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	: LEMBAGA PENYAKIT TROPIS UNIVERSITAS AIRLANGGA Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115 INDONESIA
Untuk Invensi dengan Judul	: ALAT DIAGNOSTIK TOKSOPLASMA MENGGUNAKAN PROTEIN P30 REKOMBINAN
Inventor	: Dr. Mufasirin, drh., M.Si Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P Prof. Dr. Dr. Suwamo, drh., M.Si Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S Drs. Zainul Muttaqin
Tanggal Penerimaan	: 16 Juni 2015
Nomor Paten	: IDP000055842
Tanggal Pemberian	: 14 Januari 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

P00201503611*** 16/06/2015 10:23:16***SUKMA*** 450,000.00*** 51***15/06/2015

dibuat rangkap

KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA R.I
DIREKTORAT JENDERAL HAK KEKAYAAN INTELEKTUAL

DIREKTORAT JENDERAL HAK KEKAYAAN INTELEKTUAL

Formulir Permohonan Paten

Diisi oleh petugas
Tanggal Pengajuan : 16 JUN 2015
Nomor permohonan : P00201503611

Dengan ini saya/kami [1] :
(71) Nama : Lembaga Penyakit Tropis 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] : x x
Alamat Badan Hukum [2] : x x

Nama Konsultan Paten : x
Alamat [2] :

Nomor Konsultan Paten : x
Telepon / fax :

(54) dengan judul invensi: [✓]

ALAT DIAGNOSTIK *TOXOPLASMA* MENGGUNAKAN PROTEIN P30 REKOMBINAN

Permohonan Paten ini merupakan pecahan dari permohonan paten nomor : [ ]

16 JUN 2015

(72) Nama dan kewarganegaraan para inventor :	Diisi oleh petugas
..Dr. Mufasirin, drh., M.Si.....warga negara... Indonesia....	[✓]
..Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P. .....warga negara.....Indonesia....	
..Prof. Dr. Dr. Suwarno, drh., M.Si. .....warga negara.....Indonesia....	
..Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes. .....warga negara.....Indonesia...	
..Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S. ..... warga negara.....Indonesia...	
..Drs. Zainul Muttaqin..... warga negara.....Indonesia...	
(30) Permohonan paten ini diajukan dengan/tidak dengan *) Hak prioritas [4])	[ ]
Negara : Tgl. Penerimaan permohonan Nomor prioritas	✓
Bersama ini saya lampirkan [5]) :	
1 (satu) rangkap :	
[ ] surat kuasa	[ ]
[X] surat pengalihan hak atas penemuan	[✓]
[ ] bukti pemilikan hak atas penemuan	[ ]
[ ] bukti penunjukan negara tujuan (DO/EO)	[ ]
[ ] dokumen prioritas dan terjemahannya	[ ]
[ ] dokumen permohonan paten internasional/PCT	[ ]
[ ] sertifikat penyimpanan jasad renik dan terjemahannya	[ ]
[ ] dokumen lain (sebutkan) :	[ ]
Dan 3 (tiga) rangkap invensi yang terdiri dari :	✓
[X] uraian .....9..... halaman [X] klaim .....5..... buah [X] abstrak [X] gambar .....1..... buah	
Saya/kami usulkan, gambar nomor .....1..... dapat Menyertai abstrak pada saat dilakukan pengumuman atas Permohonan paten (UU No. 14 Tahun 2001)	[✓]

16 JUN 2015

Demikian permohonan paten ini saya/kami ajukan

Untuk dapat diproses lebih lanjut

Pemohon,

(Prof. Dr. Nasronudin, dr, Sp.PD-KPTI, FINANSIM [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.

Deskripsi

ALAT DIAGNOSTIK *TOXOPLASMA* MENGGUNAKAN PROTEIN P30 REKOMBINAN

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan suatu alat untuk diagnosis toksoplasmosis, lebih khusus lagi invensi ini mengenai suatu alat diagnostik cepat *Toxoplasma* dimana pembuatan alat tersebut menggunakan prinsip *immunochromatography test* (ICT) menggunakan protein P30rekombinan *T. gondii*. Dengan adanya alat diagnostik tersebut, diagnosis toksoplasmosis dapat dilakukan dengan cepat, mudah dan murah untuk penanganan pasien dengan toksoplasmosis pada manusia dan hewan.

Latar Belakang Invensi

Toxoplasma gondii adalah parasit obligat intraseluler yang menyerang semua hewan berdarah panas, termasuk manusia. Diagnosis toksoplasmosis dapat ditegakkan berdasarkan ditemukannya parasit atau antibodi dalam spesimen. Di lapangan, diagnosis toksoplasmosis pada umumnya didasarkan atas ditemukan antibodi terhadap *T. gondii* dalam darah (dalam serum). Uji serologis yang sering digunakan adalah ELISA sebagai *gold standard.* Uji tersebut memiki sensitivitas dan spesifitas tinggi, tetapi dibutuhkan waktu yang lama, peralatan dan teknisi khusus serta biaya yang mahal. Di lain pihak, beberapa uji imunologis yang memanfaatkan teknologi kromatografi (imunokromatografi) sudah banyak dilakukan seperti test kehamilan, diagnosis HIV (Beristain *et al.*, 2005), penyakit demam berdarah (Adnin, 2002) dan malaria (Arum dkk, 2006). Keuntungan uji serologis menggunakan teknik immunokromatografi adalah waktu cepat (beberapa menit), biaya murah dan mudah (praktis) digunakan. Teknik imunokromatografi adalah model deteksi antigen atau antibodi yang penggunaannya dengan cara meneteskan material sampel (analit) dan hasil deteksi berupa warna yang dapat dilihat dengan mata telanjang.

Salah satu protein *T. gondii* yang bersifat immunogenik adalah protein 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 protein P30 rekombinan dapat digunakan untuk mendeteksi adanya IgG dan IgM anti *T. gondii.* Carvalho *et al.* (2008), menambahkan bahwa selain dapat mendeteksi IgG dan IgM, protein P30 juga dapat mendeteksi IgA. Baik Aubert *et al.* (2000), Beghetto *et al.*(2006) maupun Carvalho *et al.* (2008), menggunakan protein P30 sebagai kit diagnostik menggunakan metode ELISA.

Pada invensi ini, pembuatan Alat Diagnostik *Toxoplasma* menggunakan Protein P30 Rekombinan meliputi kultivasi *in vivoT. gondii* dan pemanenan cairan *intraperitoneal* pada mencit, isolasi DNA, perancangan primer untuk mendapatkan *DNA amplicon* 1004 bp, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemurnian DNA 1004 bp, produksi protein 30 *Toxoplasma gondii* pada BL21, pembuatan alat diagnostik dan uji lapang terhadap serum pasien dibandingkan dengan ELISA sebagai *gold standard.* Dengan adanya alat tersebut, diagnosis toksoplasmosis dapat dilakukan dengan cepat, mudah dan murah sehingga penanganan pasien dengan toksoplasmosis pada manusia dan ternak dapat segera dilakukan.

Uraian Singkat Invensi

Seperti yang telah diuraikan pada Latar Belakang Invensi bahwa invensi ini menyediakan suatu alat diagnosis *Toxoplasma*serta cara pembuatan dan penggunaannya untuk diagnosis toksoplasmosis pada manusia dan hewan. Suatu alat untuk diagnosis toksoplasmosis, dimana pembuatan alat tersebut menggunakan protein P30 rekombinan *T. gondii.*

Pembuatan alatuntuk diagnosis toksoplasmosis, dilakukan melalui tahapan-tahapan:

a) menempelkan poliester ukuran 1 x 1 cm di atas jendela pengamatan;
b) meneteskan sebanyak 10 µl gold colloidal pada polyester tersebut;
c) mengeringkan menggunakan oven pada suhu 37°C selama 30 menit;
d) menempelkan poliester degan ukuran 2 x 2 cm dibawah jendela pengamatan;
e) membuat bantalan ukuran 0,5 x 4 cm, yang digunakan untuk menempelkan membran nitroselulose, bantalan tersebut dilekatkan pada bagian sisi alat tepat di bawah jendela pengamatan;
f) melekatkan membran nitroselulose dengan ukuran 0,5 x 2 cm di bagian tengah bantalan;

g) menutup sisa bantalan dengan poliester dengan ukuran 0,5 x 1 cm dengan sedikit menutupi membran nitroselulose;

h) menyemprotkan protein P30rekombinan *T. gondii* ke membran nitroselulosa sebanyak 2 µl dengan konsentrasi 1-2,5 ng/µl;

i) mengepak alat dengan aluminium foil.

Alat diagnosis sesuai invensi ini, dimana penggunaannya dilakukan dengan tahapan:

a) membukakit dengan cara membalikkan bagian muka (cover);

b) mengambil serum uji pasien/penderita sebanyak 10-20 µl;

c) meneteskan serum pada bagian poliester tempat penetesan sampel serum, sebanyak 1 tetes buffer di dekat garis kontrol dan 2 tetes buffer pada bantalan *gold colloidal;*

d) menutup bagian muka (cover), dan ditunggu 15-20 menit;

e) melihat hasil uji pada jendela pengamatan, hasil positif apabila terdapat 2 garis, dan negatif apabila terlihat 1 garis.

Uraian Singkat Gambar

Gambar 1, adalah skema Alat Diagnostik*Toxoplasma*

Uraian Lengkap Invensi

Untuk membuat alat diagnosik cepat *Toxoplasma* dilakukanmelalui beberapa tahap yang meliputikultivasi *in vivoT. gondii* dan pemanenan cairan *intraperitoneal* pada mencit, isolasi DNA, perancangan primer untuk mendapatkan *DNA amplicon* 1004 bp, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemurnian DNA 1004 bp, produksi protein 30 *Toxoplasma gondii* pada BL21, pembuatan alat diagnostik dan uji lapang terhadap serum pasien dibandingkan dengan ELISA sebagai *gold standard.* Informasi detil diberikan berikut ini.

1) *Kultivasi in vivo takizoit T. gondii*

Sebanyak $1x10^7$ takizoit *T. gondiistrain* RH (koleksi Departemen Parasitologi Veteriner, FKH Unair) diiinfeksikan 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 dikumpulkan. Cairan hasil pencucian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan pellet digunakan untuk isolasi DNA (Mufasirin, 1999).

2) *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).

3) *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* 65^0C selama 20 detik. Urutan *forward primer* yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 1, dimana arah panah adalah koloni rekombinan. Memasukkan urutan nukleotida awal mulai no. 980-1011 untuk mendapatkan *reverse primer* dengan persentase GC lebih dari 50% dengan suhu *annealing* 65^0C 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.

4) *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 µlprimer spesifik SAG 1 (F: 10 pmol/µl), 1 µlprimer spesifik SAG-1(R: F: 10 pmol/µl) dan *destilled 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.

5) *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.

6) *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 *bunding buffer* (525 µl) dan dicampur dan dilanjutkan ke proses isolasi DNA.

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. Tampungan 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 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 adalah larutan yang mengandung DNA. Pengukuran kadar DNA dan kemurnian hasil menggunakan nanodrop spectrophotometer. DNA hasil elusi dan kemudian disimpan pada suhu -20°C.

7) *Kloning gen penyandi protein P30 Toxoplasma gondii pada BL21*

Produksi protein P30 *Toxoplasma gondii* pada bakteri BL21 meliputi ligasi, transformasi, pengujian sel yang membawa plasmid rekombinan dan ekspresi protein rekombinan.

Produk PCR diligasikan pada ke dalam vektor kloning pGEM®-T Easy. Rasio jumlah sisipan DNA dan vektor yaitu 3:1 dengan kondisi reaksi sebagai berikut: 2x bufer ligasi T4 DNA ligase 5 uL, 50 ng pGEM®-T Easy 1 uL, Produk PCR 3 uL dan T4 DNA ligase (3 Weiss unit/uL) 1 uL (total volume 10 uL). Campuran reaksi kemudian dihomogenkan dengan menggunakan pipet secara perlahan-lahan dan diinkubasi pada 4°C selama semalam.

Transformasi pada *E. coli* BL21 dimulai dengan persiapan pembuatan sel kompeten. *E. coli* BL21 ditumbuhkan pada media Luria-Bertani pada 37°C selama semalam. Preparasi sel kompeten dilakukan menggunakan TransformAid Bacterial Transformation Kit Thermo Scientific. Sebelumnya, T-solution disiapkan untuk proses transformasi dengan cara mencampurkan T-solution (A) dan T-solution (B) perbandingan 1:1 dan disimpan pada penangas es. Sebanyak 150 uL kultur *E.coli* BL21 yang telah ditumbuhkan semalam ditambahkan ke dalam 1,5 mL C-medium yang telah diinkubasi terlebih dahulu

pada 37°C dan inkubasi selama 20 menit. Pemanenan sel dilakukan dengan cara disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit dan selanjutnya disimpan pada penangas es. Sel kemudian diresuspensikan sel ke dalam 300 uL T-solution yang telah disiapkan sebelumnya dan diinkubasi pada penangas es selama 5 menit. Sel dipisahkan dari cairan T-solution dengan cara disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya sel diresuspensikan ke dalam 120 uL T-solution yang telah disiapkan sebelumnya dan diinkubasi pada penangas es selama 5 menit. Sebanyak 5 uL campuran DNA ligasi ditambahkan pada tabung baru dan inkubasi pada penangas es selama 2 menit. Sebanyak 50 uL sel kompeten yang telah disiapkan ditambahkan ke dalam tabung berisi campuran ligasi dan diinkubasi pada penangas es selama 5 menit. Reaksi transformasi sebanyak 50 uL dikultur pada media pada Luria-Bertani yang mengandung ampicilin (50 ug/mL), X-gal (20 ug/mL), IPTG (100 uM) dan diinkubasi selama 16 jam pada 37 ^{O}C. Seleksi transforman positif dilakukan menggunakan sistem biru-putih.

Koloni *E. coli* BL21rekombinan ditumbuhkan pada media cair LB semalam. Plasmid rekombinan disolasi dan dilakukan PCR untuk meneguhkan keberadaan DNA yang menyandi P30 *T. gondii*. *E. coli* BL21 rekombinan kemudian dilakukan kultur untuk perbanyakan. Sel yang didapat kemudian dipecah dengan cara lisis sel (sonikasi). Protein yang didapat kemudian dilakukan uji bloting untuk memastikan protein ekspresi sesuai dengan harapan. Selain menggunakan protein sitoplasma *E. coli* BL21 rekombinan, pengujian protein ekspresi dilakukan pada media kultur dengan metode yang sama.

8) *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 µl *resuspention buffer* dan divortek. Sebanyak 150 µl *lysis buffer* ditambahkan dan campur dengan baik dengan cara membolak balikkan tabung 5-6 kali dan diinkubasi selama 3 menit, temperatur kamar. Sebanyak 150 µl *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 µl *binding buffer* ditambahkan dan dicampur dengan cara membolak balikkan tabung 5-6 kali. Dengan pipet, campuran larutan dimasukkan ke dalam kolum *S.N.A.P.Miniprep Kit* dan disentrifugasi dengan 1000-3.000 g, 30 detik. Larutan pada tabung penampung dibuang. Sebanyak 500 µl *wash buffer* ditambahkan pada kolum dan

disentrifugasi 1000-3000 g selama 10-30 detik pada suhu kamar. Sebanyak 900 µl *final wash* ditambahkan dan disentrifugasi dengan cara yang sama. Sentrifugasi diulang dengan kecepatan tinggi selama1 menit pada suhu ruang sehingga resin pada kolum kering. Kolum *S.N.A.P.Miniprep Kit* dipindahkan di atas tabung Eppendorf steril dan ditambahkan 60 µl *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 °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.

9) *Karakterisasi Protein P30 rekombinanT. gondii dengan SDS PAGE*

Running gel dibuat dan dimasukkan ke dalam *plate* kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan *stacking gel* yang telah dipersiapkan. Susunan *running gel* dan *stackling gel* dibuat dengan mencampurkan Acrylamid, Tris, SDS 0,8%, Temed, APS dan aquades dalam beker gelas. Sebanyak 10 µg sampel protein ESA yang ditambahkan *Laemly buffers* dengan perbandingan 2 : 1 dilakukan perebusan pada 100^0C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam kolom cetakan yang terletak pada *stacking gel* dan dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi *electrode buffers* dengan 100 volt, 40 mA. Setelah *running,* gel dimasukkan ke dalam larutan *bromphenol blue dye* mencapai tepi gel. Kemudian dilakukan pengecatan dengan *comassie brilliant blue* selama semalam. Gel kemudian dilakukan pencucian sehingga terlihat pita protein dengan jelas. Hasil gel yang telah tampak pita-pita protein disimpan dalam larutan gliserol 10% dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul protein dilakukan dengan membandingkan berat molekul protein *standard.*

10) *Pembuatan Alat Diagnostik Toxoplasma*

Pembuatan Alat Diagnostik *Toxoplasma*diadopsi dari teknik *gold immunochromatographic assay* (Dewi, 2010). Poliester dengan ukuran 1 x 1 cm ditempelkan di atas jendela pengamatan pada sisi kiri kertas foto. Serbuk gold colloidal dilarutkan dan diencerkan seri sehingga didapatkan pengenceran yang optimal untuk biosensor. Sebanyak 10 mikroliter larutan *gold colloidal* diteteskan di atas tambalan poliester, kemudian dikeringkan menggunakan oven 37°C selama 30 menit. Di bagian

bawah jendela pengamatan ditempelkan kertas absorben. Bantalan dibuat dengan ukuran 0,5x4 cm. Di bagian tengah bantalan ditempelkan membran nitroselulose dengan ukuran 0,5x2 cm. Sisa bantalan pada ujung bagian atas dan bawah ditempelkan poliester dengan ukuran 0,5x1 cm dengan posisi sedikit menutupi membran nitroselulose. Bantalan kemudian ditempelkan pada kertas foto (sisi kiri). Sebanyak 2 mikroliter protein P30 rekombinan diteteskan pada membran nitroselulose di dekat tambalan poliester bagian ujung (zona test) dengan BioJet ^{TM}3000. Di bagian pangkal tambalan poliester diteteskan conjugate (*goat anti-mouse IgG*) dengan jarak 5 mm dari tempat pertama (zona kontrol) dan dikeringkan. Sebanyak 20 mikroliter sampel serum diteteskan pada bantalan di dekat zona kontrol, 1 tetes buffer. Sebanyak 2 tetes buffer juga diteteskan pada bantalan *gold colloidal*. Lembaran foto (kartu test) segera ditutup dan hasil reaksi dilihat 15-20 menit kemudian. Hasil positif IgG apabila muncul 2 garis berwarna merah pada garis kontrol dan garis test dan negatif apabila hanya muncul 1 garis merah pada garis kontrol dan *invalid* apabila tidak muncul garis sama sekali atau hanya muncul garis "test". Gambar alatKit Diagnostik *Toxoplasma* dapat dilihat pada Gambar 1.

11)*Uji Lapang Diagnosis Toksoplasmosis dengan Alat Diagnostik Toxoplasma*

Sejumlah 52 sampel serum darah kucing digunakan sebagai sampel uji. Serum darah sampel diteteskan/dicelupkan padaalat diagnostik, dibiarkan beberapa menit sampai pita kontrol terlihat. Hasil uji sampel serum darah kucing menggunakan Alat Diagnostik *Toxoplasma* dibandingkan dengan uji ELISA sebagai *gold standard.*

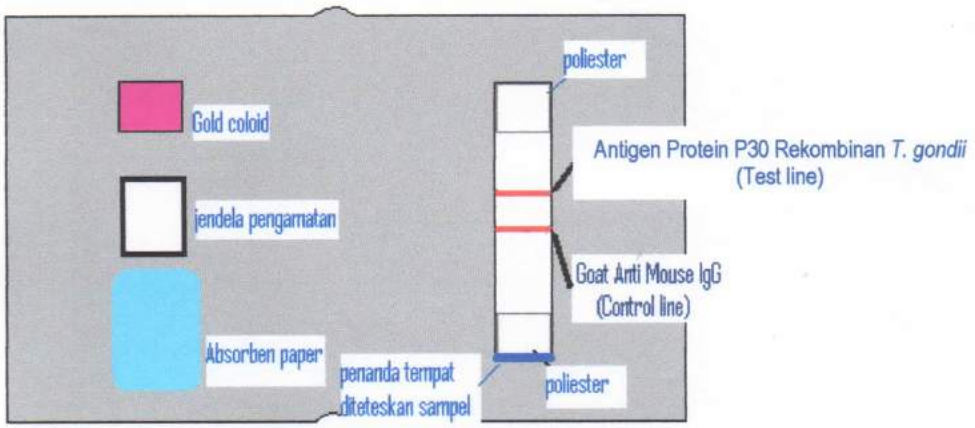
Klaim

1. Suatu alat untuk diagnosis toksoplasmosis, dimana dibuat menggunakan protein P30 rekombinan *T. gondii*
2. Suatu alatuntuk diagnosis toksoplasmosissebagaimana pada klaim 1, dimana pembuatannya melalui tahapan-tahapan berikut:
   a) menempelkan poliester ukuran 1 x 1 cm di atas jendela pengamatan;
   b) meneteskan sebanyak 10 µl gold colloidal pada polyester tersebut (tahapan 2a);
   c) mengeringkan menggunakan oven pada suhu 37°C selama 30 menit;
   d) menempelkan poliester degan ukuran 2 x 2 cm di bawah jendela pengamatan;
   e) membuat bantalan ukuran 0,5 x 4 cm, yang digunakan untuk menempelkan membran nitroselulose, bantalan tersebut dilekatkan pada bagian sisi alat tepat di bawah jendela pengamatan;
   f) melekatkan membran nitroselulose dengan ukuran 0,5 x 2 cm di bagian tengah bantalan;
   g) menutup sisa bantalan dengan poliester dengan ukuran 0,5 x 1 cm dengan sedikit menutupi membran nitroselulose;
   h) menyemprotkan protein P30 rekombinan*T. gondii* ke membran nitroselulosa;
   i) mengepak alat dengan aluminium foil.
3. Suatu alatuntuk diagnosis toksoplasmosis sebagaimana pada klaim 2, dimana jumlah protein P30 rekombinan *T. gondii* yang disemprotkan ke membran nitroselulosa adalah sebanyak 2 µl dengan konsentrasi 1-2,5 ng/µl.
4. Suatu alatdiagnosis toksoplasmosis yang dihasilkan sebagaimana klaim-klaim sebelumnya, dimana penggunaannya dilakukan dengan tahapan:
   a) membukaalat dengan cara membalikkan bagian muka (cover);
   b) mengambil serum uji pasien/penderita sebanyak 10-20 µl;
   c) meneteskan serum pada bagian poliester tempat penetesan sampel serum, sebanyak 1 tetes buffer di dekat garis kontrol dan 2 tetes buffer pada bantalan *gold colloidal;*
   d) menutup bagian muka (*cover*), dan ditunggu 15-20 menit;
   e) melihat hasil uji pada jendela pengamatan, hasil positif apabila terdapat 2 garis, dan negatif apabila terlihat 1 garis.
5. Suatu alat untuk diagnosis toksoplasmosis sebagaimana klaim-klaim sebelumnya, digunakan pada manusia dan hewan.

Abstrak

ALAT DIAGNOSTIK *TOXOPLASMA* MENGGUNAKAN PROTEIN P30 REKOMBINAN

Suatu alat diagnosik *Toxoplasma* dibuat melalui beberapa tahap yang meliputi kultivasi *in vivoT. gondii* dan pemanenan cairan intraperitoneal pada mencit, isolasi DNA, perancangan primer untuk mendapatkan DNA amplicon 1004 bp, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemurnian DNA 1004 bp, 7), elektroforesis, pemurnian hasil PCR, kloning gen penyandi protein 30 *Toxoplasma gondii* pada BL21, isolasi dan pengujian plasmid rekombinan, karakterisasi protein P30 rekombinan, pembuatan alat diagnostik dan uji lapang terhadap serum pasien dibandingkan dengan ELISA sebagai *gold standard.* Alat diagnosik *Toxoplasma* yang dihasilkan sesuai invensi ini dipergunakan untuk diagnosis toksoplasmosis pada manusia dan hewan. Secara prinsip, penggunaannya dilakukan dengan meneteskan serum uji pasien/penderita sebanyak 10-20 µl pada bagian poliester tempat penetesan sampel serum, sebanyak 1 tetes buffer di dekat garis kontrol dan 2 tetes buffer pada bantalan *gold colloidal,* menutup bagian muka (cover), dan ditunggu 15-20 menit, melihat hasil uji pada jendela pengamatan dimana memperoleh hasil positif apabila terdapat 2 garis, dan hasil negatif apabila terlihat 1 garis.


poliester
Gold coloid
Antigen Protein P30 Rekombinan T. gondii
(Test line)
jendela pengamatan
Goat Anti Mouse IgG
(Control line)
Absorben paper
penanda tempat
diteteskan sampel
poliester

Gambar 1