



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 : UNIVERSITAS AIRLANGGA
Kampus C Unair Jl. Mulyorejo,
Surabaya, Jawa Timur 60115

Untuk Inovasi dengan Judul : METODE ISOLASI DNA GENOMIK DARI STAIN SALIVA
MELALUI PENGENALAN ENZIM α -AMILASE UNTUK
IDENTIFIKASI JENIS KELAMIN

Inventor : Dr. Pratiwi Soesilawati, drg., MKes., PA(K)
Dr. Agung Sosiawan., drg., Mkes

Tanggal Penerimaan : 22 Desember 2016

Nomor Paten : IDP000065907

Tanggal Pemberian : 30 Desember 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

KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA RI
DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
DIREKTORAT PATEN, DESAIN TATA LETAK SIRKUIT TERPADU DAN RAHASIA DAGANG
 Jln. H.R. Rasuna Said, Kav. 8-9 Kuningan Jakarta Selatan 12940
 Phone/Facs. (6221) 57905611; Website: www.dgip.go.id

PEMBAYARAN BIAYA TAHUNAN (UMKM)

Berdasarkan Peraturan Pemerintah Nomor 28 tahun 2019 tentang Jenis dan Tarif Atas Jenis Penerimaan Negara Bukan Pajak Yang Berlaku Pada Kementerian Hukum dan Hak Asasi Manusia, biaya tahunan yang harus dibayarkan adalah sebagaimana dalam tabel di bawah.

Nomor Paten : IDP000065907 Tanggal diberi : 30/12/2019 Jumlah Klaim : 3
 Nomor Permohonan : P00201608900 IPAS Filing Date : 22/12/2016
 Entitlement Date : 22/12/2016

Perhitungan biaya tahunan yang sudah dibayarkan adalah :

Biaya Tahunan Ke	Periode Perlindungan	Batas Akhir Pembayaran	Tgl Pembayaran	Jumlah Pembayaran	Keterangan
No record available					

Perhitungan biaya tahunan yang belum dibayarkan adalah :

Biaya Tahunan Ke-	Periode Perlindungan	Batas Akhir Pembayaran	Biaya Dasar	Jml Klaim	Biaya Klaim	Total	Tertambat (Bulan)	Total Denda	Jumlah Pembayaran
1	22/12/2016-21/12/2017	29/06/2020	0	3	0	0	0	0	0
2	22/12/2017-21/12/2018	29/06/2020	0	3	0	0	0	0	0
3	22/12/2018-21/12/2019	29/06/2020	0	3	0	0	0	0	0
4	22/12/2019-21/12/2020	29/06/2020	0	3	0	0	0	0	0
5	22/12/2020-21/12/2021	29/06/2020	0	3	0	0	0	0	0
6	22/12/2021-21/12/2022	23/11/2021	1.500.000	3	450.000	1.950.000	0	0	1.950.000
7	22/12/2022-21/12/2023	23/11/2022	2.000.000	3	600.000	2.600.000	0	0	2.600.000
8	22/12/2023-21/12/2024	23/11/2023	2.000.000	3	600.000	2.600.000	0	0	2.600.000
9	22/12/2024-21/12/2025	23/11/2024	2.500.000	3	750.000	3.250.000	0	0	3.250.000
10	22/12/2025-21/12/2026	23/11/2025	3.500.000	3	750.000	4.250.000	0	0	4.250.000
11	22/12/2026-21/12/2027	23/11/2026	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
12	22/12/2027-21/12/2028	23/11/2027	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
13	22/12/2028-21/12/2029	23/11/2028	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
14	22/12/2029-21/12/2030	23/11/2029	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
15	22/12/2030-21/12/2031	23/11/2030	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
16	22/12/2031-21/12/2032	23/11/2031	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
17	22/12/2032-21/12/2033	23/11/2032	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
18	22/12/2033-21/12/2034	23/11/2033	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
19	22/12/2034-21/12/2035	23/11/2034	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000
20	22/12/2035-21/12/2036	23/11/2035	5.000.000	3	750.000	5.750.000	0	0	5.750.000

Biaya yang belum dibayarkan hingga tanggal 27-01-2020(tahun ke- 5) adalah sebesar Rp. 0 -.

- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali wajib dilakukan paling lambat 6 (enam) bulan terhitung sejak tanggal diberi paten
- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali meliputi biaya tahunan untuk tahun pertama sejak tanggal penerimaan sampai dengan tahun diberi Paten ditambah biaya tahunan satu tahun berikutnya.
- Pembayaran biaya tahunan selanjutnya dilakukan paling lambat 1 (satu) bulan sebelum tanggal yang sama dengan Tanggal Penerimaan pada periode perlindungan tahun berikutnya.
- Permohonan penundaan pembayaran biaya tahunan akan diterima apabila diajukan paling lama 7 hari kerja sebelum tanggal jatuh tempo pembayaran biaya tahunan berikutnya, dan bukan merupakan pembayaran biaya tahunan pertama kali.
- Dalam hal biaya tahunan belum dibayarkan sampai dengan jangka waktu yang ditentukan, Paten dinyatakan dihapus

(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000065907 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 30 Desember 2019

(51) Klasifikasi IPC⁸ : C 12N 15/10, C 12N 15/00
// (C 12N 15:00, 15:10)

(71) No. Permohonan Paten : P00201608900

(72) Tanggal Penerimaan: 22 Desember 2016

Data Prioritas :

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

Tanggal Pengumuman: 29 Juni 2018

Dokumen Pembanding:

valuation of amylase testing as a tool for saliva screening of crime scene trace swabs, Johannes Hedman dkk, Volume 5, halaman 1-198, Juni 2011.

Identifikasi bite marks dengan ekstraksi DNA metode Chelex, da Kristina Sutrisno dkk, Dental Journal, Volume 46 number 2, Juni 2013.

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

(72) Nama Inventor :
Dr. Pratiwi Soesilawati, drg., MKes., PA(K), ID
Dr. Agung Sosiawan, drg., MKes, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Dra. Johani Siregar

Jumlah Klaim : 3

(54) Invensi : METODE ISOLASI DNA GENOMIK DARI STAIN SALIVA MELALUI PENGENALAN ENZIM α -AMILASE UNTUK IDENTIFIKASI JENIS KELAMIN

(57) :
ini berkaitan dengan DNA genomik yang diisolasi dari saliva menggunakan pengenalan α -amilase sehingga dapat digunakan pada uji lokasi Amelogenin. Sampel saliva diambil dari 6 pria dan wanita sukarelawan, sehat, berusia 22-35 tahun, setidaknya 1 jam tidak makan atau minum selain air. Semua sampel diperoleh pada 10.00 WIB, karena aktivitas amilase diketahui bervariasi sepanjang hari. Aktivitas α -amilase diukur dengan menggunakan tes *Phadebas Forensic Press test* mengikuti instruksi dari pabrik. Antara aktivitas α -amilase saliva dan konsentrasi DNA saliva dianalisa menggunakan uji korelasi Spearman rank. Sebagai kontrol, darah vena perifer (10 ml) dikoleksi menggunakan teknik standar dalam tabung yang berisi 250 ml EDTA (0,5 M, pH 7,4). Ada korelasi antara aktivitas α -amilase dan jumlah DNA dalam saliva. α -amilase positif menunjukkan adanya saliva, dan dapat isolasi DNA. Hasil isolasi DNA ini selanjutnya berguna untuk bahan pemeriksaan jenis kelamin dan pemeriksaan paternitas ante mortem pada bidang forensik molekuler.



(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000065907 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 30 Desember 2019

(51) Klasifikasi IPC⁸ : C 12N 15/10, C 12N 15/00
// (C 12N 15:00, 15:10)

(21) No. Permohonan Paten : P00201608900

(22) Tanggal Penerimaan: 22 Desember 2016

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

(43) Tanggal Pengumuman: 29 Juni 2018

(56) Dokumen Pemandangan:
Evaluation of amylase testing as a tool for saliva screening of crime scene trace swabs, Johannes Hedman dkk, Volume 5, halaman 194-198, Juni 2011.
Identifikasi bite marks dengan ekstraksi DNA metode Chelex, Imelda Kristina Sutrisno dkk, Dental Journal, Volume 46 number 2, 2 Juni 2013.

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

(72) Nama Inventor :
Dr. Pratiwi Soesilawati, drg., MKes., PA(K), ID
Dr. Agung Sosiawan., drg., MKes, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Dra. Johani Siregar

Jumlah Klaim : 3

(54) Judul Invensi : METODE ISOLASI DNA GENOMIK DARI STAIN SALIVA MELALUI PENGENALAN ENZIM α -AMILASE UNTUK IDENTIFIKASI JENIS KELAMIN

(57) Abstrak :

Invensi ini berkaitan dengan DNA genomik yang diisolasi dari saliva menggunakan pengenalan α -amilase sehingga dapat digunakan pada amplifikasi lokus Amelogenin. Sampel saliva diambil dari 6 pria dan wanita sukarelawan, sehat, berusia 22-35 tahun, setidaknya 1 jam setelah makan atau minum minuman selain air. Semua sampel diperoleh pada 10.00 WIB, karena aktivitas amilase diketahui bervariasi pada siang hari. Aktivitas α -amilase diukur dengan menggunakan tes *Phadebas Forensic Press test* mengikuti instruksi dari pabrik. Korelasi antara aktivitas α -amilase saliva dan konsentrasi DNA saliva dianalisa menggunakan uji korelasi Spearman rank. Sebagai kelompok kontrol, darah vena perifer (10 ml) dikoleksi menggunakan teknik standar dalam tabung yang berisi 250 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0). Tidak ada korelasi antara aktivitas α -amilase dan jumlah DNA dalam saliva. α -amilase positif menunjukkan adanya saliva, dan dapat dilakukan isolasi DNA. Hasil isolasi DNA ini selanjutnya berguna untuk bahan pemeriksaan jenis kelamin dan pemeriksaan paternitas ante mortem pada bidang forensik molekuler.

Deskripsi

**METODE ISOLASI DNA GENOMIK DARI STAIN SALIVA MELALUI
PENGENALAN ENZIM α -AMILASE UNTUK IDENTIFIKASI JENIS
KELAMIN**

5

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berkaitan dengan metode isolasi DNA genomik dari stain saliva melalui pengenalan enzim α -amylase pada stain saliva. Selanjutnya, pengenalan enzim α -amylase pada stain saliva digunakan sebagai materi ekstraksi DNA genomik untuk identifikasi jenis kelamin paternitas pada bidang forensik molekuler pada lokus amelogenin dan lokus D21S11.

15

Latar Belakang Invensi

Deteksi forensik dari saliva manusia adalah materi yang sangat berguna dalam suatu investigasi kriminal. Saliva dapat digunakan sebagai sumber DNA dari pelaku, karena saliva mengandung sel epitel yang berasal dari duktus salivarius. Telah diketahui bahwa DNA terdapat dalam kuantitas yang memadai untuk analisis forensik pada inti sel yang besar. Hal ini menjadikan saliva sebagai sumber DNA yang potensial.

25

DNA sebagai struktur fundamental dari kehidupan memiliki keunikan yang berbeda pada tiap individu sehingga mengandung informasi yang berbeda. DNA dapat diperoleh dari berbagai material biologis, meliputi saliva, darah, semen, atau cairan biologi lainnya (Ninad, 2012). Saliva sebagai salah satu materi biologis memiliki fungsi diagnostik yang tinggi. Pengumpulan *whole saliva* dapat dilakukan secara non invansif, tidak memerlukan kemampuan khusus, harga yang terjangkau jika digunakan pada populasi yang besar, serta tidak memerlukan alat

khusus untuk pengumpulan cairan. Cara ini dinilai jauh lebih efektif jika dibandingkan dengan pengumpulan darah

Identifikasi α -amilase dalam sampel forensik adalah langkah yang sangat penting sebelum melakukan pemeriksaan DNA. α -amilase diperoleh dalam jumlah besar di dalam cairan atau noda saliva yang menunjukkan adanya saliva beserta sel-sel berinti dalam saliva, yang dapat menunjukkan keberhasilan untuk deteksi DNA. α -amylase diproduksi dalam kelenjar saliva dan secara fisiologis berperan dalam proses pencernaan

Profiling untuk lokus *Short Tandem repeat* (STR) dan *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR) secara rutin dilakukan di bidang odontologi forensik. Protokol genotyping terdiri dari ekstraksi DNA dari sampel biologis, kuantifikasi DNA, amplifikasi lokus, elektroforesis, dan analisis hasil. Dua dekade terakhir telah tercapai kemajuan dalam pengembangan teknologi baru untuk analisis STR dan VNTR. Berbagai sampel biologis yang berasal dari rongga mulut diketahui sebagai sumber DNA yang potensial untuk perkembangan odontologi forensik molekuler.

Berbagai penelitian di bidang forensik telah menemukan beberapa sampel biologis yaitu noda darah, saliva atau sperma pada berbagai permukaan tubuh korban kriminal, swab kulit, rambut, tulang, dan kuku. Sampel biologis tersebut umumnya telah terpapar berbagai dampak perubahan lingkungan.

DNA dalam sel mengandung sejumlah komponen fisiologis dan makromolekul untuk melindungi DNA secara *in vivo*. Jika bagian ini tidak hilang selama prosedur ekstraksi DNA, materi ini akan sangat berguna pada analisis selanjutnya misalnya analisis Polymerase Chain Reaction (PCR). Oleh karena itu, prosedur ekstraksi DNA

yang efisien sangat menentukan keberhasilan pemeriksaan forensik molekuler. (Butler, 2012)

Secara umum, analisis forensik sangat membutuhkan metodologi ekstraksi yang mudah melalui isolasi DNA dari sampel biologis yang mengandung materi genetik dalam jumlah kecil. Analisis ini membutuhkan pula metode untuk memperoleh DNA pada konsentrasi tinggi sehingga volume ekstrak yang digunakan untuk PCR sangat minimal. (Hedman et al, 2011)

10 Invensi ini bertujuan menyediakan metode ekstraksi DNA pada *stain* saliva melalui pengembangan metode koleksi saliva yaitu penelusuran keberadaan enzim α -amilase pada permukaan kain yang terpapar saliva. Tahapan yang dilakukan adalah pertama: modulasi koleksi saliva melalui
15 pengenalan enzim α -amilase pada permukaan kain. Jika telah diketahui terdapat enzim α -amilase pada daerah tersebut, koleksi saliva dilanjutkan dengan pengambilan *stain* saliva pada daerah yang bersangkutan menggunakan kertas *Phadebas Paper* untuk meningkatkan penyerapan
20 saliva. Ekstraksi DNA genomik dilakukan menggunakan metode fenol-kloroform tanpa kit komersial. Kuantitas ekstraksi DNA selanjutnya diukur menggunakan spectrophotometer pada 260 dan 280nm. Untuk mengetahui keberhasilan ekstraksi DNA, dilakukan amplifikasi DNA
25 untuk memperoleh profil STR menggunakan primer Amelogenin dan profil VNTR menggunakan primer D21S11. Pemilihan dua primer ini berdasar aplikasi primer amelogenin dan D21S11 adalah prosedur standar untuk pemeriksaan paternitas dan *down syndrome*. Invensi ini diharapkan berguna untuk
30 mengembangkan metode koleksi saliva dan meningkatkan kuantitas DNA dari *stain* saliva sehingga membantu dokter gigi forensik dalam melaksanakan tugasnya.

Ringkasan Invensi

Tujuan invensi pertama mengungkapkan suatu metode isolasi DNA dari sumber stain saliva sebagai materi identifikasi jenis kelamin ante mortem terdiri dari tahap tahap :

- 5 a. Eksplorasi inti sel epitel duktus salivarius yang terlarut dalam saliva sebanyak 8 μ l dan 32 μ l,
- b. Isolasi DNA inti sel dengan metode fenol-kloroform,
- c. Amplifikasi DNA 35 siklus dengan primer amelogenin
10 5'CTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG 3' dan
 5'ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG 3'
- d. Elektroforesis produk DNA menggunakan Agarose
 Poliacrylamide Composite Gel menghasilkan pasang
 basa produk PCR amelogenin sebesar 106 bp (X) dan
 112 bp (Y).

15

Tujuan invensi kedua merupakan tujuan invensi pertama yang dikarakteristik melalui pengenalan enzim α -amylase terhadap stain saliva, diketahui dari perubahan warna akibat reaksi enzim α -amylase pada stain saliva.

20

Tujuan invensi ketiga merupakan tujuan invensi pertama dan kedua dimana stain saliva dapat dimanfaatkan untuk menunjang Identifikasi jenis kelamin melalui amplifikasi pada lokus amelogenin.

25

Uraian Singkat Gambar

Gambar 1, adalah Hasil elektrofloresis amelogenin(a)

Gambar 2, adalah Hasil elektrofloresis amelogenin(b)

Gambar 3, adalah Hasil elektrofloresis lokus D21S11 (a)

30 sesuai invensi ini

Gambar 4, adalah Hasil elektrofloresis lokus D21S11 (b)
sesuai invensi ini

Uraian Lengkap Invensi

Invensi ini menyediakan suatu metode sehingga diperoleh keakuratan pengenalan enzim α -amilase pada stain saliva untuk deteksi keberadaan gen amelogenin dan gen D21S11. Sampel diperoleh dari saliva yang berasal 3 subjek pria dan 3 subjek wanita. Keberadaan enzim α -amilase diamati pada stain saliva yang dibiarkan selama 24 jam. 50 μ l saliva dari tiap sampel dikumpulkan pada medicine cup. Pada seluruh sampel untuk deteksi α -amilase dilakukan pembuatan stain saliva sebesar 32 μ l dan 8 μ l saliva dari tiap sampel. Masing-masing sampel diteteskan pada kain katun 5x5cm, dikeringkan selama 24 jam pada suhu ruang. Dilakukan uji aktivitas amylase menggunakan *Phadebas Forensic Press Test (Magle Life Sciences)*. Stain saliva pada kain katun yang telah kering selanjutnya dikoleksi untuk isolasi DNA. Permukaan kain dengan stain saliva ditutup dengan *Phadebas Forensic Press Test* dengan sisi atas kain katun menempel pada sisi biru *Phadebas Forensic Press test*. 30 ml larutan garam fisiologi ditambahkan ke lokasi stain saliva, dan *Phadebas Forensic Press Test* dibiarkan kering pada suhu kamar. Masing-masing *Phadebas Forensic Press Test* diperiksa perubahan warna setelah 2, 5, 10 dan 20 menit. Keberadaan enzim α -amilase diketahui dengan perubahan warna *Phadebas Forensic Press Test* menjadi biru tua. Perubahan warna umumnya terdeteksi pada kedua sisi *Phadebas Forensic Press Test*. Perubahan warna selanjutnya dinotasikan sebagai :

- "-" (Negatif)
- 30 "+" (positif)
- "+ +" (sangat positif)

Data subjek yang diperoleh dari *Phadebas Forensic Press Test* kemudian disusun dalam Tabel 1, dan diamati hasilnya.

Tabel 1. Hasil Penilaian α -amilase

No	Jenis Kelamin Sampel	Usia	Status Pasien	Konsentrasi Saliva	Hasil Penilaian α -Amilase
1	Perempuan	22 tahun	Sehat	8 μ l	+
				32 μ l	+
2	Perempuan	22 tahun	Sehat	8 μ l	+
				32 μ l	+
3	Perempuan	22 tahun	Sehat	8 μ l	+
				32 μ l	+
4	Pria	22 tahun	Sehat	8 μ l	+
				32 μ l	+
5	Pria	22 tahun	Sehat	8 μ l	+
				32 μ l	+
6	Pria	22 tahun	Sehat	8 μ l	+
				32 μ l	+

5 Dari data di atas, tampak Phadebas paper menunjukkan perubahan warna terhadap penekanan kain katun yang mengandung saliva. Seluruh Phadebas paper menunjukkan hasil + (positif).

10 Untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok sampel dengan konsentrasi 8 μ l dan 32 μ l, dilakukan uji test (Tabel 2). Dari uji t test, didapatkan $p > 0.05$, artinya variasi kedua konsentrasi sama.

Tabel 2. Uji t-test konsentrasi

Konsentrasi Sampel	n	Mean Kadar	SD	Minimal	Maksimal	t test
8 μ l	6	1884.1150	1207.20354	-	1830.98	t=
32 μ l	6	1595.7133	1191.00628	1254.18194	527	0.417 p=0.930

15

Perbedaan yang signifikan mengenai kemurnian DNA pada kelompok sampel 8 μ l dan 32 μ l dapat dianalisa dengan menggunakan uji t-test (Tabel 3).

20

Tabel 3. Uji t-test kemurnian

Kadar Sampel	n	Mean Kadar	SD	Minimal	Maksima l	t test
8 μ l	6	1.7183	0.18649	-	0.2370	t= -
32 μ l	6	1.7500	0.22909			0.263
				0.30037	3	p= 0.326

Uji t-test menunjukkan $p > 0.05$. Hal ini menyatakan kedua kelompok memiliki variasi sama.

- 5 Potongan *Phadebas Forensic Press Test* yang mengandung stain saliva ditampung dalam tabung Eppendorf yang telah berisi 1 ml fenol-kloroform, dilakukan vortex, diinkubasi 5 menit pada suhu kamar dan sonikasi selama 15 menit. Dilakukan sentrifugasi 10.000 g selama 10 menit pada suhu 4 $^{\circ}$ C. Viscous supernatan diambil dan dimasukkan ke tabung baru. Ditambahkan 0,5 ml ethanol absolute (100 %), kemudian inkubasi selama 1-3 menit. Centrifuge 4.000 g selama 1-2 menit pada suhu 4 $^{\circ}$ C, buang supernatan dengan hati-hati agar DNA tidak turut terbang. Cuci pellet dengan ethanol 75% sebanyak 0,8-1 ml, bolak-balik selama 3-6 kali, ulangi sebanyak 2 kali. Letakkan tabung dalam posisi tegak selama 0,5-1 menit, setelah itu buang alcohol 75% dengan cara pippeting. Pellet dikeringkan dengan cara mmembiarkan tabung terbuka selama 5-15 detik sesudah ethanol 75% dibuang. Larutan pellet yang berisi DNA tersebut dicampur larutan Na OH 8 mM sebanyak 0,2-0,3 ml. Vortex secukupnya, kemudian simpan pada suhu -20 $^{\circ}$ C. Dilakukan uji kemurnian DNA yang berasal dari darah dan saliva dengan spektrofotometer dengan menentukan rasio antara nilai OD260 dan OD280 pada sampel DNA. Untuk mengetahui konsentrasi DNA dapat dibaca dengan Spectrophotometer pada OD 260.

Hasil yang muncul dari absorban akan berkaitan dengan konsentrasi dan kemurnian DNA (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil spektrofotometer

No	Jenis Kelamin Sampel	Konsentrasi Saliva	λ 260 (ng)	λ 280 (ng)	Konsentrasi DNA ng/ μ l (λ 260 x 50)	Kemurnian DNA (λ 260 / λ 280)
1	Perempuan	8 μ l	29,250	18,593	1462,52	1,57
		32 μ l	9,324	4,502	466,20	2,07
2	Perempuan	8 μ l	32,123	19,795	1606,17	1,62
		32 μ l	73,193	39,206	3659,66	1,55
3	Perempuan	8 μ l	7,674	3,711	383,71	2,07
		32 μ l	33,191	21,417	1659,55	1,65
4	Pria	8 μ l	80,491	45,630	4024,53	1,76
		32 μ l	36,533	22,091	1826,63	1,65
5	Pria	8 μ l	31,995	20,159	1599,76	1,59
		32 μ l	7,424	3,696	371,22	2,01
6	Pria	8 μ l	44,560	26,255	2228,00	1,70
		32 μ l	31,820	20,299	1591,02	1,57

Ditambahkan pasangan primer amelogenin terhadap DNA yang berasal dari saliva. Pasangan primer yang digunakan adalah 5'CTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG 3' dan 5'ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG 3'.

Reaksi amplifikasi segmen DNA yang terdiri dari denaturasi dengan pemanasan pada suhu 95° C, selama 4 menit. Dilakukan pengulangan sebanyak 35 kali terdiri dari 1 menit pada 95° C, annealing dan extention. Annealing pada suhu 58 °C selama 1 menit. Extention dengan katalis enzim DNA polymerase pada suhu 72°C. Reaksi amplifikasi ini diulang sampai 35 kali putaran. Dilakukan elektroforesis, Band amelogenin tampak pada 106 bp (X) dan 112 bp (Y) menggunakan Agarose Poliacrylamide Composite Gel. Pada sampel wanita, maka band berada pada 106 bp. Pada sampel pria, maka band tampak pada 106 bp dan 112 bp dengan jumlah 2 band seperti terlihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Selanjutnya, data band yang muncul dicocokkan dengan jenis kelamin sampel. Hal ini bertujuan untuk menentukan keakuratan dari hasil amplifikasi.

Tabel 5 Hasil elektrofloresis amelogenin

No	Jenis Kelamin Sampel	Usia	Konsentrasi Saliva	Jumlah band yang muncul
1	Wanita	22 tahun	8 μ l	1 band
			32 μ l	1 band
2	Wanita	22 tahun	8 μ l	1 band
			32 μ l	1 band
3	Wanita	22 tahun	8 μ l	1 band
			32 μ l	1 band
4	Pria	22 tahun	8 μ l	2 band
			32 μ l	2 band
5	Pria	22 tahun	8 μ l	2 band
			32 μ l	2 band
6	Pria	22 tahun	8 μ l	2 band
			32 μ l	2 band

seluruh band yang muncul memiliki keakuratan yang tepat, sesuai dengan jenis kelamin sampel. Keakuratan data menjadi pedoman dalam melakukan analisa data.

Analisa data amelogenin dilakukan untuk mengetahui keakuratan dari metode ini. Data diolah dengan cara membandingkan hasil yang sesuai dengan jumlah sampel keseluruhan pada tiap - tiap kelompok, kemudian dikalikan persentasi. Dengan cara ini diperoleh data dalam bentuk persentasi.

Kelompok 8 μ l

15

$$\frac{6}{6} \times 100\% = 100\%$$

Kelompok 32 μ l

$$\frac{6}{6} \times 100\% = 100\%$$

Hasil dari amplifikasi amelogenin ini sesuai dengan jenis kelamin sampel pada data awal sampel dengan ketepatan sebesar 100%.

20

Amplifikasi DNA dilakukan terhadap lokus D21S11, dengan menambahkan pasangan primer D21S11 pada hasil isolasi DNA stain saliva. Pasangan primer yang digunakan adalah pasangan primer yang digunakan adalah

5' TATGTGAGTCAATTCCCCAAGTGA3' dan

5' GTTGTATTAGTCAATGTTCTCCAG3'.

Reaksi amplifikasi segmen DNA yang terdiri dari denaturasi awal pada 95 °C selama 4 menit diikuti
 5 denaturasi pada 94 °C selama 30 detik, annealing pada 55 °C selama 30 detik, ekstensi pada 65 °C selama 4 menit sebanyak 30 putaran. Langkah ekstensi diperpanjang 7 menit pada suhu 65 °C, suhu dipertahankan pada 4 °C di pendingin.

10 Dilakukan elektroforesis, Band D21S11 tampak pada band dengan range 203 - 259 bp (Gambar 3 dan Gambar 4). Dari data amplifikasi, semua sampel menunjukkan adanya D21S11. Keberadaan D21S11 dapat menjadi pedoman lebih lanjut untuk menentukan paternitas.

15 Analisa data D21S11 dilakukan untuk mengetahui keakuratan dari metode ini. Data diolah dengan cara membandingkan hasil yang sesuai dengan jumlah sampel keseluruhan pada tiap - tiap kelompok, kemudian dikalikan persentasi. Dengan cara ini diperoleh data dalam bentuk
 20 persentasi.

Kelompok 8 u1

$$\frac{6}{6} \times 100\% = 100\%$$

Kelompok 32 u1

$$\frac{6}{6} \times 100\% = 100\%$$

25

Hasil dari lokus D21S11 ini keakuratannya adalah 100% untuk kedua kelompok.

30

Klaim

1. Suatu metode isolasi DNA dari sumber stain saliva yang terdiri dari tahap :
 - a. Eksplorasi inti sel epitel duktus salivarius yang terlarut dalam saliva sebanyak 8 μ l dan 32 μ l,
 - b. Isolasi DNA inti sel dengan metode fenol-kloroform,
 - c. Amplifikasi DNA 35 siklus dengan primer amelogenin
 5'CTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG 3' dan
 5'ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG 3'
 - d. Elektroforesis produk DNA menggunakan *Agarose Poliacrylamide Composite Gel* menghasilkan pasang basa produk PCR amelogenin sebesar 106 bp (X) dan 112 bp (Y).
2. Metode isolasi menurut klaim 1, yang dikarakteristik melalui pengenalan enzim α -amylase terhadap stain saliva, diketahui dari perubahan warna akibat reaksi enzim α -amylase pada stain saliva.
3. Metode Isolasi DNA menurut klaim 1 sampai 2 dimana stain saliva dapat dimanfaatkan untuk menunjang Identifikasi jenis kelamin melalui amplifikasi pada lokus amelogenin.

Abstrak

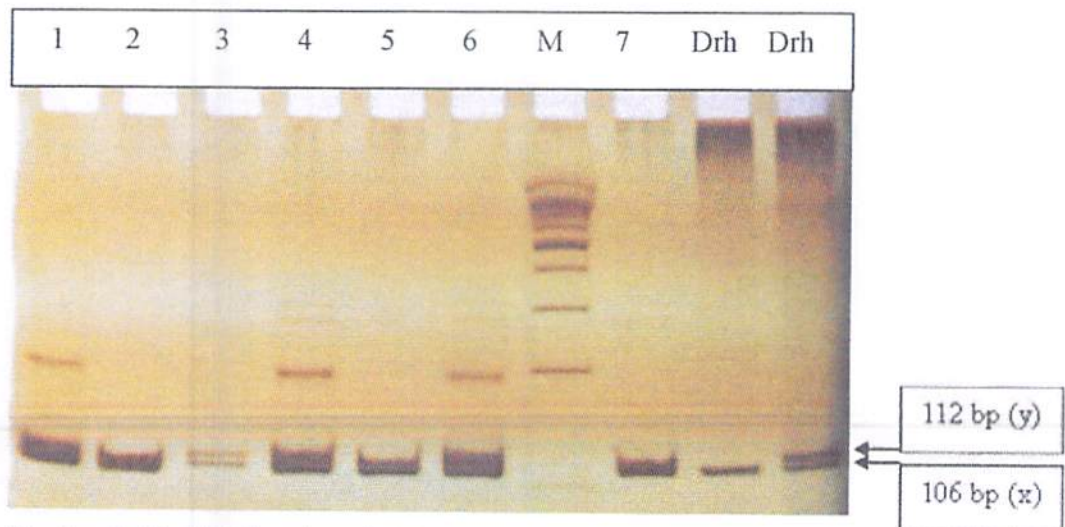
**METODE ISOLASI DNA GENOMIK DARI STAIN SALIVA MELALUI
PENGENALAN ENZIM α -AMILASE UNTUK IDENTIFIKASI JENIS
KELAMIN**

Invensi ini berkaitan dengan DNA genomik yang diisolasi dari saliva menggunakan pengenalan α -amilase sehingga dapat digunakan pada amplifikasi lokus Amelogenin. Sampel saliva diambil dari 6 pria dan wanita sukarelawan, sehat, berusia 22-35 tahun, setidaknya 1 jam setelah makan atau minum minuman selain air. Semua sampel diperoleh pada 10.00 WIB, karena aktivitas amilase diketahui bervariasi pada siang hari. Aktivitas α -amilase diukur dengan menggunakan tes *Phadebas Forensic Press test* mengikuti instruksi dari pabrik. Korelasi antara aktivitas α -amilase saliva dan konsentrasi DNA saliva dianalisa menggunakan uji korelasi Spearman rank. Sebagai kelompok kontrol, darah vena perifer (10 ml) dikoleksi menggunakan teknik standar dalam tabung yang berisi 250 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0). Tidak ada korelasi antara aktivitas α -amilase dan jumlah DNA dalam saliva. α -amilase positif menunjukkan adanya saliva, dan dapat dilakukan isolasi DNA. Hasil isolasi DNA ini selanjutnya berguna untuk bahan pemeriksaan jenis kelamin dan pemeriksaan paternitas ante mortem pada bidang forensic molekuler.

30

35

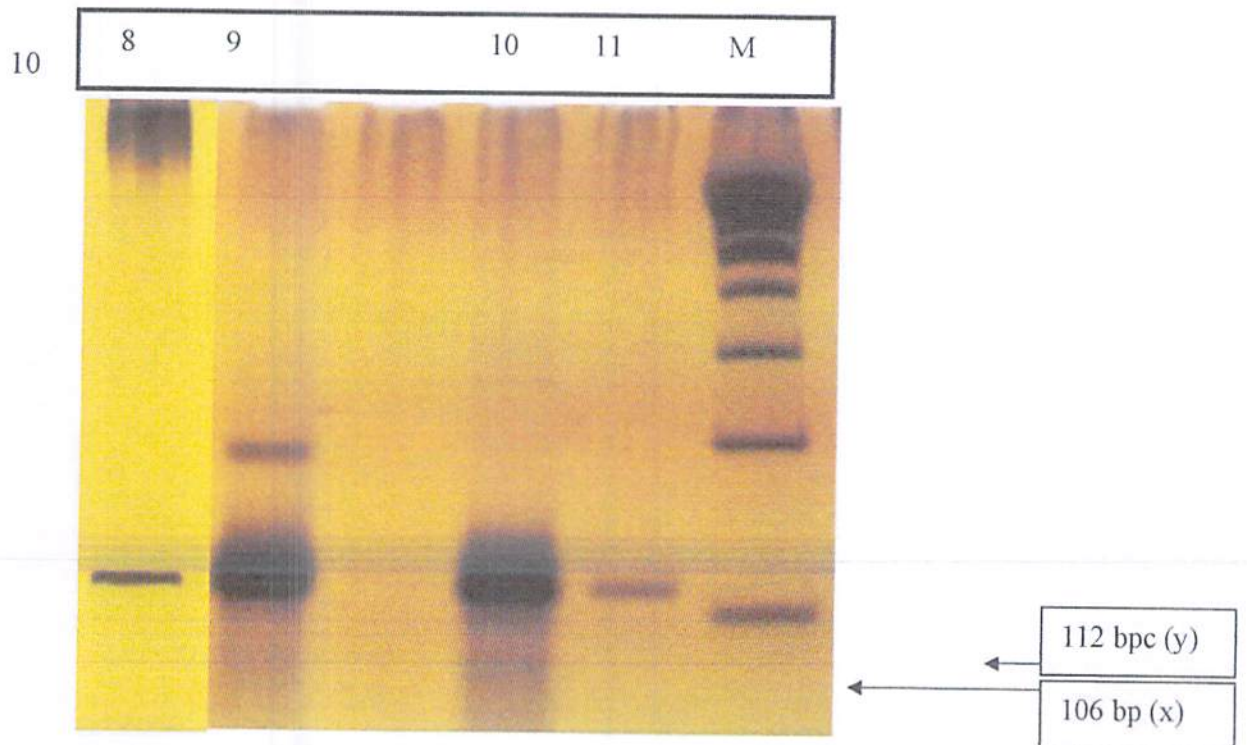




Gambar 1. Hasil elektrofloresis (a)

Keterangan

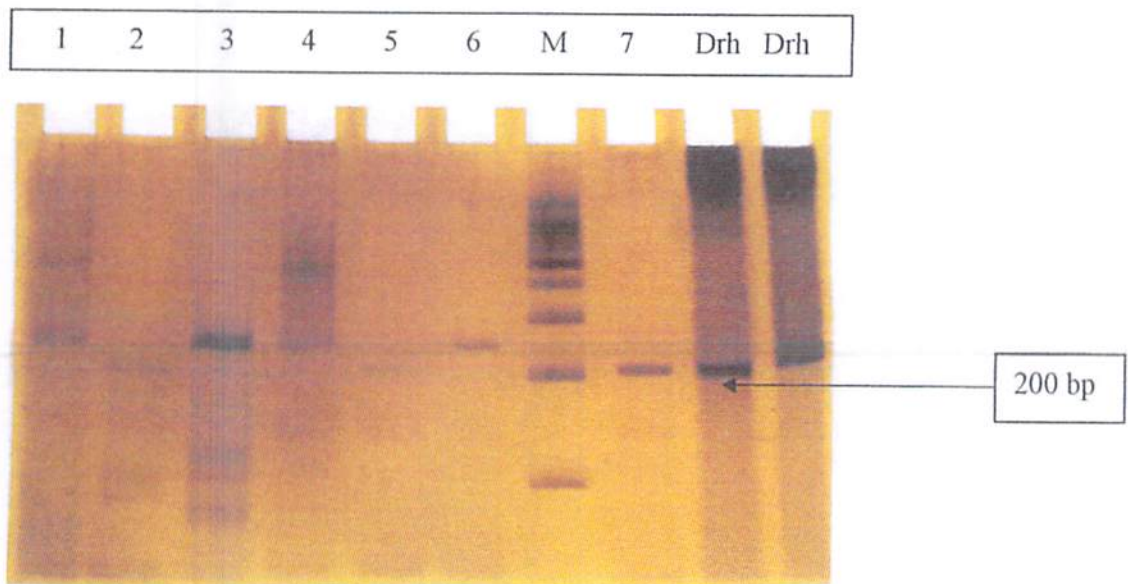
- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| 1. Pria 1 volume 32 µl | 6. Pria 1 volume 8 µl |
| 2. Wanita 1 volume 32 µl | M. Marker |
| 3. Pria 2 volume 32 µl | 7. Wanita 2 volume 32 µl |
| 4. Pria 2 volume 8 µl | Drh. Kontrol darah wanita |
| 5. Wanita 1 volume 32 µl | Drh. Kontrol darah pria |



Gambar 2. Hasil elektrofloresis (b)

Keterangan

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 8. Wanita 3 volume 32 µl | 11. Wanita 3 volume 8 µl |
| 9. Pria 3 volume 8 µl | M. Marker |
| 10. Pria 3 volume 32 µl | |

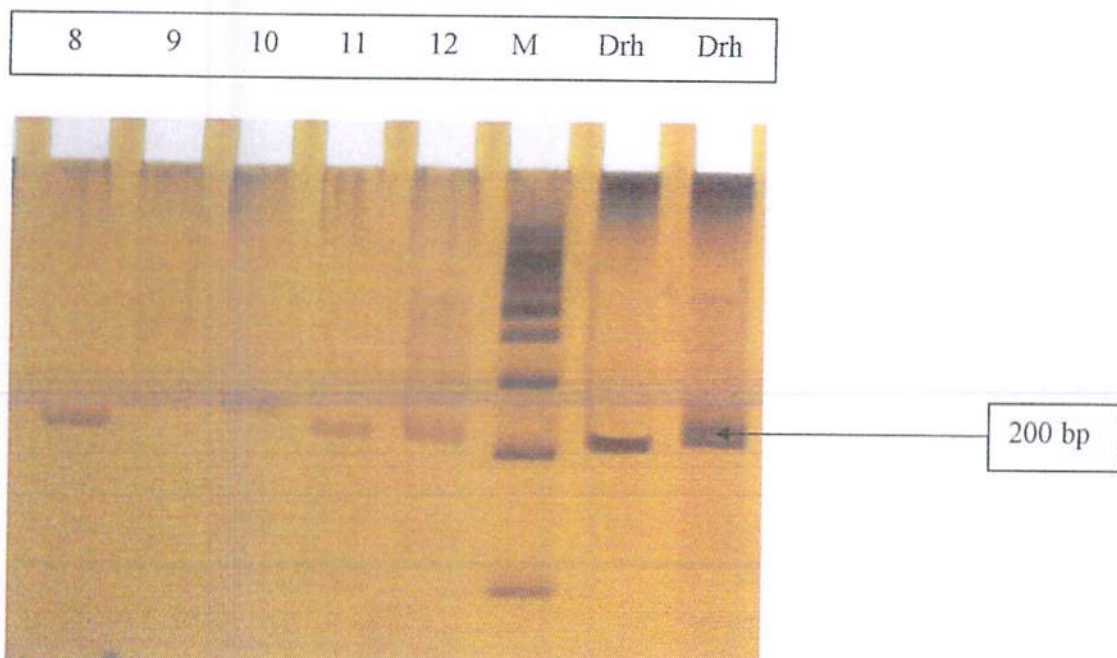


5 Gambar 3. Hasil D21S11 (a)

Keterangan

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 1. Pria 1 volume 32 μ l | 6. Pria 1 volume 8 μ l |
| 2. Wanita 1 volume 32 μ l | M. Marker |
| 3. Pria 2 volume 32 μ l | 7. Wanita 2 volume 32 μ l |
| 4. Pria 2 volume 8 μ l | Drh. Kontrol darah wanita |
| 5. Wanita 1 volume 32 μ l | Drh. Kontrol darah pria |

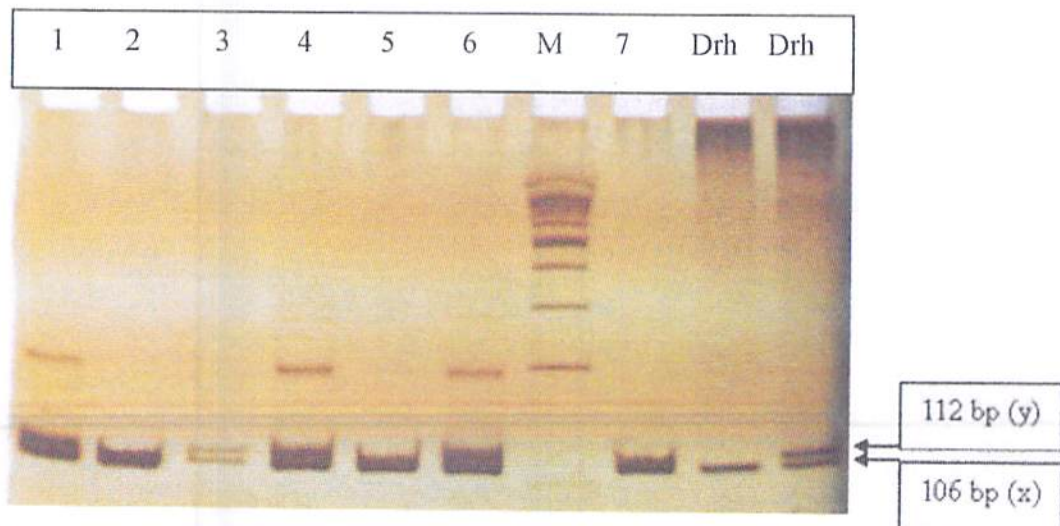
10



15 Gambar 4. Hasil D21S11 (b)

Keterangan

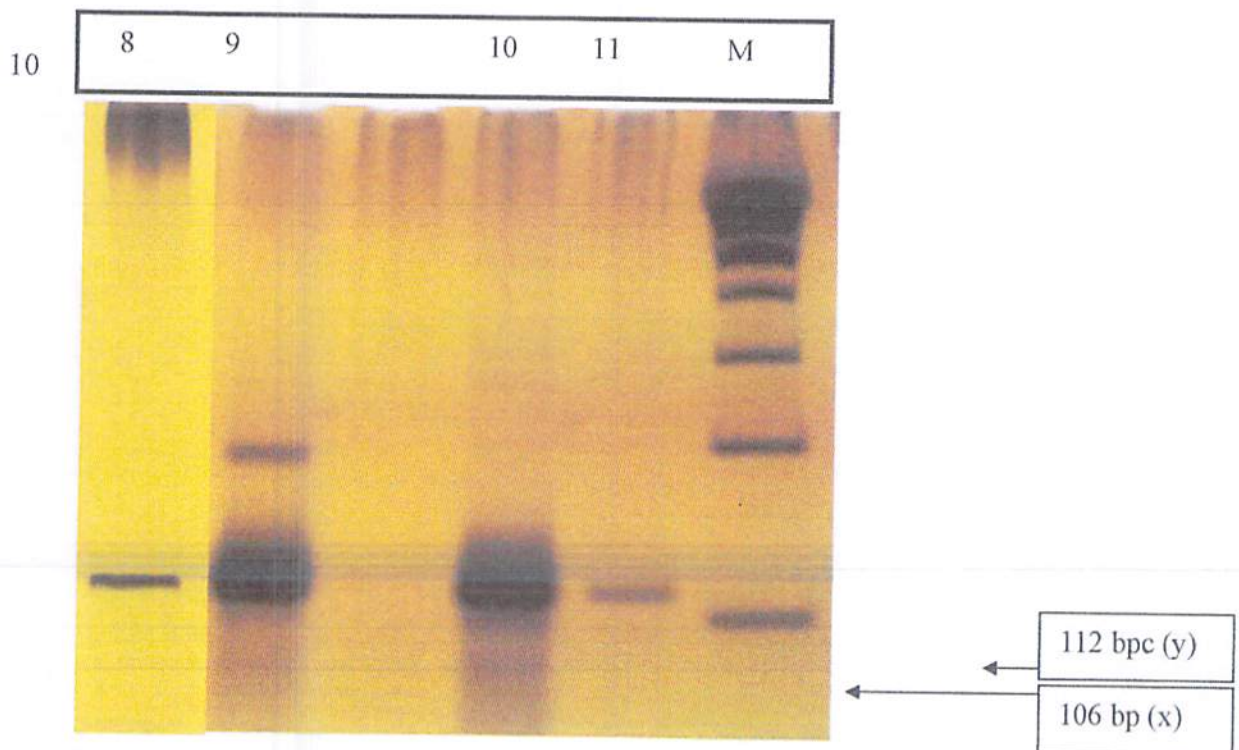
- | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| 8. Wanita 3 volume 32 μ l | 11. Wanita 3 volume 8 μ l | Drh. Darah wanita |
| 9. Pria 3 volume 8 μ l | 12. Wanita 2 volume 8 μ l | Drh. Darah pria |
| 10. Pria 3 volume 32 μ l | M. Marker | |



Gambar 1. Hasil elektrofloresis (a)

Keterangan

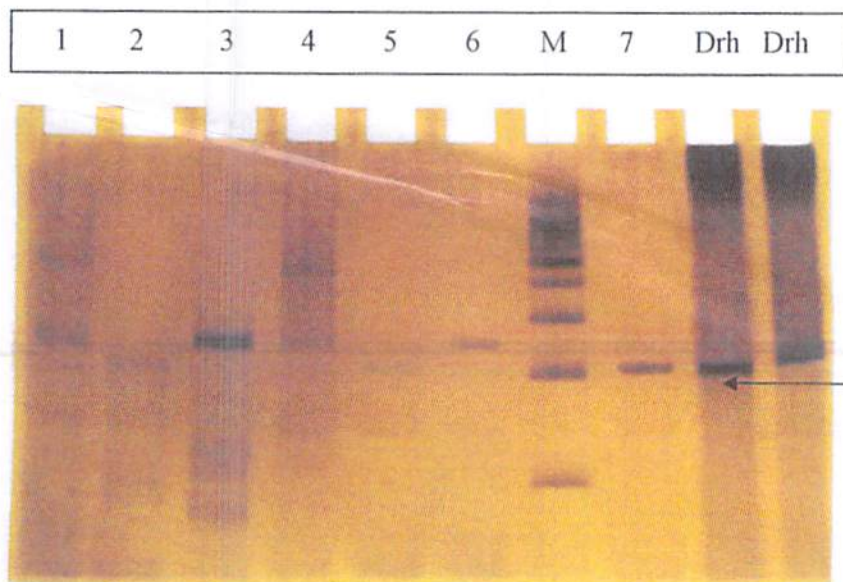
- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 1. Pria 1 volume 32 μ l | 6. Pria 1 volume 8 μ l |
| 2. Wanita 1 volume 32 μ l | M. Marker |
| 3. Pria 2 volume 32 μ l | 7. Wanita 2 volume 32 μ l |
| 4. Pria 2 volume 8 μ l | Drh. Kontrol darah wanita |
| 5. Wanita 1 volume 32 μ l | Drh. Kontrol darah pria |



Gambar 2. Hasil elektrofloresis (b)

Keterangan

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 8. Wanita 3 volume 32 μ l | 11. Wanita 3 volume 8 μ l |
| 9. Pria 3 volume 8 μ l | M. Marker |
| 10. Pria 3 volume 32 μ l | |



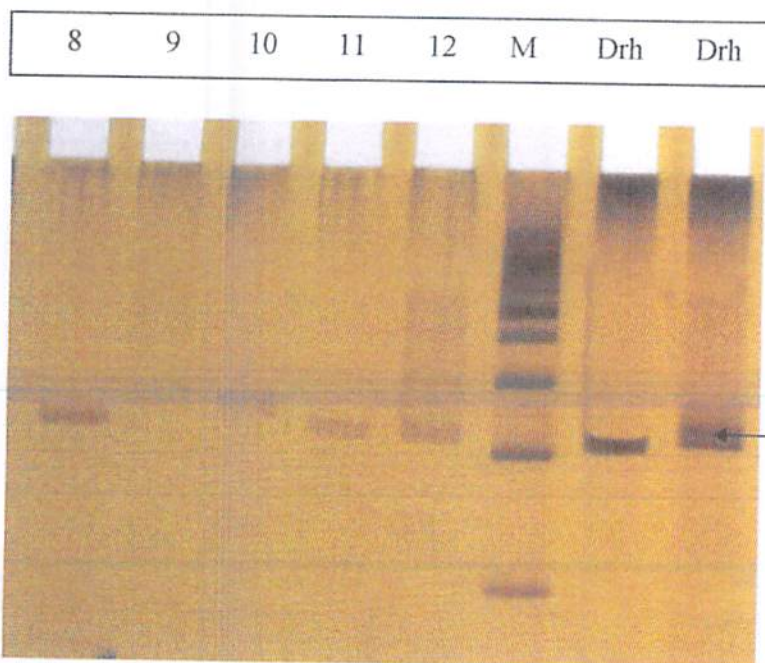
200 bp

5 Gambar 3. Hasil D21S11 (a)

Keterangan

- | | |
|--|--|
| 1. Pria 1 volume 32 μ l
2. Wanita 1 volume 32 μ l
3. Pria 2 volume 32 μ l
4. Pria 2 volume 8 μ l
5. Wanita 1 volume 32 μ l | 6. Pria 1 volume 8 μ l
M. Marker
7. Wanita 2 volume 32 μ l
Drh. Kontrol darah wanita
Drh. Kontrol darah pria |
|--|--|

10



200 bp

15 Gambar 4. Hasil D21S11 (b)

Keterangan

- | | | |
|---|---|--------------------------------------|
| 8. Wanita 3 volume 32 μ l
9. Pria 3 volume 8 μ l
10. Pria 3 volume 32 μ l | 11. Wanita 3 volume 8 μ l
12. Wanita 2 volume 8 μ l
M. Marker | Drh. Darah wanita
Drh. Darah pria |
|---|---|--------------------------------------|