



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 SURABAYA (UBAYA)
Kampus UBAYA, Raya Kalirungkut,
Surabaya - 60292

Untuk Invensi dengan Judul : BIOSENSOR DNA UNTUK MENDETEKSI BAKTERI *E. COLI*
PADA SAMPEL PANGAN DENGAN NANOPARTIKEL PERAK
BERBASIS SPEKTROSKOPI UV-VIS

Inventor : Maria Goretti Marianti Purwanto
Ruth Chrisnasari

Tanggal Penerimaan : 21 November 2016

Nomor Paten : IDP000082719

Tanggal Pemberian : 26 Agustus 2022

Pelindungan 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
u.b.

Direktur Paten, Desain Tata Letak Sirkuit Terpadu dan
Rahasia Dagang



Drs. YASMON, M.L.S.
NIP. 196805201994031002



(11) IDP000082719 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 26 Agustus 2022

(51) Klasifikasi IPC⁸ : C 12Q 1/68, C 12Q 1/00

(21) No. Permohonan Paten : P00201607923

(22) Tanggal Penerimaan: 21 November 2016

(30) Data Prioritas :

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

(43) Tanggal Pengumuman: 09 Februari 2018

(56) Dokumen Pemandang:

US 6544729 B2

FIRMANYAH, ARIEF MAULANA, "Perancangan Probe Biosensor Berbasis Uv Spektrofotometri (aplikasi pada Salmonella dan E.coli)", (Abstrak), (Undergraduate thesis, Faculty of Technobiology, Department of Biology, University of Surabaya, 18-12-2014.

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
LPPM UNIVERSITAS SURABAYA (UBAYA)
Kampus UBAYA, Raya Kalirungcut,
Surabaya - 60292

(72) Nama Inventor :

Maria Goretti Marianti Purwanto, ID
Ruth Chrisnasari, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Drs. Syafrizal

Jumlah Klaim : 4

(54) Judul Invensi : BIOSENSOR DNA UNTUK MENDETEKSI BAKTERI *E. COLI* PADA SAMPEL PANGAN DENGAN NANOPARTIKEL PERAK BERBASIS SPEKTROSKOPI UV-VIS

57) Abstrak :

Invensi ini berhubungan dengan analisa atau deteksi cemaran mikroba dalam sampel, khususnya dalam bahan makanan secara cepat. Secara khusus invensi ini menekankan pada selektivitas, sensitivitas dan pendeknya waktu deteksi yang diperlukan sehingga merupakan keunggulan dibandingkan metode-metode yang sudah ada sebelumnya. Selektivitas dicapai melalui rancangan sekuen DNA probe pada Oligonukleotida Nanopartikel Perak (ONP) dan Oligonukleotida *Magnetic Beads* (OMB) sebagai pasangan probe yang spesifik untuk *E. coli*. Sensitivitas dicapai melalui aplikasi nanopartikel perak sebagai *transducer* sehingga biosensor ini mampu mendeteksi keberadaan DNA target pada jumlah yang sangat rendah. Desain metode yang meliputi tahapan proses, komposisi dan kondisi reaksi menghasilkan pendeknya waktu pengukuran.





Deskripsi

BIOSENSOR DNA UNTUK MENDETEKSI BAKTERI *E. COLI* PADA SAMPEL
PANGAN DENGAN NANOPARTIKEL PERAK BERBASIS SPEKTROSKOPI UV-
5 VIS

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan metode biosensor DNA
10 untuk mendeteksi mikroba dalam sampel, khususnya dalam
sampel pangan secara cepat.

Latar Belakang Invensi

Metode deteksi *foodborne pathogen* khususnya *E. coli*
15 yang telah banyak dilakukan adalah metode mikrobiologi dan
metode molekuler. Metode mikrobiologi telah dilakukan
sejak abad ke-19 yakni sejak penemuan mikroskop oleh Louis
Pasteur (Smith, 2012). Seiring perkembangan jaman,
pendeteksian dengan mikroskop menjadi kurang disukai
20 karena kurang spesifik. Contohnya, untuk produk-produk
fermentasi, mikroorganisme akan selalu terdeteksi di
produk pangan tetapi tidak dapat dibedakan antara
mikroorganisme penyebab penyakit atau mikroorganisme
pelaku fermentasi. Metode mikrobiologi kemudian berkembang
25 dengan cara pendeteksian penanaman bakteri pada media
sintetis yang disebut metode Angka Lempeng Total (ALT)
(Jorgensen et al., 1979). Selain dapat menghitung, metode
ini dapat lebih spesifik untuk mendeteksi keberadaan suatu
mikroorganisme patogen, misalnya *E. coli* yaitu dengan
30 memanfaatkan sifat morfologis dari koloni yang tumbuh pada
suatu media (Edberg & Smith, 1989; Frampton & Restaino,
1993). Kelemahan metode ini adalah membutuhkan waktu
pendeteksian yang lama serta tempat yang luas untuk



melakukan inkubasi bakteri di dalam wadah-wadah mengandung media sintetis yang disebut cawan Petri (Edberg & Smith, 1989). Akhir-akhir ini telah dikembangkan suatu bahan yang disebut Petrifilm yang serupa dengan metode ALT (Angka
5 Lempeng Total), tetapi cukup dengan menggunakan Petrifilm yang setipis kertas saja (Vail et al., 2003). Namun, metode ini masih belum bisa mendeteksi keberadaan mikroorganisme dengan cepat karena masih membutuhkan waktu inkubasi yang hampir sama lamanya dengan metode ALT.

10 Pendeteksian secara molekuler dikembangkan dengan teknologi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Maheux et al., 2011) dengan mengamplifikasi gen spesifik suatu mikroorganisme, kemudian dilakukan analisa dengan elektroforesis. Metode molekuler juga terus dikembangkan
15 dengan penemuan *Real Time PCR* (RT-PCR) yang juga dapat mengkuantifikasi jumlah mikroorganisme (Bellin et al., 2001).

Deteksi secara molekuler memiliki beberapa kelemahan, seperti membutuhkan instrumen dan reagen-reagen yang cukup
20 mahal serta individu yang ahli untuk melakukan analisis hasil uji molekuler sendiri. Selain itu, pendeteksian mikroorganisme secara molekuler juga telah dilakukan dengan sensor, seperti ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) menggunakan antibodi spesifik dari antigen yang ada
25 pada suatu mikroorganisme tertentu (Kerr et al., 2001; Vazquez et al., 1996). Dengan metode ELISA, waktu pendeteksian menjadi lebih cepat dan tidak membutuhkan tenaga analis khusus untuk melakukan ELISA. Sayangnya karena melibatkan antibodi, metode ini masih terbatas
30 oleh ketersediaan antibodi yang sesuai dan menjadi sangat mahal meskipun memiliki tingkat sensitifitas yang cukup tinggi (Vazquez et al., 1996). Hingga saat ini, perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi masih terus



mencari suatu metode pendeteksian mikroorganismen patogen, termasuk *E. coli* yang efisien dari berbagai segi.

Biosensor DNA merupakan metode alternatif yang dapat digunakan untuk mendeteksi cemaran patogen
5 (Bakthavathsalam et al., 2012). Biosensor DNA merupakan instrumen yang menggunakan *single stranded nucleotide* sebagai *probe*. *Probe* inilah yang berfungsi sebagai elemen pengenalan biologis. Untuk mencapai tingkat sensitivitas deteksi yang lebih baik, berbagai metode telah
10 dikembangkan dengan melibatkan penggunaan nanopartikel sebagai *transducer* atau sebagai *signaling agent*. Dengan penggunaan nanopartikel, pengukuran sinyal dapat dilakukan dengan beberapa teknik di antaranya *optical/colorimetric* (Cao et al., 2005) dan *electrochemical techniques* (Pumera
15 et al., 2007). Menurut Sunan & Kumar (2008), dari berbagai teknik pengukuran sinyal, teknik *optical/colorimetric* adalah paling sederhana. Metode deteksi biosensor DNA tersebut lebih spesifik dibanding dengan metode ELISA karena melibatkan proses pengenalan DNA yang dapat
20 dirancang sangat spesifik untuk jenis mikroorganismen tertentu (sedangkan pada ELISA, antigen yang mirip mungkin dihasilkan oleh lebih dari satu bakteri). Selain itu, metode Biosensor DNA juga terbukti relatif lebih cepat dibandingkan metode-metode lain yang telah disebutkan
25 sebelumnya. Diketahui bahwa keterulangan dari biosensor lebih baik daripada ALT dan limit deteksi dari biosensor DNA mencapai konsentrasi 90-140 ng/ μ l (Biesta-peters et al., 2010) dan pada penelitian Baktavathsalam (2012) hingga pada jumlah DNA yang sangat kecil yakni 54 ng saja.
30 Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, Biosensor DNA yang diusulkan pada invensi ini mampu mendeteksi keberadaan DNA sampai 1,3 ng/ μ l (Chrisnasari et al., 2015). Dengan demikian, maka biosensor DNA sangat



berpotensi untuk diaplikasikan sebagai alternatif dari metode yang sudah ada sebelumnya. Platform/rancangan metode yang tepat untuk deteksi suatu cemaran patogen tertentu sangat diperlukan agar hasil deteksi menjadi
5 akurat. Parameter yang perlu ditetapkan khususnya meliputi rancang bangun peralatan maupun protokol/kondisi deteksi.

Invensi sebelumnya yang berkaitan dengan biosensor pendeteksi mikroorganisme diantaranya US8623636B2, US20110171749A1, dan US8216797B2, yang menggunakan sistem
10 antigen-antibodi dan hanya bersifat kualitatif. Ditemukan juga satu patent biosensor metode kuantitatif (US6544729B2) yang konsep pengenalnya mengharuskan proses modifikasi/tranformasi pada sampel sebelum
15 dideteksi untuk menyisipkan molekul *inducer* yang akan menstimulasi terjadinya bioluminesensi yang akan dideteksi. Sedangkan invensi yang diajukan ini menggunakan sistem optis sehingga lebih sederhana dan bisa sekaligus bersifat kuantitatif. Rancangan Biosensor ini juga menggunakan konsep pengenalan sekuens DNA spesifik untuk
20 bakteri *E. coli*, sehingga bersifat lebih spesifik daripada sistem antibodi-antigen. Tahapan preparasi sampel yang diperlukan juga hanya berupa ekstraksi DNA tanpa memerlukan modifikasi pada sampel, sehingga waktu deteksi menjadi lebih singkat.

25

Uraian Singkat Invensi

Invensi ini merupakan metode pendeteksi *E. coli* menggunakan biosensor DNA secara optik yang mendasarkan deteksinya pada spektrum absorbansi Nanopartikel Perak
30 (NP) serta interaksi Oligonukleotida Nanopartikel Perak (ONP) dan Oligonukleotida *Magnetic Beads* (OMB) dengan DNA target pada pengaruh medan magnet. Selektivitas dicapai melalui rancangan sekuens DNA probe pada ONP dan OMB



sebagai pasangan probe yang spesifik untuk *E. coli*. Sensitivitas dicapai dengan mengaplikasikan nanopartikel perak sebagai *signaling agent/transducer* sehingga biosensor ini mampu mendeteksi keberadaan DNA target
5 sampai konsentrasi 1,3-7,75 ng/ μ l. Desain metode yang meliputi tahapan proses, komposisi dan kondisi reaksi menghasilkan pendeknya waktu pengukuran. Metode ini hanya membutuhkan tahapan ekstraksi DNA, dilanjutkan proses hibridisasi biosensor dengan DNA target pada sampel selama
10 10 menit dan deteksi selama 5 menit. Ilustrasi dari Biosensor ini dapat dilihat pada Gambar-1 dan Gambar-2 (Lampiran).

Uraian Lengkap Invensi

15 Invensi ini merupakan metode pendeteksi *E. coli* menggunakan biosensor DNA secara optik yang mendasarkan deteksinya pada spektrum absorbansi Nanopartikel Perak (NP) serta interaksi Oligonukleotida Nanopartikel Perak (ONP) dan Oligonukleotida *Magnetic Beads* (OMB) dengan DNA
20 target pada pengaruh medan magnet. Metode ini telah diuji coba di laboratorium dan terdiri dari langkah-langkah berikut:

- Mengekstrak DNA dari sampel pangan dan menyiapkan aliquot sebanyak 10 μ L;
- 25 - Menambahkan 50 μ L larutan Oligo-Nanopartikel Perak (ONP); 20 μ L larutan Oligonukleotida-*Magnetic Beads* (OMB); dan 10 μ L larutan bufer fosfat pH 7;
- Menginkubasi campuran larutan di atas selama 10 menit pada suhu 65°C, kemudian menempatkannya di atas batang
30 magnet selama 5 menit;
- Mengukur absorbansi campuran larutan pada 405nm dengan spektroskopi UV-Vis.;



Selama inkubasi, DNA target akan terhibridisasi dengan probe DNA pada ONP dan OMB membentuk suatu Biokonjugat ONP-OMB yang akan terpresipitasi pada pengaruh medan magnet. ONP yang tersisa disuspensi kemudian diukur
5 absorbansinya. Penurunan absorbansi dibandingkan kontrol negatif (tanpa DNA target) menunjukkan adanya DNA target pada sampel. Penurunan absorbansi ini berbanding lurus dengan konsentrasi DNA target yang ada.

Invensi ini juga meliputi komponen penyusun biosensor
10 yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan DNA target. Biosensor ini tersusun atas dua komponen utama yaitu Oligonukleotida Nanopartikel Perak (ONP) dan Oligonukleotida *Magnetic Beads* (OMB). Elemen pengenal (*recognition element*) yang digunakan adalah
15 *oligonucleotide single stranded* DNA (ssDNA) yang spesifik mengenali DNA target yaitu gen spesifik pada *E. coli*. Oligonukleotida ssDNA (DNA probe) yang ditempelkan pada Nanopartikel Perak (NP) dimodifikasi dengan penambahan gugus amin sedangkan oligonukleotida ssDNA yang
20 ditempelkan pada *Magnetic Beads* dimodifikasi dengan penambahan biotin. Selain itu, Nanopartikel Perak mengalami modifikasi dengan penambahan gugus karboksil melalui modifikasi alkanatiol (Changerath and Kunnantheri, 2011) menghasilkan modifikasi Alkanatiol Nanopartikel
25 Perak (ANP). Sedangkan *Magnetic Beads* juga mengalami modifikasi melalui *coating* dengan avidin (Ningning et al., 2004) menghasilkan *Avidin Magnetic Beads* (AMB). Konsentrasi oligonukleotida *single stranded* DNA (ssDNA) probe yang digunakan adalah konsentrasi 500 nM yang
30 merupakan konsentrasi optimum untuk deteksi ini. Dalam penelitian terbukti konsentrasi oligonukleotida 500 nM ini yang menunjukkan selisih absorbansi terbesar dibandingkan terhadap larutan kontrol negatif.



Tabel Absorbansi Peak Hasil Hibridisasi pada Berbagai Konsentrasi Oligonukleotida yang Direaksikan

Konsentrasi Oligonukleotide (nM)	Absorbansi Peak Hibridisasi	Absorbansi Peak Kontrol Negatif	Selisih Absorbansi
100	0,183	0,269	0,086
300	0,252	0,331	0,079
500	0,277	0,370	0,093
800	0,244	0,305	0,061
1000	0,257	0,355	0,098

Oligonukleotida Nanopartikel Perak (ONP) mampu menunjukkan spektrum absorbansi pada panjang gelombang 350-480 nm dengan serapan tertinggi pada 405 nm selanjutnya yang dapat digunakan lebih lanjut untuk agen deteksi pada sistem biosensor ini.

Invensi ini juga meliputi kondisi reaksi yang digunakan oleh biosensor ini untuk mendeteksi keberadaan DNA target. Buffer optimum yang digunakan adalah buffer pH 6,5-7,0 dengan suhu hibridisasi 65°C, sesuai dengan hasil optimasi yang dilakukan dalam penelitian ini (pH 6).

Tabel Selisih Absorbansi Peak Hasil Hibridisasi pada Berbagai pH pada suhu 65°C

pH pada proses Hibridisasi	Absorbansi Peak Hibridisasi	Absorbansi Peak Kontrol Negatif	Selisih Absorbansi
6	0,302	0,333	0,031
6,5	0,243	0,339	0,096
7	0,275	0,335	0,060
7,5	0,262	0,240	0,022
8	0,332	0,319	0,013

Biosensor ini mampu mendeteksi keberadaan DNA *E. coli* target sampai konsentrasi $\pm 1,3$ ng/ μ l. Biosensor ini juga mampu mendeteksi DNA target yang dipreparasi melalui 3 metode isolasi yang berbeda, yaitu dengan teknik *boiling lysis*, *Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol (PCI) Extraction*, dan *Chen and Kuo (1993) Method*. Biosensor ini telah secara



sensitif berhasil mendeteksi keberadaan *E. coli* pada sampel pangan (susu) sampai ketelitian 1,3-7,75 ng/ μ l.

Invensi ini mampu menunjukkan keunggulan dibandingkan metode deteksi *E. coli* lainnya dalam hal spesivitas, 5 kecepatan dan kepraktisan analisis. Hasil pengujian terhadap target sintetik menunjukkan hasil positif pada target yang komplemen, dan hasil yang negatif pada DNA target sintetik yang mengalami *mismatch*. Selain itu juga telah dicobakan pada sampel bakteri patogen lain 10 (*Salmonella* sp.) yang juga menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini menunjukkan biosensor ini bersifat sangat spesifik. Proses pengenalan (*recognition*) yang berdasarkan pasangan basa (*base pair*) membuat biosensor ini jauh lebih spesifik dibandingkan yang menggunakan prinsip antibodi- 15 antigen karena suatu antibodi tertentu dapat saja mengenali antigen yang sama dari mikroorganisme yang berbeda. Waktu yang diperlukan untuk mendeteksi keberadaan DNA target *E. coli* sangatlah singkat yaitu hanya 10 menit, dibandingkan metode deteksi terpopuler 20 saat ini seperti Polymerase Chain Reaction (PCR) yang membutuhkan waktu $\pm 2,5$ jam dan masih membutuhkan analisis lanjutan seperti elektroforesis yang memerlukan waktu 30-60 menit. Selain itu, invensi ini juga menyediakan kepraktisan karena pengguna tidak memerlukan keahlian 25 biologi molekuler khusus seperti pada analisis PCR. Hasil reaksi biosensor ini cukup diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang nantinya dapat dirancang secara *portable* sehingga mudah digunakan.



Klaim

1. Metode untuk mendeteksi bakteri *Escherichia coli* pada pangan yang terdiri dari langkah-langkah berikut:
 - 5 - Mengekstrak DNA dari sampel pangan;
 - Menambahkan larutan Oligo-Nanopartikel Perak (ONP); larutan Oligonukleotida-Magnetic Beads (OMB); dan larutan bufer fosfat pH 7 ke dalam larutan ekstrak DNA sampel dengan perbandingan volume larutan ekstrak DNA sampel : larutan ONP : larutan OMB : larutan 10 buffer fosfat pH 7 adalah 10 μ L : 50 μ L : 20 μ L : 10 μ L;
 - 10 - Menginkubasi campuran larutan di atas selama 10 menit pada suhu 65°C, kemudian menempatkannya di atas batang magnet selama 5 menit;
 - 15 - Mengukur absorbansi campuran larutan pada 405nm dengan spektroskopi UV-Vis.;
 - Jika nilai absorbansinya lebih kecil dari absorbansi larutan kontrol, maka disimpulkan bahwa sampel positif mengandung *Escherichia coli*.
- 20
2. Metode sesuai dengan klaim 1, di mana urutan Sekuen ONP adalah: 5'-NH₂-(CH₂)₆-CAGCGAAAATCCTGTTTCATGGCCC-3'.
3. Metode sesuai dengan klaim 1, di mana urutan Sekuen OMB 25 adalah: 5'-CACGGATCCAGACTTTGATACTGGCTCAG-Biotin-3'.
4. Metode sesuai dengan klaim 1, di mana ONP dan OMB disintesis menggunakan konsentrasi oligonukleotida sebesar masing-masing 500 nM.

30



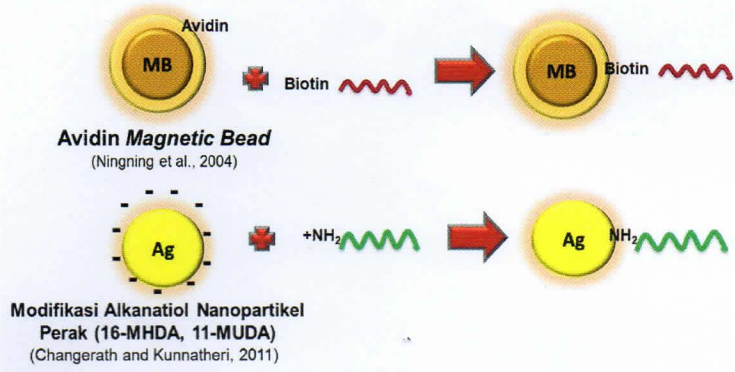
Abstrak

5 **BIOSENSOR DNA UNTUK MENDETEKSI BAKTERI *E. COLI* PADA SAMPEL**
10 **PANGAN DENGAN NANOPARTIKEL PERAK BERBASIS SPEKTROSKOPI**
 UV-VIS

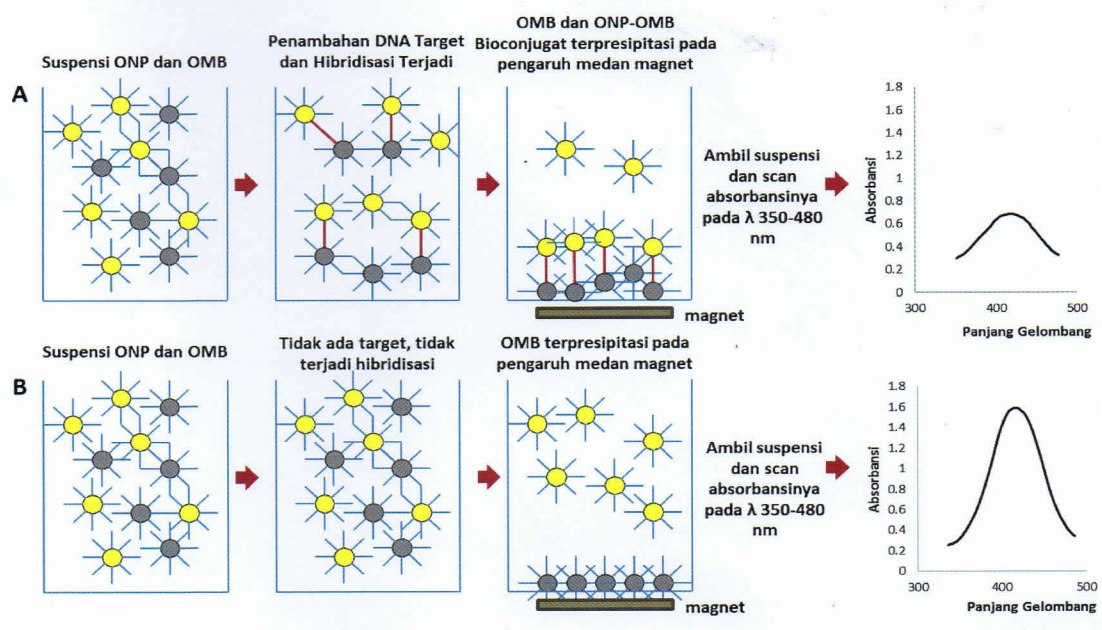
 Invensi ini berhubungan dengan analisa atau deteksi
 cemaran mikroba dalam sampel, khususnya dalam bahan
10 makanan secara cepat. Secara khusus invensi ini menekankan
 pada selektivitas, sensitivitas dan pendeknya waktu
 deteksi yang diperlukan sehingga merupakan keunggulan
 dibandingkan metode-metode yang sudah ada sebelumnya.
 Selektivitas dicapai melalui rancangan sekuen DNA probe
15 pada Oligonukleotida Nanopartikel Perak (ONP) dan
 Oligonukleotida *Magnetic Beads* (OMB) sebagai pasangan
 probe yang spesifik untuk *E. coli*. Sensitivitas dicapai
 melalui aplikasi nanopartikel perak sebagai *transducer*
 sehingga biosensor ini mampu mendeteksi keberadaan DNA
20 target pada jumlah yang sangat rendah. Desain metode yang
 meliputi tahapan proses, komposisi dan kondisi reaksi
 menghasilkan pendeknya waktu pengukuran.



Lampiran



5 Gambar 1. Ilustrasi Modifikasi Nanopartikel Perak (NP) dan *Magnetic Beads* (MB) untuk Sintesis Oligonukleotida Nanopartikel Perak (ONP) dan Oligonukleotida *Magnetic Beads* (OMB)



10 ONP OMB | DNA Target

Gambar 2. Ilustrasi deteksi DNA menggunakan Biosensor Nanopartikel Perak-*Magnetic Beads*:
(A) Terdapat DNA target, (B) Tidak ada DNA target