

(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000056217 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 28 Januari 2019

51) Klasifikasi IPC⁸ : C 12N 5/00
// (C 12N 5:00)

21) No. Permohonan Paten : P00201502158

22) Tanggal Penerimaan: 13 April 2015

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

3) Tanggal Pengumuman: 18 November 2016

3) Dokumen Pemanding:
Walsh, P.S., ET. AL., Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material, *Biotechniques* 30th Anniversary Gem, April 1991, 10(4), pages 506-513
Tsuchimochi, Tsukasa D.D.S., ET. AL., Chelating Resin-Based Extraction of DNA from Dental Pulp and Sex Determination from Incinerated Teeth with Y-Chromosomal Alphoid Repeat and Short Tandem Repeats, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, September 2002, Vol. 23(3), pages 268-271

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
LPPM UNIVERSITAS AIRLANGGA
Universitas Airlangga Kampus C
Mulyorejo Surabaya 60115
INDONESIA

(72) Nama Inventor :
Dr. Pratiwi Soesilawati, drg., MKes, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Nani Nur'aeny, S.Si.

Jumlah Klaim : 3

Judul Invensi : METODE ISOLASI DNA SEL ODONTOBLAS SEBAGAI MATERI IDENTIFIKASI JENIS KELAMIN ANTE MORTEM

Abstrak :

Invensi ini berkaitan dengan metode isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin. Metoda ini terdiri dari isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin ante mortem pada elemen gigi premolar dari tahap tahap eksplorasi sel odontoblas pada ruang pulpa dengan metode *endodontic*. dimana metode *endodontic* adalah cara pengambilan jaringan odontoblast menggunakan jarum *endodontic NiTi*. Isolasi DNA dengan metode Chelex 100, Amplifikasi DNA 30 is dengan primer amelogenin dan elektroforesis menggunakan *agarose polyacrylamide composite* untuk memperjelas jarak pita 106 (X) dan Y). Elektroforesis produk DNA untuk mengetahui besar pasang basa DNA produk PCR

Tujuan dari invensi ini adalah membuktikan bahwa sel odontoblas dapat digunakan sebagai materi identifikasi jenis kelamin

Tujuan selanjutnya mengembangkan metode isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin ante mortem bidang odontologi forensic



(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000056217 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 28 Januari 2019

<p>(51) Klasifikasi IPC⁸ : C 12N 5/00 // (C 12N 5:00)</p> <p>(21) No. Permohonan Paten : P00201502158</p> <p>(22) Tanggal Penerimaan: 13 April 2015</p> <p>(30) Data Prioritas : (31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara</p> <p>(43) Tanggal Pengumuman: 18 November 2016</p> <p>(56) Dokumen Perbandingan: Walsh, P.S., ET. AL., Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material, <i>Biotechniques</i> 30th Anniversary Gem, April 1991, 10(4), pages 506-513 Tsuchimochi, Tsukasa D.D.S., ET. AL., Chelating Resin-Based Extraction of DNA from Dental Pulp and Sex Determination from Incinerated Teeth with Y-Chromosomal Aliphoid Repeat and Short Tandem Repeats, <i>The American Journal of Forensic Medicine and Pathology</i>, September 2002, Vol. 23(3), pages 268-271</p>	<p>(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten : LPPM UNIVERSITAS AIRLANGGA Universitas Airlangga Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 INDONESIA</p> <p>(72) Nama Inventor : Dr. Pratiwi Soesilawati, drg., MKes, ID</p> <p>(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :</p> <p>Pemeriksa Paten : Nani Nur'aeny, S.Si.</p> <p>Jumlah Klaim : 3</p>
--	---

(54) Judul Invensi : METODE ISOLASI DNA SEL ODONTOBLAS SEBAGAI MATERI IDENTIFIKASI JENIS KELAMIN ANTE MORTEM

(57) Abstrak :

Invensi ini berkaitan dengan metode isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin, dimana metode ini terdiri dari isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin ante mortem pada elemen gigi premolar terdiri dari tahap tahap eksplorasi sel odontoblas pada ruang pulpa dengan metode *endodontic*. dimana metode *endodontic* adalah cara pengambilan jaringan odontoblast menggunakan jarum *endodontic NiTi*. Isolasi DNA dengan metode Chelex 100, Amplifikasi DNA 30 siklus dengan primer amelogenin dan elektroforesis menggunakan *agarose polyacrylamide composite* untuk memperjelas jarak pita 106 (X) dan 112(Y). Elektroforesis produk DNA untuk mengetahui besar pasang basa DNA produk PCR

Tujuan dari invensi ini adalah membuktikan bahwa sel odontoblas dapat digunakan sebagai materi identifikasi jenis kelamin

Tujuan selanjutnya mengembangkan metode isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin ante mortem dalam bidang odontologi forensic

Deskripsi**METODE ISOLASI DNA SEL ODONTOBLAS SEBAGAI MATERI
IDENTIFIKASI JENIS KELAMIN ANTE MORTEM**

5

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berkaitan dengan metode eksplorasi DNA dari sel odontoblas yang berada di dalam ruang pulpa gigi sebagai materi identifikasi jenis kelamin *ante mortem*.

10

Latar Belakang Invensi

Pemeriksaan melalui gigi telah menjadi titik penentu untuk identifikasi korban dalam bidang forensik bila identifikasi positif tidak dapat dilakukan karena kerusakan jaringan tubuh yang parah. Beberapa tahun terakhir, seiring kemajuan analisa genetik, penentuan jenis kelamin menggunakan teknik analisa DNA semakin berkembang dan telah diterapkan pada beberapa sampel forensik, termasuk diantaranya sampel gigi. Penggunaan gigi sebagai sumber penting analisa forensik dengan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) atau metode yang lain telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti. Kendala utama penggunaan gigi sebagai sumber bahan adalah DNA didapat dalam jumlah kecil dan metode untuk mengambil DNA dari gigi membutuhkan waktu dan biaya besar. Pemeriksaan gigi dalam odontologi forensik berdasar pada kemampuan gigi yang tidak mengalami perubahan *post mortem*, dan tidak terpengaruh oleh faktor *eksogen*, misalnya trauma atau kebakaran. Pemilihan organ yang akan diisolasi DNA guna analisis kasus forensik sangatlah penting. Pada keadaan yang sudah lanjut membusuk atau apabila hanya tinggal tulang belulang , maka hanya tulang dan gigi saja yang masih dapat diperiksa.

30

DNA pada gigi terdapat dalam jumlah besar di ruang pulpa, dentin dan sementum. Jaringan lunak di ruang pulpa

An

terdiri dari odontoblas, fibroblas, sel endotel, sel saraf perifer, sel mesenkimal yang tidak berdeferensiasi dan komponen darah yang tak berinti.

Protein penting yang berperan dalam penentuan jenis kelamin melalui gigi adalah Amelogenin, salah satu protein matriks mayor yang disekresi oleh ameloblast dari enamel. Gen amelogenin mengkode protein yang terletak pada kromosom X dan Y pada manusia. Manusia memiliki kromosom heteromorfik yang menentukan jenis kelamin saat perkembangan embrio. Pada wanita ditandai dengan kromosom XX, dan pada pria terdapat kromosom XY.

Pada identifikasi jenis kelamin hasil isolasi jaringan pulpa gigi dengan teknik PCR, terlihat gambaran spesifik X pada 106 pasang basa dan Y 112 pasang basa. Bila individu berjenis kelamin pria (XY) maka pada pemeriksaan terlihat gambaran 2 pita yaitu pita 106 pasang basa dan 112 pasang basa, dan bila berjenis kelamin wanita (XX) hanya terlihat gambaran sebuah pita yaitu pita 112 pasang basa.

Metode isolasi DNA dari sampel gigi yang selama ini dilakukan untuk pemeriksaan forensic, umumnya mengandalkan perolehan DNA dari sel darah yang terdapat pada pembuluh darah di pulpa. Kekurangan metode ini adalah kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan sangat rendah sehingga menyulitkan pemeriksaan genetika molekuler berbasis *Polymerase Chain Reaction*. Maka diperlukan metode alternative isolasi DNA odontoblast untuk menjamin perolehan kualitas dan kuantitas DNA yang lebih baik dibanding metode sebelumnya.

Invensi yang diajukan ini meliputi metode penentuan jenis kelamin ante mortem berdasar isolasi DNA sel odontoblas. Amplifikasi gen amelogenin dari DNA sel odontoblas terbukti mampu memberikan informasi jenis kelamin ante mortem personal dalam identifikasi forensik

Ringkasan Invensi

Tujuan dari invensi ini adalah membuktikan bahwa sel odontoblas dapat digunakan sebagai materi identifikasi jenis kelamin

- 5 Tujuan selanjutnya mengembangkan metode isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin *ante mortem* dalam bidang *odontologi forensic*, dimana metode ini terdiri dari isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin *ante mortem* pada elemen gigi
- 10 premolar terdiri dari tahap tahap eksplorasi sel odontoblas pada ruang pulpa dengan metode *endodontic*. dimana metode *endodontic* adalah cara pengambilan jaringan odontoblast menggunakan jarum *endodontic NiTi*. Isolasi DNA dengan metode Chelex , Amplifikasi DNA 30 cycles dengan primer
- 15 amelogenin dan elektroforesis menggunakan *agarose polyacrylamide composite* untuk memperjelas jarak pita 106 (X) dan 112(Y).Elektroforesis produk DNA untuk mengetahui besar pasang basa DNA produk PCR

20 Uraian singkat Gambar

Gambar 1 adalah Sel odontoblas pada dinding pulpa. (pembesaran100x,koleksi pribadi)

- Gambar 2 adalah nomor 1,9,10,11 pita terletak pada 106 pasang basa dan 112 pasang basa yang berarti sampel
- 25 berjenis kelamin pria. Nomor 5 dan 12 adalah marker, nomor 3,4,6,8. tampak pita terletak pada 106 pasang basa yang berarti sampel berjenis kelamin wanita. Nomor 7 adalah kontrol pria.

30 Uraian Lengkap Invensi

Sumber yang kaya DNA pada gigi adalah pulpa gigi. Pulpa terlindung jaringan keras yang mampu menjaganya dari pengaruh panas. Gigi mampu bertahan pada temperatur antara 150 °C- 450 °C, kekuatan ini disebabkan oleh kandungan

bahan anorganik gigi, yang mudah dipisahkan untuk kepentingan penelitian. Walaupun kecil, gigi tidak mungkin rusak saat tubuh mengalami degenerasi sehingga merupakan material yang sangat berguna dalam bidang forensik. Isolasi DNA melalui tindakan endodontik adalah teknik yang paling mudah dan menghasilkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang cukup baik untuk analisa genetika molekuler.

Letak jaringan pulpa dilindungi oleh enamel dan dentin, menyebabkan jaringan ini tidak terpengaruh oleh perubahan temperatur yang tinggi, misalnya pada kasus kebakaran. Penelitian pada korban pembunuhan dengan pembakaran, membuktikan penentuan jenis kelamin dapat dilakukan melalui isolasi DNA dari pulpa gigi. Pulpa gigi yang terpapar kenaikan temperatur sampai 100 °C selama 15 menit, masih dapat digunakan untuk penentuan jenis kelamin dengan kebenaran 100%, sedangkan pada gigi yang tertanam dalam tulang, pulpa gigi tidak terpengaruh oleh temperatur sampai 250 °C.

Ekstraksi DNA dari jaringan gigi, umumnya menggunakan jaringan pulpa gigi. Karena jaringan ini kaya pembuluh darah dan sel odontoblast.

Pada penelitian ini, peneliti menggunakan cara perolehan DNA dengan tindakan endodontik. 8 sampel elemen gigi molar dilakukan preparasi gigi untuk mendapatkan *orifice* dari saluran akar. Selanjutnya dengan menggunakan jarum ekstirpasi dan reamer NiTi, seluruh sel odontoblas pada bagian tepi ruang pulpa dikeluarkan, hingga didapatkan sampel jaringan pulpa dan odontoblas sebanyak 5 mg. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA dengan metode *Chelex 100*. Sampel pulpa gigi ditempatkan dalam tabung *polypropilene*, ditambahkan *Chelex 100*, dan dilakukan pemanasan disertai sonikasi. Selanjutnya sampel disentrifugasi untuk memecah DNA. Pada tahap ini, *Chelex 100* berfungsi untuk mengikat DNA. Untuk mendapatkan DNA, sampel dipanaskan selama 10-15

menit. DNA yang didapat pada tahap ini masih terikat pada *Chelex 100*. Untuk memisahkan DNA dengan *Chelex*, dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang dihasilkan setelah centrifugasi inilah yang digunakan
5 untuk pemeriksaan genetika molekuler melalui *Polymerase Chain Reaction*.

Kemurnian dan kadar DNA ditentukan dengan evaluasi absorpsi panjang gelombang 260 nm dan 280 nm menggunakan *UV Spectrophotometer*. DNA yang telah diisolasi dengan Metode
10 *Chelex 100* dianalisis dengan *Polymerase Chain Reaction* menggunakan *Tag Polymerase* dan *Primer Amelogenin*, digandakan sebanyak 30 siklus. Selanjutnya hasil PCR dielektroforesis pada *Agarose Poliacrylamide Composite Gel*.

Pembacaan hasil amplifikasi *Polymerase Chain Reaction*
15 menggunakan elektroforesis adalah teknik yang tepat untuk menentukan berat molekul dan memisahkan makromolekul. Visualisasi hasil elektroforesis dapat diamati diatas sinar ultra violet dengan bantuan pengecatan *Silver Staining* . Keunggulan pengecatan yang dilakukan setelah elektroforesis
20 adalah mencegah kemungkinan kerusakan DNA dan kerusakan akibat migrasi. *Silver staining* dapat diterapkan untuk pengecatan DNA pada *Agarose Poliacrylamide Composite Gel*, sehingga meningkatkan visualisasi penentuan jenis kelamin melalui analisa *Polymerase Chain Reaction* yang lebih mudah
25 dan relatif murah dibanding *staining kit* komersial. Metode *silver staining* pada gel agarosa ini akan memperjelas separasi dan sensitivitas sebesar 2,5 kali lebih sensitif dipitaing pengecatan menggunakan *ethidium bromide*.

Bila individu berjenis kelamis pria (XY) maka pada
30 pemeriksaan terlihat gambaran 2 pita yaitu pita 106 pasang basa dan pita 112 pasang basa. Bila berjenis kelamin wanita terlihat gambaran sebuah pita yaitu 106 pasang basa.

Beda 6 pasang basa antara pita X spesifik dan Y spesifik terjadi sebagai akibat adanya delesi 6 pasang basa pada intron pertama X homolog gen amelogenin.

5 Gambar 1. menunjukkan hasil amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* sebanyak 30 siklus pada sampel DNA odontoblast menggunakan primer amelogenin. Pada gambar ini tampak kromosom X yang terletak pada 106 pasang basa, dan kromosom Y pada 112 pasang basa.

10 Analisa data amelogenin dilakukan untuk mengetahui keakuratan dari metode isolasi DNA sel odontoblas. Data dapat diolah dengan cara membandingkan hasil yang sesuai dengan jumlah sampel keseluruhan pada tiap - tiap kelompok, kemudian dikalikan persentase. Dengan cara ini diperoleh data dalam bentuk persentase. Hasil dari amplifikasi gen
15 amelogenin ini sesuai dengan jenis kelamin sampel pada data awal sampel dengan ketepatan sebesar 100%

20

25

30

Klaim

1. Suatu metode isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin ante mortem pada elemen gigi premolar terdiri dari tahap tahap :
 - a. eksplorasi sel odontoblas pada ruang pulpa dengan metode endodontic
 - b. Isolasi DNA sel odontoblast dengan metode Chelex 100
 - c. Amplifikasi DNA 30 siklus dengan primer amelogenin
 - d. Elektroforesis produk DNA untuk mengetahui besar pasang basa DNA produk PCR
2. Suatu metode isolasi DNA sesuai klaim 1, dimana metode endodontic adalah cara pengambilan jaringan odontoblast menggunakan jarum *endodontic NiTi*
3. Suatu metode isolasi DNA sesuai klaim 1, dimana elektroforesis menggunakan *agarose polyacrylamide composite* untuk memperjelas jarak pita 106 pasang basa (X) dan 112 pasang basa (Y)

Abstrak**METODE ISOLASI DNA SEL ODONTOBLAS SEBAGAI MATERI
IDENTIFIKASI JENIS KELAMIN**

5

Invensi ini berkaitan dengan metode isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin. dimana metode ini terdiri dari isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin ante mortem pada elemen gigi premolar terdiri dari tahap tahap eksplorasi sel odontoblas pada ruang pulpa dengan metode *endodontic*. dimana metode *endodontic* adalah cara pengambilan jaringan odontoblast menggunakan jarum *endodontic NiTi*. Isolasi DNA dengan metode *Chelex 100*, Amplifikasi DNA 30 siklus dengan primer amelogenin dan elekforesis menggunakan *agarose polyacrylamide composite* untuk memperjelas jarak pita 106 (X) dan 112(Y). Elektroforesis produk DNA untuk mengetahui besar pasang basa DNA produk PCR

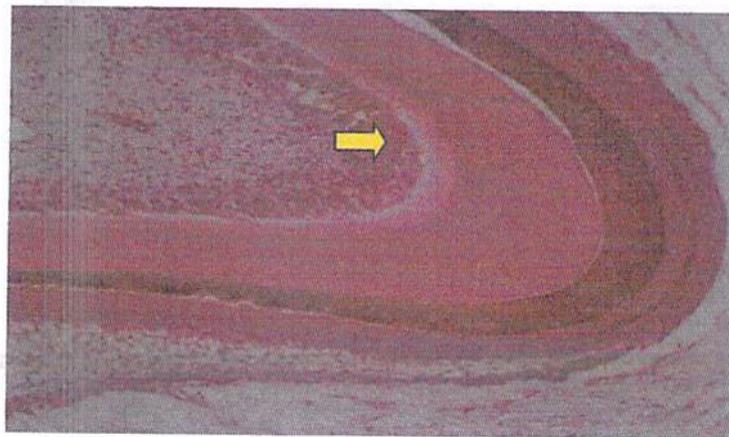
10
15
20 Tujuan dari invensi ini adalah membuktikan bahwa sel odontoblas dapat digunakan sebagai materi identifikasi jenis kelamin

25 Tujuan selanjutnya mengembangkan metode isolasi DNA sel odontoblas sebagai materi identifikasi jenis kelamin ante mortem dalam bidang odontologi forensic

30

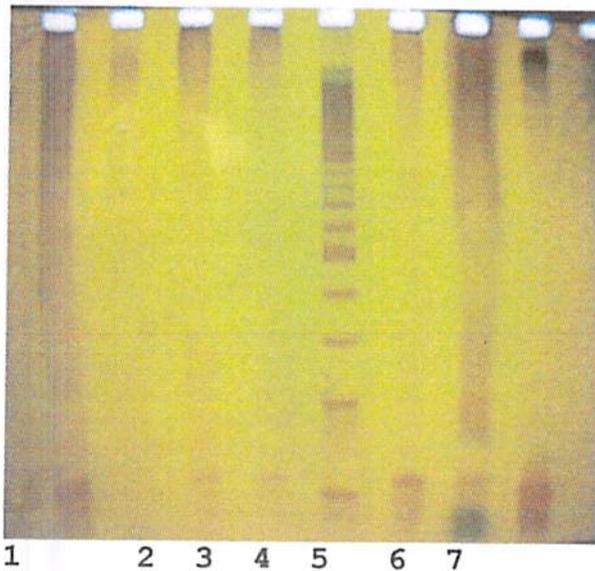
35

35



Gambar 1. Sel odontoblas pada dinding pulpa. (pembesaran 100x, koleksi pribadi)

5



Gambar 2. tampak pada nomor 1,9,10,11 pita terletak pada 106 basepair dan 112 basepair yang berarti sampel berjenis kelamin pria. Nomor 5 dan 12 adalah marker, nomor 3,4,6,8. tampak pita terletak pada 106 basepair yang berarti sampel berjenis kelamin wanita. Nomor 7 adalah kontrol pria.

15