



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN SEDERHANA

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

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UNIVERSITAS SURABAYA
Jalan Ngagel Jaya Selatan 169
Surabaya

Untuk Invensi dengan Judul : PRIMER UNTUK DETEKSI DNA GENOMIK BABI PADA SAMPEL

Inventor : Dr. Dra. Mariana Wahjudi, M.Si.
Stanley Evander Emeltan Tjoa
Nalista Jayanthi

Tanggal Penerimaan : 14 September 2021

Nomor Paten : IDS000005627

Tanggal Pemberian : 28 Februari 2023


Pelindungan Paten Sederhana untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 10 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 23 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten Sederhana 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

Deskripsi**PRIMER UNTUK DETEKSI DNA GENOMIK BABI PADA SAMPEL****5 Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berhubungan dengan primer deteksi DNA genomik babi pada sampel sebagai salah satu komponen reaksi *quantitative-real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR), dalam hal ini primer deoksiribonukleotida (DNA), didesain dengan urutan basa nukleotida unik yang lebih spesifik untuk mendeteksi keberadaan daging babi pada sampel.

Latar Belakang Invensi

Halal adalah salah satu komponen penting pada sertifikasi produk pangan. Tujuannya ialah untuk memberi kenyamanan bagi konsumen. Konsumen berhak mengetahui produk yang dibeli sesuai dengan isi yang tercantum di label produk dan sesuai dengan kebutuhan konsumen baik jasmani (health issue) maupun rohani (religion). Negara juga menjaminnya sesuai dengan Undang-undang No. 33 Tahun 2014 mengenai jaminan produk halal.

Babi adalah salah satu bahan yang termasuk dalam kategori haram (Fatwa MUI mengenai produk halal). Di beberapa tempat, harga daging babi lebih murah dibandingkan dengan daging sapi (infopangan.jakarta.go.id). Dari segi rasa, daging babi lebih kuat dan teksturnya lebih lembut dibandingkan daging sapi. Hal ini beresiko mengundang kecurangan pelaku bisnis, sehingga perlu dilakukan pengujian adanya kandungan daging babi dalam produk pangan.

Ada beberapa metode deteksi keberadaan daging babi dalam produk pangan, yaitu: melalui metode berbasis protein, lemak, peptida, senyawa volatile and DNA (Heryani, 2020). Pemerintah menetapkan bahwa salah satu metode deteksi halal berbasis DNA yang diakui adalah metode *quantitative-real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Metode ini menggunakan enzim DNA polimerase untuk memperbanyak potongan DNA spesifik yang menjadi

targetnya. Komponen penting yang berperan pada keberhasilan proses deteksi menggunakan metode qRT-PCR adalah keunikan urutan basa nukleotida dari primer yang digunakan.

Primer (disebut juga probe), adalah potongan kecil DNA (oligonukleotida) yang terdiri dari beberapa basa nukleotida. Komponen reaksi dalam PCR, termasuk qRT-PCR, terdiri dari DNA target, primer-primer, enzim DNA polymerase, campuran 4 basa deoksi-ribonukleotida trifosfat, dan buffer serta air bebas nuclease. Pada reaksi qRT-PCR ini, primer akan menempel pada DNA genomik target kemudian menjadi tempat enzim DNA polymerase mengawali reaksi PCR. Urutan basa pada primer merupakan komplemen dari urutan basa pada DNA genomik, dirancang berdasarkan urutan basa pada DNA genomik target, dalam hal ini babi. Pemilihan urutan dan jumlah basa yang dipilih sangat menentukan akurasi penempelan primer pada DNA genomik target selama reaksi PCR. Semakin unik urutan basa nukleotidanya maka primer akan semakin spesifik. Dengan kata lain, desain primer ini menentukan keberhasilan, akurasi dan spesifisitas proses deteksi DNA genomik organisme secara qRT-PCR.

Saat ini telah ada beberapa primer yang dirancang oleh peneliti yang lain untuk kepentingan ini. Drummond et al (2013) dan Cammà and Monaco (2012) merancang primer/probe berdasarkan urutan cytochrome b mitokondria pada DNA genomik babi (*Sus scrofa*) (Drummond et al., 2013) (Cammà, Di Domenico and Monaco, 2012). Ali et al. (2015) merancang berdasarkan urutan NADH dehydrogenase subunit 5 dan ATPase subunit 6 (Ali et al., 2015). Namun, hasil invensi peneliti tersebut kurang spesifik, sehingga masih ada kemungkinan mendeteksi DNA dari hewan lain. Berdasarkan analisa primer-primer tersebut dengan database urutan nukleotida yang ada saat ini, terlihat bahwa primer tersebut memiliki kesamaan dengan urutan DNA genomik organisme lain selain *Sus scrofa* (keluarga babi), antara lain ikan, tikus dan kupu-kupu. Sebagai contoh: primer For-Por-Nik dan primer For-Por-Cam dapat menempel 100 % antara lain dengan DNA genom dari lalat kecil (*Phlebotomus perniciosus*) dan berang2 (*Atherurus africanus*) (Gambar 1). Hal ini mungkin disebabkan

karena informasi database urutan genom yang digunakan untuk merancang primer-primer tersebut lebih sedikit pada dekade yang lalu dibandingkan database yang tersedia saat ini. Berdasarkan database terkini dari *gene bank*, banyak hasil *sequencing* baru dari genom berbagai hewan diunggah orang (Gambar 1). Bila primer-primer tersebut diterapkan pada analisa sampel secara qRT-PCR, maka bisa memberikan kemungkinan hasil yang *false-positive*. Untuk itu diperlukan adanya alternatif primer yang lebih akurat, yang hanya akan mengenali urutan DNA genomik babi sehingga analisa akan lebih akurat dan spesifik untuk babi (*Sus scrofa*).

Primer pada invensi ini mempunyai urutan basa nukleotida spesifik yang mengenali urutan basa DNA genomik babi, yang dapat menjadi penanda spesifik bagi babi (*Sus scrofa* taxid:9823) dan beberapa jenis babi anggota familia dalam sub-ordo Suina (taxid:35497). Keunggulan ini menjadikan primer dalam invensi dapat mendeteksi berbagai galur babi, termasuk *common warthog*, *bushpig*, dan *desert warthog*.

Selain itu, invensi ini memiliki kelebihan dibandingkan primer yang dirancang peneliti sebelumnya, misalnya penelitian oleh Raharjo *et al.*, (2017), yaitu limit deteksi daging babi menggunakan primer invensi ini lebih rendah. Pada reaksi qRT-PCR menggunakan primer For-Por-Rah dan Rev-Por-Rah, dengan sampel 50 ng DNA babi (100%) dihasilkan nilai Cq 16,19 Raharjo *et al.*, (2017). Sedangkan dengan primer invensi ini, yaitu For-MWB dan Rev-MWB didapatkan nilai Cq (CT) 16,19 dari berat DNA sampel babi 0,5 ng (Tabel 1). Dengan kata lain, primer invensi ini dapat mendeteksi daging babi pada kadar yang sangat kecil dalam sampel. Primer invensi ini memiliki akurasi dan spesifitas lebih baik dibandingkan dengan beberapa primer untuk babi (*Sus scrofa*) dari peneliti-peneliti lain (Tabel 2 dan Gambar 2). Pasangan primer ini, selain dapat diterapkan untuk reaksi PCR dan RT-PCR primer ini juga dapat digunakan sebagai probe untuk proses hibridisasi DNA-DNA atau DNA-RNA.

Primer untuk deteksi DNA makhluk hidup secara PCR telah ada. Pada invensi S00202006880, metode PCR digunakan untuk

mendeteksi bakteri penyebab penyakit CVPD tanaman jeruk. Pada invensi S00201906692, primer invensi ditujukan untuk mendeteksi DNA genomik mencit (*Mus musculus*) dalam reaksi PCR. Pada kedua invensi di atas, DNA target yang dideteksi bukan DNA genomik babi melainkan DNA bakteri penyebab penyakit CVPD dan DNA mencit. Selain itu, metoda yang digunakan pada invensi di atas adalah PCR secara umum. Keunggulan invensi ini adalah DNA yang dideteksi adalah DNA genomik babi dengan metoda PCR umum dan secara qRT-PCR.

10 Invensi lain yang menarget DNA seputar babi telah terdaftar di Pangkalan Data Kekayaan Intelektual. Pada invensi P00201505263 dan P00201504500, invensi ini menggunakan oligonukleotida untuk membuat dan mengolah vaksin untuk penyakit pada babi yang disebabkan oleh Parvovirus. Beberapa invensi
15 lainnya menarget DNA agen penyebab penyakit pada babi. Pada invensi W00201200983 target DNA yang dideteksi adalah asam nukleat penyandi genotip virus teno Torque babi (PTTV) atau sub tipe PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, dan PTTV2c-VA. Berdasarkan urutan ini DNA yang menjadi target berbeda dari
20 target DNA pada invensi ini. Invensi ini memiliki perbedaan target dengan invensi di atas karena primer pada invensi ini menarget DNA genomik babi.

 Invensi lain yang khusus menarget DNA babi telah ada. Primer pada invensi IDS000005003 digunakan primer dengan urutan
25 GCAACCCTCACACGATTCT (Forward) dan GTGCAGGAATAGGAGATGTACG (Reversed) untuk mendeteksi *Sus scrofa*. Urutan nukleotida primer invensi tersebut berbeda dengan urutan pada invensi ini. Kelebihan invensi ini dibandingkan invensi tersebut adalah pada invensi ini primer bisa mendeteksi DNA babi secara umum
30 (keluarga babi, *Sus family*), termasuk *common warthog*, *bushpig*, dan *desert warthog*. Hal ini didasarkan pada hasil analisa secara bioinformatika.

Uraian Singkat Invensi

Invensi yang diusulkan ini merupakan sepasang primer dengan urutan unik, yang diperlukan sebagai salah satu komponen reaksi RT-PCR untuk deteksi DNA babi menggunakan alat *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR). Pasangan primer pada invensi ini memiliki urutan basa sebagai berikut, yaitu

primer For-MWB: 5'-ACACGCGCATATAAGCAGGT-3', dan
primer Rev-MWB: 5'-GTGCCTGCTTTCGTAGCACGTATT-3'.

Komponen dan pengaturan kondisi reaksi qRT-PCR diuraikan pada invensi ini karena komponen dan kondisi ini penting untuk reaksi qRT-PCR. Evaluasi ada tidaknya kontaminan babi, akan diuraikan lebih lanjut mengacu pada keterangan gambar-gambar berikut ini. Pasangan primer For-MWB dan Rev-MWB menunjukkan performa yang lebih baik dibandingkan pasangan primer peneliti yang lain, dalam hal sensitivitas lebih tinggi, nilai Cq paling rendah dengan kadar DNA babi 0,3 ng/20 uL reaksi dan spesifisitas yang paling baik, setara dengan setidaknya 0,3 mg daging babi.

Uraian Singkat Gambar

Gambar 1 adalah penjelasan tentang hasil analisa pensejajaran dengan software BLAST. Primer For-Por-Rah, For-Por-Nik dan For-Por-Cam menunjukkan kemiripan dengan urutan DNA hewan lain selain babi.

Gambar 2 adalah gambaran tentang spesifisitas deteksi beberapa primer babi dalam reaksi qRT-PCR dengan sampel DNA berbagai hewan.

Gambar 3 adalah gambaran skema kerja pelaksanaan deteksi keberadaan DNA babi dalam sampel menggunakan qRT-PCR dimulai dari ekstraksi DNA total dari sampel, pencampuran komponen reaksi qRT-PCR, pengaturan kondisi reaksi hingga evaluasi hasil.

Gambar 4 adalah gambaran tentang produk qRT-PCR menggunakan Primer For-MWB dan Rev-MWB dengan sampel DNA daging babi.

Gambar 5 adalah hasil visualisasi secara elektroforesis gel agarosa produk hasil qRT-PCR menggunakan primer For-MWB dan Rev-MWB pada berbagai kadar sampel DNA daging babi. Kadar DNA minimal adalah 0,05 ng/20 μ L reaksi; konsentrasi primer For-MWB dan Rev-MWB masing-masing 0,05 μ M; dengan 45 siklus reaksi qRT-PCR.

Uraian Lengkap Invensi

Primer pada invensi ini disiapkan dalam bentuk larutan oligonukleotida dalam air bebas nuclease dengan kadar 0,5 μ M. Penerapan primer pada reaksi PCR atau qRT-PCR dilakukan dengan tahapan dan metoda standar sesuai uraian berikut ini (Gambar 3).

Reaksi RT-PCR yang melibatkan pasangan primer invensi ini dilakukan dalam beberapa tahapan, yaitu:

(1) Ekstraksi DNA dari sampel.

Bagian dari babi yang paling sering ditambahkan pada produk olahan makanan adalah daging babi. Untuk tahapan ekstraksi prosedur yang digunakan sebaiknya kit ekstraksi DNA dari daging menggunakan kit dan dilakukan sesuai petunjuk dari pabriknya. Berbagai merek di pasaran telah ada untuk ekstraksi DNA dari produk olahan daging, dengan klaim DNA total dari daging makhluk hidup di dalamnya akan terekstraks dengan sempurna dengan kualitas yang sangat baik. Pada invensi ini, disarankan larutan DNA hasil ekstraksi mempunyai kemurnian dan kualitas yang baik. Kadar DNA yang didapat dari hasil ekstraksi 50 mg daging babi dengan beberapa kit ekstraksi DNA genomik berkisar 50 ng/ μ L.

(2) Reaksi qRT-PCR.

Reaksi qRT-PCR dilakukan menggunakan mesin *Thermal cycler (real time PCR)* dalam campuran reaksi tiap sampel sebagai berikut: 10 μ L 2X-RT master mix (Promega), primer For-MWB 0,05 μ M dan primer Rev-MWB 0,05 μ M, sampel DNA sebagai template minimal dan *nuclease free water* sampai volume akhir 20 μ L.

Cara mencampur sebaiknya dilakukan dengan cara sebagai berikut: pipet *nuclease free water* sesuai perhitungan dan

masukkan ke dalam tabung khusus untuk RT-PCR. Pipet 2X-RT *master mix* sebanyak 10 μL dan masukkan ke dalam tabung RT-PCR berisi *nuclease free water*, homogenkan dengan pemipetan 2-3 kali. Masukkan primer satu per satu dan homogenkan, terakhir masukkan sampel DNA dan homogenkan secara hati-hati dan cepat. Kumpulkan semua cairan yang menempel di dinding tabung dengan sentrifugasi cepat (*spin down*). Campuran reaksi siap dimasukkan ke mesin RT-PCR.

(3) Pengaturan kondisi reaksi qRT-PCR

10 Kondisi reaksi RT-PCR target diatur sebagai berikut:

- a). *pre-denaturation* pada 95 °C selama 5 menit;
- b). *denaturation* pada 94 °C selama 1 menit,
- c). *annealing* pada 57 °C selama 30 detik,
- d). *elongation* pada 72 °C selama 45 detik;
- 15 e). dilanjutkan ke tahapan b), c) dan d) berulang sebanyak 45 siklus.
- f). setiap siklus diakhiri dengan *pre melt* 95 °C selama 30 detik dan *high resolution melting* dari 45 °C ke 85 °C pada 0,04 °C.s⁻¹.
- 20 g). terakhir *post elongation* pada 72 °C selama 5 menit.

(4) Analisa hasil RT-PCR dan interpretasi data:

Pada invensi ini, hasil positif adanya DNA babi dalam sampel ditandai adanya pita DNA tunggal produk dari qRT-PCR yang mempunyai titik leleh (*melting point*) pada kisaran suhu 25 79 ° - 80 °C (Gambar 4). Pada kadar hingga 0,05 ng DNA per reaksi RT-PCR keberadaan DNA babi masih terdeteksi, ditandai dengan adanya puncak *melting* pada ~79-80 °C (Tabel 1).

Tabel 1 Nilai Cq sampel babi pada berbagai kadar dalam reaksi qRT-PCR menggunakan pasangan primer invensi ini

5

DNA total (ng/20 μ L reaksi)	Cq
5	13,049
0,5	16,192
0,05	20,103
0,005	None
0,0005	None
0	None

10

Selain dengan analisa nilai Cq dan melting point, produk hasil RT-PCR dapat dianalisa berdasarkan ukuran fragmen DNA produk dari qRT-PCR, secara elektroforesis pada gel agarose 2 %. Gel agarose dibuat dengan cara sebagai berikut: serbuk agarose ditimbang sebanyak 2 gram dan disuspensikan ke dalam 100 mL buffer tris-EDTA pada pH 7,5. Suspensi dipanaskan di atas lempeng pemanas atau di dalam oven/microwave hingga semua serbuk agarose larut dalam buffer.

15

Pada konfirmasi dengan elektroforesis pada gel agarosa, fragmen DNA hasil qRT-PCR PCR (*amplicon*) target dari sampel mengandung babi akan menghasilkan pita (fragmen) DNA berukuran ~219 bp. Bila dalam sampel tidak terdapat produk babi, maka proses qRT-PCR tidak menghasilkan pita DNA pada ukuran tersebut (Gambar 5).

20

- (5) Pengujian sensitivitas deteksi sampel dalam reaksi qRT-PCR menggunakan primer Por-For-MWB dan Por-Rev-MWB dan primer lainnya

25

Pengujian dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas dengan sampel DNA hasil ekstraksi dari sampel daging

babi masing-masing reaksi 0,3 ng / 20 μ L reaksi. Hasil analisa membuktikan bahwa nilai Cq yang didapat dari reaksi qRT-PCR menggunakan pasangan primer pada invensi ini paling kecil dibandingkan menggunakan pasangan primer dari peneliti lain (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa pasangan primer pada invensi ini lebih sensitif dibandingkan pasangan primer lainnya.

Tabel 2 Nilai Cq sampel babi pada reaksi qRT-PCR menggunakan beberapa pasangan primer

Pasangan Primer	C_q
For-MWB dan Rev-MWB (invensi ini)	18,43
For-Por-Rah dan Rev-Por-Rah (Raharjo <i>et al.</i> , 2017)	22,10
For-Por-Nik dan Rev-Por-Nik (Nikzad <i>et al.</i> , 2017)	24,48
For-Por-Cam dan Rev-Por-Cam (Cammà, Di Domenico and Monaco, 2012)	25,45

(6) Pengujian spesifisitas deteksi sampel secara qRT-PCR menggunakan pasangan primer invensi ini (For-MWB dan Rev-MWB) dan primer lainnya dengan sampel DNA beberapa hewan. Pengujian dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas dengan sampel DNA hasil ekstraksi dari berbagai sampel hewan, yaitu daging babi, daging ayam, daging kambing, ikan dan tikus. Sebagai pembanding, digunakan primer dari peneliti yang lain, yaitu: pasangan primer

For-Por-Nik: 5'-ATGAAACATTGGAGTAGTCCTACTATTTACC-3'

Rev-Por-Nik: 5'-CTACGAGGTCTGTTCCGATATAAGG-3'

(Nikzad *et al.*, 2017)

For-Por-Rah: 5'-CATTCGCCTCACTCACATTAACC-3'

Rev-Por-Rah: 5'-AAGAGAGAGTTCTACGGTCTGTAG-3'

(Raharjo *et al.*, 2017)

For-Por-Cam: 5'-ACGTAAATTACGGATGAGTTATTCGC-3'

Rev-Por-Cam: 5'-GCTGTTGCTATAACGGTAAATAGTAGGAC-3'

(Cammà, Di Domenico and Monaco, 2012)

Hasil analisa membuktikan bahwa dalam reaksi RT-PCR yang mengandung DNA babi, keempat pasangan primer yang digunakan dapat menghasilkan produk dengan nilai Cq relative rendah, yaitu berkisar 16 hingga 19,5. Walaupun demikian, pasangan primer pada invensi ini (For-MWB dan Rev-MWB) memberikan performa yang paling baik. Dengan pasangan primer For-MWB dan Rev-MWB ini, hanya sampel babi yang memberikan produk tunggal dengan puncak titik leleh tunggal. Keberadaan DNA ayam, kambing, ikan dan tikus tidak memberikan produk pada reaksi yang menggunakan primer For-MWB dan Rev-MWB ini, sedangkan pasangan primer dari peneliti yang lain masih menempel pada DNA hewan lainnya (Gambar 2). Pasangan primer For-Por-Nik dan Rev-Por-Nik, dan pasangan primer For-Por-Rah dan Rev-Por-Rah memberikan hasil positif selain DBA babi, juga pada DNA ikan. Bahkan pasangan primer For-Por-Cam dan Rev-Por-Cam menunjukkan hasil positif pada sampel DNA babi, ikan, tikus, kambing dan ayam. Pada kondisi ini bila kadar DNA ayam, kambing, ikan dan tikus sama dengan atau lebih dari 0,3 ng / 20 uL reaksi maka hasil RT-PCR dari primer peneliti lain akan menunjukkan hasil *false positive* (Gambar 2). Berkaitan hasil analisa dapat dikatakan bahwa keberadaan daging babi hingga 0,3 mg dalam produk makanan akan dapat dideteksi dengan primer invensi ini.

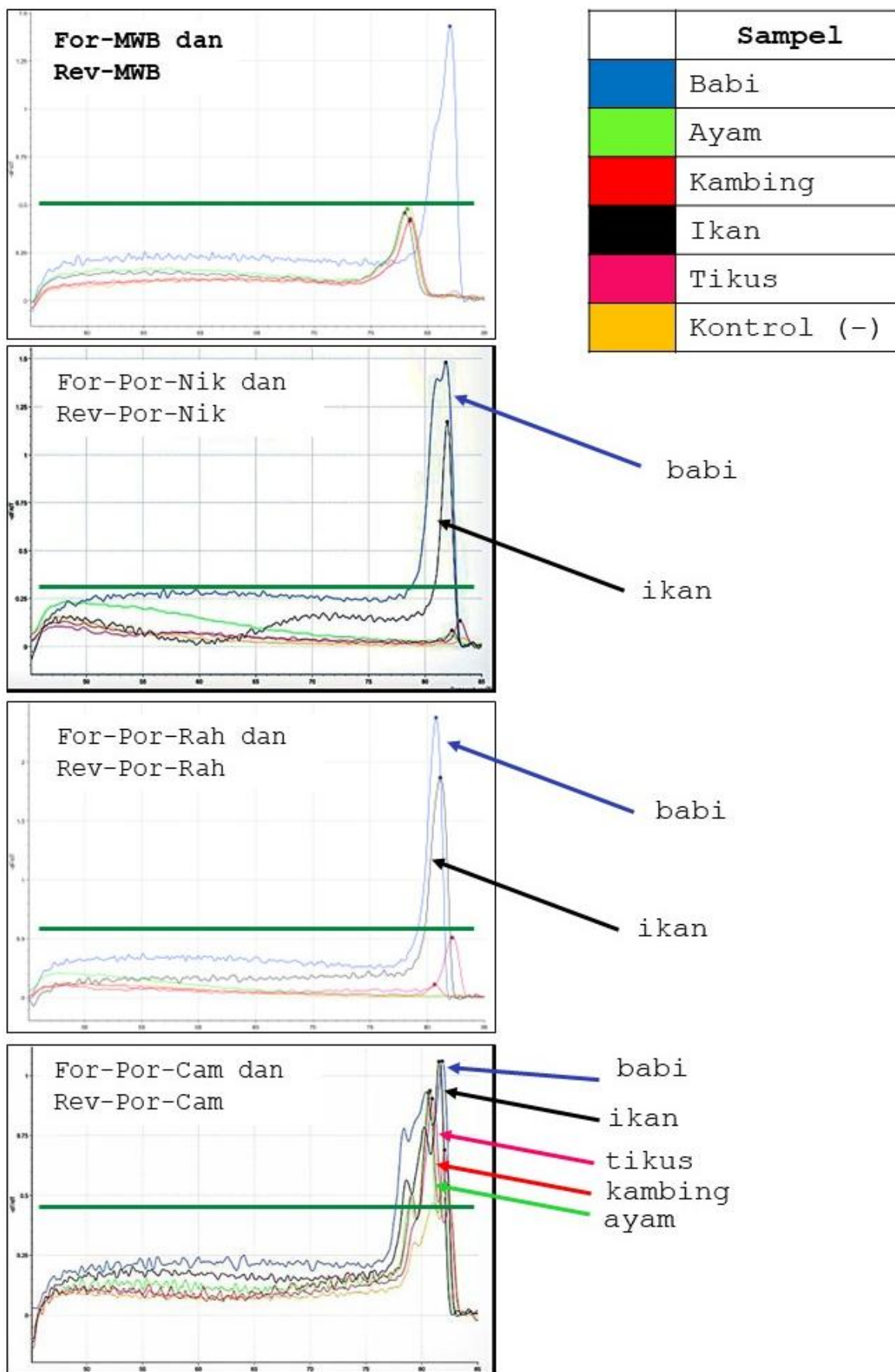
Klaim

1. Primer untuk mendeteksi DNA babi dalam sampel berupa urutan basa nukleotida dari sepasang primer deoksiribonukleotida (DNA), terdiri dari:
 - a. For-MWB: ACACGCGCATATAAGCAGGT, dan
 - b. Rev-MWB: GTGCCTGCTTTCGTAGCACGTATT.

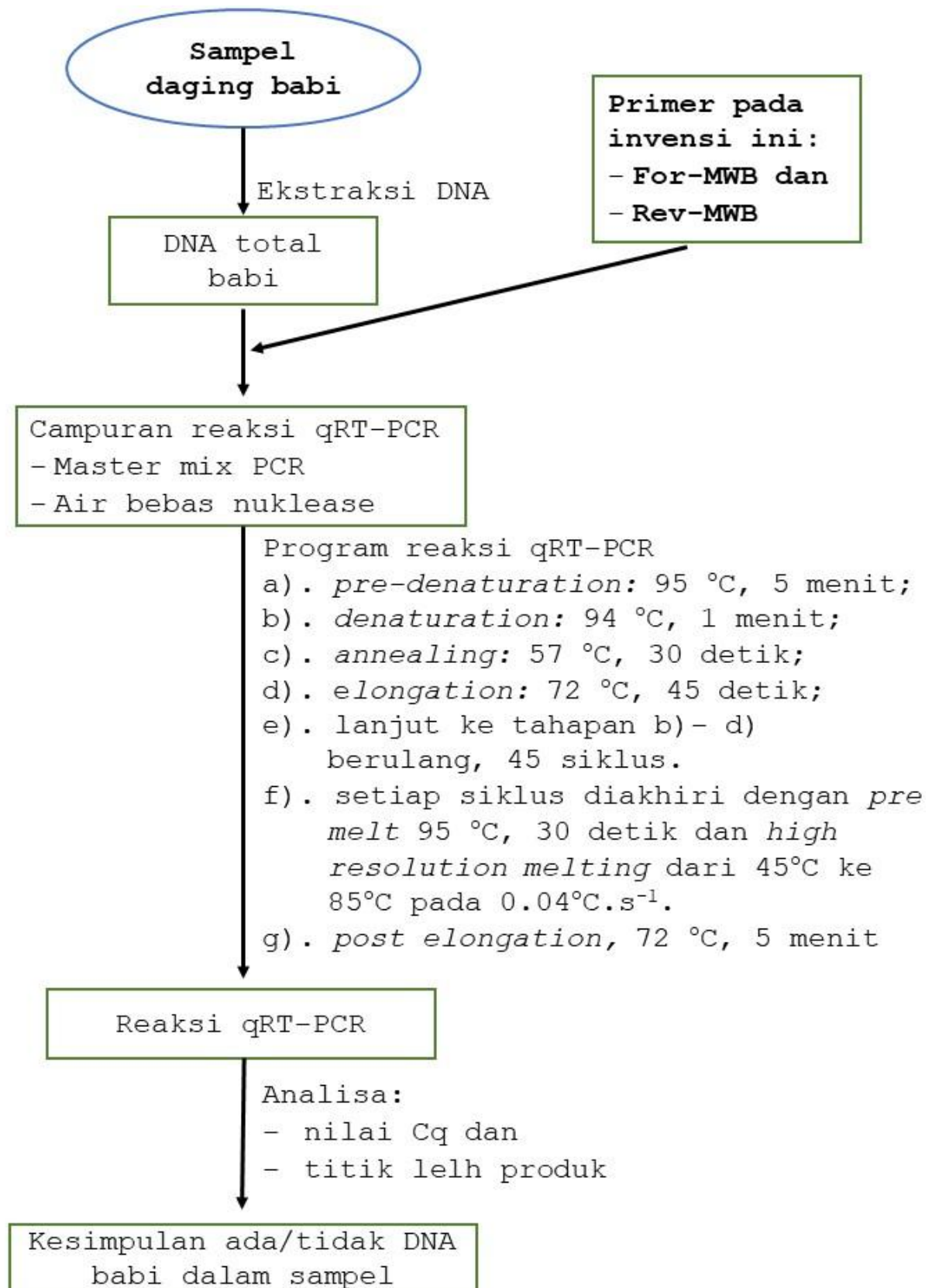
2. Primer untuk mendeteksi DNA babi dalam sampel sesuai dengan klaim 1 dimana primer dapat diterapkan sebagai salah satu komponen reaksi PCR termasuk qRT-PCR untuk analisa keberadaan DNA babi.

Abstrak**PRIMER UNTUK DETEKSI DNA GENOMIK BABI PADA SAMPEL**

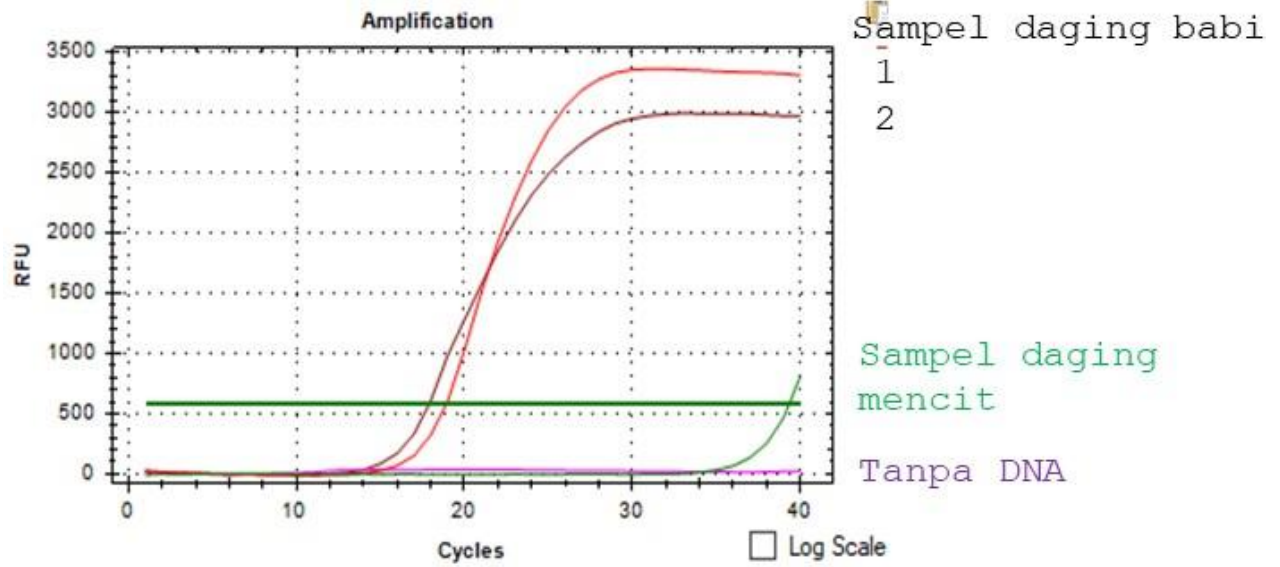
Invensi ini merupakan sepasang primer dengan urutan unik,
5 yang diperlukan sebagai salah satu komponen reaksi RT-PCR untuk
deteksi DNA babi menggunakan alat *real-time polymerase chain
reaction* (RT-PCR). Invensi ini berupa urutan DNA spesifik untuk
genom babi, yaitu: pasangan primer For-MWB: 5'-
ACACGCGCATATAAGCAGGT-3', dan primer Rev-MWB: 5'-
10 GTGCCTGCTTTCGTAGCACGTATT-3'. Pada reaksi PCR atau qRT-PCR,
penerapan primer dengan keberadaan sampel produk mengandung DNA
babi akan membentuk fragmen DNA berukuran 219 bp dengan melting
temperature (T_M) berkisar 79° - 81 °C, sedangkan produk tidak
mengandung DNA babi tidak membentuk produk dengan ukuran seperti
15 target. Pasangan primer For-MWB dan Rev-MWB menunjukkan performa
yang lebih baik dibandingkan pasangan primer peneliti yang lain,
dalam hal sensitivitas lebih tinggi, nilai Cq paling rendah
bahkan dengan kadar DNA babi 0,3 ng/20 uL reaksi, dan
spesifisitas yang paling baik.



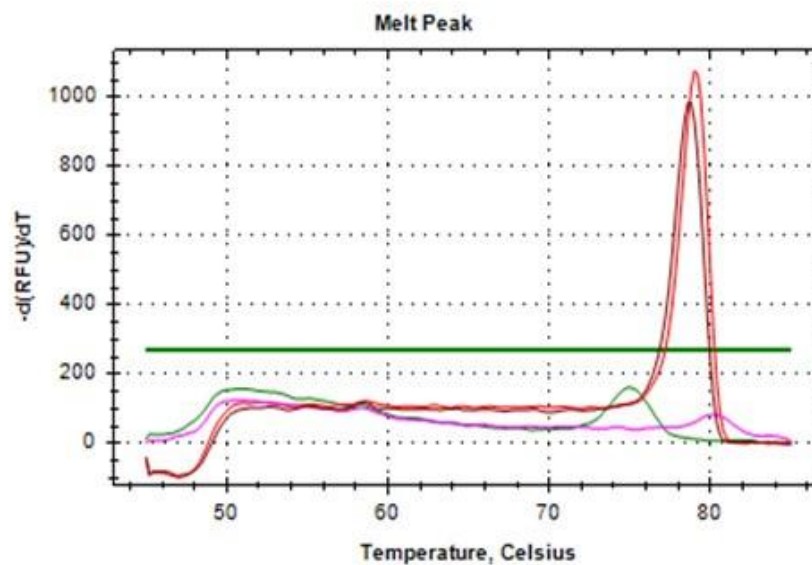
Gambar 2.



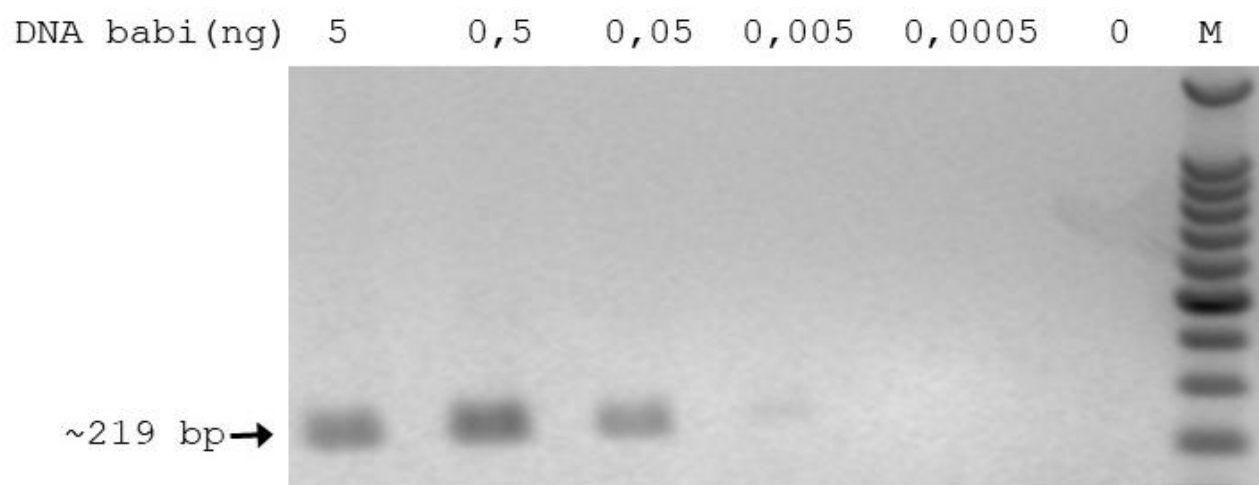
Gambar 3.



Sampel	Cq	T _M
Sampel daging babi 1	17,88	78,80
Sampel daging babi 2	18,90	79,00
Sampel daging mencit	N/A	None
Tanpa DNA	39,33	none



Gambar 4.



Gambar 5.