduksi protein rekombinan P30 *Toxoplasma gondii*. Produk tersebut dapat digunakan untuk pembuatan vaksin, kit diagnostik dan antibodi terhadap *Toxoplasma gondii* yang nantinya dapat digunakan untuk pengendalian toksoplasmosis pada manusia dan hewan.

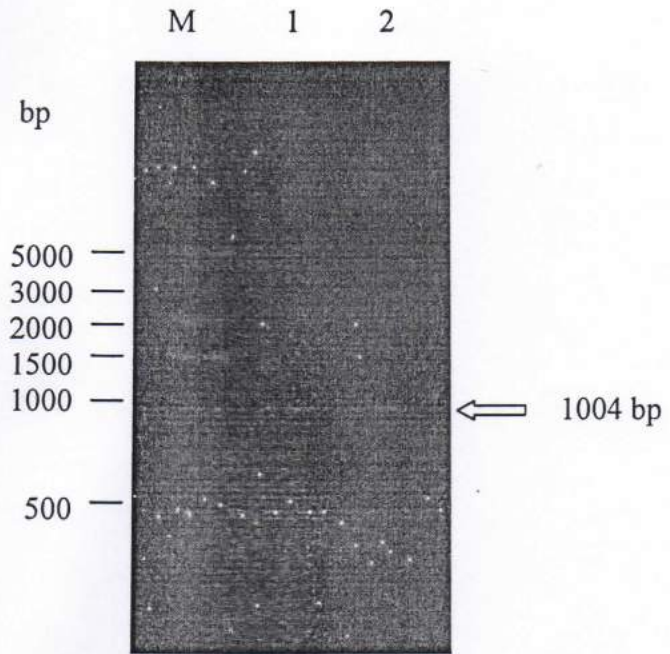
20



Gambar 1



Gambar 2



Gambar 3