

VARIAN NON-DELESI 9 PASANG BASA DNA MITOKONDRIA MANUSIA SAMPEL FORENSIK BALI

Oleh :

Gun Gun Gumilar¹⁾, A. Saifuddin Noer²⁾

Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA
Universitas Pendidikan Indonesia
Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung

ABSTRACT

One of human mitochondrial DNA (mtDNA) variant is a 9 base pairs (bp) deletion in the COII/trRNA^{Lys} intergenic region. In construction mtDNA nomenclature, 9-bp deletion database consist of primary and secondary data is needed, including Bali bombing forensic samples. Here we report a 9-bp non-deletion mtDNA variant from Bali bombing forensic samples to complete primary data. Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with 2 set primer was used to detect 9-bp deletion. The PCR result was detected by agarose gel electrophoresis, which showed two bands (0.1 and 0.4 kb) for non-deletion variant control, and one band (0.4 kb) for deletion variant control. If the sample has 9-bp deletion, only one of the primer pairs could amplify a fragment of 0.4 kb. If the sample does not have 9-bp deletion, the other primer pair will amplify a 0.1 kb product. The result showed that none of the 24 samples has 9-bp deletion. These results are contributed to the human mtDNA database and nomenclature construction.

Keywords: mtDNA, 9-bp deletion, PCR

PENDAHULUAN

Salah satu organel yang mempunyai peranan sangat vital dalam sel adalah mitokondria, hal ini tidak terlepas dari fungsi utamanya sebagai penghasil energi bagi sel. Mitokondria menghasilkan energi dengan jalan mentransfer elektron yang bersumber dari makanan ke dalam sistem rantai respirasi yang melibatkan berbagai macam protein kompleks. Sebagian besar protein yang terdapat dalam mitokondria dikode oleh DNA inti. Meskipun demikian, pada mitokondria sendiri terdapat DNA yang memiliki sistem replikasi otonom dan terpisah dari DNA inti, dimana DNA ini juga ternyata mengkode beberapa protein respirasi (Anderson *et al.*, 1981).

DNA mitokondria (mtDNA) manusia merupakan DNA ekstrakromosom yang terdapat dalam organel mitokondria dan memiliki bentuk seperti lingkaran (*closed circular*). *The*

1) Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia

2) Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung

Human Genom Project sendiri memberikan nama DNA ini sebagai kromosom ke-25 (Marzuki *et al.*, 1991). MtDNA manusia terdiri dari 16.569 pasang basa yang dapat dipetakan menjadi beberapa daerah. Secara umum, daerah mtDNA dapat dibedakan menjadi *coding* dan *non coding region*. *Coding region* merupakan daerah pengkode protein, tRNA, atau rRNA. Adanya mutasi nukleotida pada daerah ini bisa menyebabkan terjadinya penyakit. Adapun *non coding region*, merupakan daerah yang tidak mengkode terdiri dari *control region* dan daerah antargen. Mutasi nukleotida pada daerah ini tidak mengakibatkan terjadinya penyakit, atau dengan kata lain hanya menyebabkan terjadinya polimorfisme (variasi urutan nukleotida).

Terdapat karakteristik yang unik pada mtDNA diantaranya : memiliki jumlah kopi yang banyak, laju mutasi yang tinggi, haploid, dan bersifat maternal (Stone *et al.*, 2001). Hal tersebut menjadikan analisis mtDNA manusia memiliki peranan penting ataupun peluang yang cukup besar dalam mempelajari hubungan genetik antar individu, dimana hal ini dapat diterapkan setidaknya dalam tiga bidang, antara lain : kedokteran, forensik, dan antropologi.

Hubungan antara perubahan nukleotida (mutasi) mtDNA dengan penyakit menjadi kajian utama dalam bidang kedokteran, hal ini didasari oleh kenyataan ditemukannya beberapa penyakit yang ditimbulkan akibat terjadinya mutasi nukleotida mtDNA. Dalam bidang forensik, jumlah sampel yang terlalu sedikit dan jenis sampel tertentu seperti rambut, tulang serta gigi membuat analisis DNA inti tidak mungkin dilakukan, hal inilah yang menjadi dasar mengapa analisis mtDNA memiliki peranan penting dalam bidang ini. Migrasi global yang dapat direkonstruksi dari pola migrasi wanita dari satu daerah ke daerah lain, menjadikan analisis mtDNA sebagai fenomena tersendiri dalam bidang antropologi (Wallace, 1997).

Karakteristik laju mutasi yang tinggi sehingga berujung pada bentuk polimorfisme, menjadi pertimbangan tersendiri dalam pemanfaatan analisis mtDNA manusia. Perubahan panjang basa akibat delesi 9 pasang basa (pb) di daerah antargen COII/tRNA^{Lys}, yang berupa hilangnya satu dari dua *copy* urutan berulang CCCCTCTA (Wrischnik *et al.*, 1987), merupakan salah satu bentuk polimorfisme pada mtDNA.

Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya, diamati bahwa kecenderungan delesi 9 pb berbeda untuk tiap daerah / populasi. Delesi 9 pb tidak ditemukan pada populasi India Utara, Bangladesh, dan Pakistan, tapi terlihat dengan frekuensi yang rendah sampai moderat pada sembilan populasi Asia Tenggara (Melton *et al.*, 1995). Frekuensi delesi 9 pb yang cukup tinggi ditemukan pada tiga populasi pasifik (Redd *et al.*, 1995). Penelitian yang dilakukan pada populasi Indonesia dengan melibatkan 15 etnis, menunjukkan berbedanya frekuensi delesi untuk setiap etnis tersebut. Kenyataan ini menunjukkan bahwa frekuensi delesi 9 pb cenderung bersifat khas pada setiap populasi, sehingga delesi 9 pb dapat memberikan sumbangan berarti dalam melacak sejarah evolusi populasi manusia.

Informasi tentang varian delesi/non delesi 9 pb, diperlukan dalam rangka melengkapi *database* dan penyusunan sistem penomoran mtDNA, namun disayangkan informasi yang tersedia untuk sampel forensik Bali masih sangat sedikit. Dalam penelitian ini dilakukan deteksi delesi 9 pb daerah antargen COII/tRNA^{Lys} pada 22 sampel forensik Bali. Tujuan penelitian ini adalah untuk menghasilkan data primer varian delesi/non delesi 9 pb mtDNA manusia, sekaligus melengkapi identitas mtDNA sampel yang dideteksi.

PENELITIAN

Deteksi delesi 9 pb dilakukan menggunakan teknik PCR dengan dua pasang primer untuk mengamplifikasi fragmen mtDNA yang membawa daerah antargen COII/tRNA^{Lys}. Prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi penyiapan templat mtDNA, amplifikasi mtDNA menggunakan teknik PCR, dan deteksi hasil PCR dengan elektroforesis.

Penyiapan Templat mtDNA

Untuk mendapatkan templat mtDNA, sampel yang berupa otot dan rambut terlebih dahulu dilisis. Lisis dilakukan dengan mencampurkan sampel dengan 20 µL bufer lisis 10x (500 mM Tris – HCl pH 8,5, 10mM EDTA pH 8,5 (J.T. Baker), dan 5% Tween–20 (Merck)), 10 µL enzim proteinase K 10 mg/mL (USB Corporation), dan ddH₂O steril sampai volume akhir menjadi 200 µL. Campuran reaksi tersebut diinkubasi pada suhu 55 °C dalam inkubator selama 1 jam untuk sampel rambut dan 1 malam untuk sampel otot. Selanjutnya inkubasi dilakukan pada suhu 95 °C selama 10 menit untuk deaktivasi enzim (Noer *et al.*, 1994). Setelah inkubasi, campuran reaksi disentrifugasi menggunakan alat mikrosentrifuga (Eppendorf Centrifuge 5417C) pada 10.000 g selama 3 menit, kemudian diambil supernatannya untuk digunakan sebagai templat pada reaksi PCR. Khusus untuk sampel otot, supernatan yang dihasilkan terlebih dahulu dimurnikan melalui prosedur presipitasi etanol.

Amplifikasi mtDNA Menggunakan Teknik PCR

Suatu set primer digunakan pada proses PCR untuk mengamplifikasi fragmen yang membawa daerah antargen COII/tRNA^{Lys}. Pasangan primer 9A/9B dirancang untuk menghasilkan fragmen 0,4 kb, sedangkan pasangan primer 9A/9C dirancang untuk menghasilkan fragmen 0,1 kb hanya pada templat non-delesi (Syafrizayanti, 2004).

Reaksi PCR dilakukan dalam tabung 0,2 mL (Eppendorf), dengan pereaksi terdiri atas 5 µL templat mtDNA hasil lisis, 10 pmol untuk masing-masing primer, 2,5 µL bufer PCR 10x (Amersham Pharmacia Biotech : 500 mM KCl, dan 100 mM Tris-HCl pH 9,0 pada suhu ruang), 1,5 mM MgCl₂, 0,75 unit enzim *Taq* DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech; MD Bio), 200 µM campuran dNTP (Amersham Pharmacia Biotech; MD Bio) dan ditambah ddH₂O steril sehingga volumenya mencapai 25 µL (Noer *et al.*, 1991; Marzuki *et al.*, 1991).

Proses PCR menggunakan mesin *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer) dengan tahapan sebagai berikut : denaturasi awal pada suhu 94 °C (1 menit), siklus PCR (30 siklus) dengan masing-masing siklus terdiri tiga tahap yaitu tahap denaturasi pada suhu 94 °C (1 menit); *annealing* 54 °C (1 menit); polimerisasi pada suhu 72 °C (1 menit), dan terakhir dilakukan pemantapan pada suhu 72 °C selama 4 menit. DNA hasil PCR disimpan pada suhu –20°C sebelum dilakukan proses selanjutnya.

Deteksi Hasil PCR dengan Elektroforesis

MtDNA hasil amplifikasi PCR selanjutnya dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 1 % (b/v) menggunakan *horizontal Biorad mini-sub DNA Electrophoresis apparatus*. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 80 volt selama 30 menit menggunakan bufer TAE

1x. *Marker* atau penanda ukuran DNA yang digunakan adalah pUC19/*HinfI* (Amersham Pharmacia Biotech) yang memiliki 6 pita (masing-masing berukuran 1.419 pb, 517 pb, 396 pb, 214 pb, 75 pb, dan 65 pb). Hasil elektroforesis diperiksa dengan lampu ultra violet dan difoto menggunakan kamera polaroid disertai filter Kodak 23A dan film polaroid tipe 667.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi delesi 9 pb melalui teknik PCR dilakukan terhadap 22 sampel forensik Bali, untuk mendapatkan informasi tentang delesi / non-delesi 9 pb pada daerah antargen COII/tRNA^{Lys}. Sebagian besar jenis sampel forensik Bali adalah otot, dan hanya satu sampel saja yang berupa rambut. Secara lebih jelas keterangan mengenai kode dan jenis sampel yang dideteksi dengan teknik PCR diperlihatkan pada tabel 1.

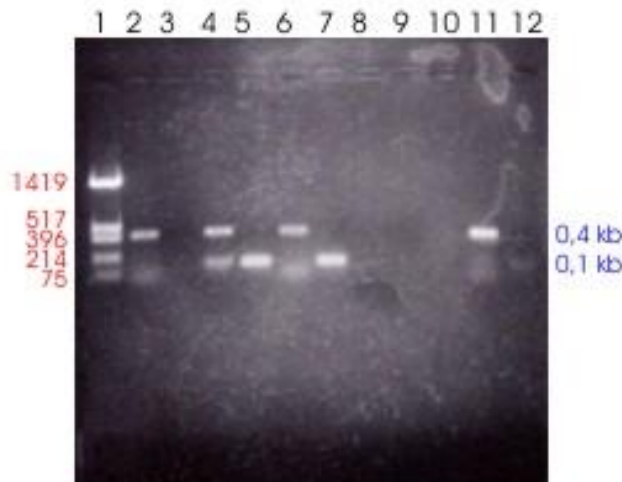
Tabel 1. Kode, jenis, dan asal sampel yang diteliti

No.	Kode Sampel	Jenis Sampel
1	89	Otot
2	123	Otot
3	131	Otot
4	C4A	Otot
5	83B	Otot
6	C6C	Otot
7	C6D	Otot
8	D	Otot
9	C8F	Otot
10	GF	Otot
11	PIF	Otot
12	VIF	Otot
13	29F	Rambut
14	C1M	Otot
15	10M	Otot
16	35M	Otot
17	63M	Otot
18	134M	Otot
19	XXAM	Otot
20	P161	Otot
21	P164	Otot
22	P171F	Otot

Pada setiap proses PCR, selain sampel yang dideteksi selalu diikutsertakan juga kontrol varian delesi, kontrol varian non-delesi, dan kontrol negatif PCR (tanpa templat mtDNA). Kontrol varian delesi menggunakan sampel E dan kontrol varian non-delesi menggunakan sampel 99F, sebagai sumber templat mtDNA. Kedua sampel ini telah berhasil dideteksi pada penelitian sebelumnya, sebagai varian delesi 9 pb (E) dan non-delesi 9 pb (99F) (Syafrizayanti, 2004). Kontrol varian delesi diperlukan sebagai bukti bahwa

delesi 9 pb terjadi dan dapat dideteksi melalui teknik PCR. Sedangkan kontrol varian non-delesi, selain menunjukkan pola non-delesi 9 pb, juga berperan sebagai kontrol positif PCR. Adapun pada kontrol negatif PCR, templat mtDNA diganti dengan ddH₂O, pengikutsertaan kontrol ini bertujuan untuk mereduksi kesalahan analisis sebagai akibat terjadinya kontaminasi.

Melalui elektroforesis gel agarosa, diperoleh pita fragmen mtDNA produk PCR. Berdasarkan perbandingan dengan standar pUC/*Hinf*I, fragmen mtDNA yang dihasilkan berukuran 0,4 kb dan 0,1 kb (gambar 1). Kontrol varian non-delesi memperlihatkan 2 pita, yaitu 0,4 kb dan 0,1 kb, sedangkan kontrol varian delesi hanya memperlihatkan 1 pita 0,4 kb. Untuk kontrol negatif PCR, tidak ditemukan pita pada daerah 0,4 kb maupun 0,1 kb. Sampel 123 menunjukkan profil yang mirip dengan kontrol varian non-delesi, dimana diperoleh pita 0,4 kb dan 0,1 kb. Adapun sampel C8F memperlihatkan pita 0,4 kb yang cukup jelas akan tetapi pita 0,1 kb-nya sangat tipis.



Gambar. 1. Produk PCR. 1. Standar ukuran pUC19/*Hinf*I; 2. Pita 0,4 kb kontrol varian delesi; 3. Pita 0,1 kb yang tidak muncul pada kontrol varian delesi; 4. Pita 0,4 kb kontrol varian non delesi; 5. Pita 0,1 kb kontrol varian non delesi; 6. Pita 0,4 kb sampel 123; 7. Pita 0,1 kb sampel 123; 8. Kontrol negatif PCR primer 9A/9B; 9. Kontrol negatif PCR primer 9A/9C; 10. Kosong; 11. Pita 0,4 kb sampel C8F; 12. Pita 0,1 kb yang tipis untuk sampel C8F.

Berdasarkan hasil yang diperoleh untuk kontrol varian non-delesi dapat dikatakan bahwa proses amplifikasi mtDNA telah berhasil dilakukan, baik oleh pasangan primer 9A/9B yang mengamplifikasi fragmen 0,4 kb, maupun oleh pasangan primer 9A/9C yang mengamplifikasi fragmen 0,1 kb. Keberadaan pita 0,1 kb sekaligus merupakan bukti bahwa

templat mtDNA yang digunakan sebagai kontrol varian non-delesi, memiliki urutan berulang daerah antargen COII/tRNA^{Lys} yang lengkap (tidak mengalami delesi 9 pb). Hasil ini konsisten dengan penelitian sebelumnya, dimana sampel 99F yang dijadikan kontrol merupakan varian non-delesi (Syafrizayanti, 2004). Dengan demikian dalam kasus ini 99F sebagai kontrol varian delesi dan kontrol positif PCR berfungsi dengan baik.

Pada kontrol varian delesi terdapatnya pita 0,4 kb menunjukkan bahwa proses amplifikasi juga terjadi oleh pasangan primer 9A/9B. Sebaliknya amplifikasi oleh pasangan primer 9A/9C tidak berlangsung, yang ditunjukkan oleh tidak terdapatnya pita 0,1 kb (lajur 3 gb. 1). Hal ini sebagai akibat terjadinya delesi 9 pb salah satu *copy* urutan berulang pada mtDNA sampel E yang dijadikan kontrol varian delesi, sebagaimana ditunjukkan oleh hasil sekuensing yang dilakukan pada penelitian sebelumnya. Secara teoritis, tidak terjadinya proses amplifikasi fragmen 0,1 kb dikarenakan primer 9C yang diset pada daerah urutan berulang COII/tRNA^{Lys}, tidak dapat menempel pada templat mtDNA akibat terjadinya delesi. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa fungsi sampel E sebagai kontrol varian delesi berjalan dengan baik.

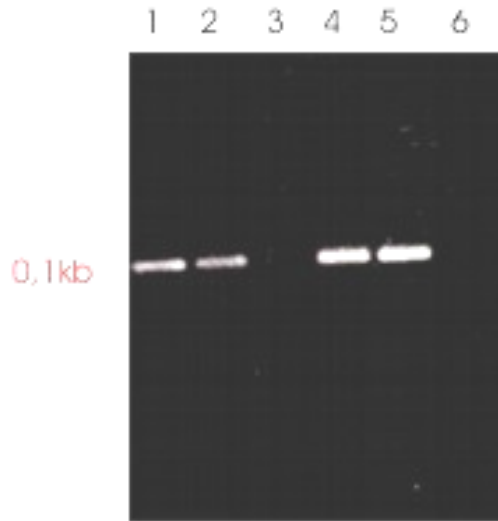
Adapun hasil yang diperoleh untuk kontrol negatif PCR, yang berupa tidak adanya pita baik 0,4 kb maupun 0,1 kb (lajur 8 dan 9 gb. 1), menunjukkan bahwa kontaminasi pereaksi tidak terjadi. Dengan kata lain, kontrol negatif PCR yang memakai ddH₂O sebagai pengganti templat, tidak akan mungkin menghasilkan produk amplifikasi jika tidak ada kontaminasi DNA. Secara keseluruhan, dengan mempertimbangkan hasil yang diperoleh untuk kontrol varian delesi, varian non-delesi, dan negatif PCR, maka dapat dikatakan bahwa proses PCR berjalan dengan baik. Dengan hasil ini maka analisis terhadap hasil PCR dari sampel-sampel yang dideteksi dapat dilakukan dengan baik.

Sampel 123 menunjukkan profil yang mirip dengan kontrol varian non delesi, dimana diperoleh pita 0,4 kb dan 0,1 kb (lajur 6 dan 7 gb. 1). Hal ini menunjukkan bahwa proses lisis yang dilakukan terhadap sampel ini berhasil, dalam artian mampu menyediakan mtDNA dengan jumlah yang cukup sebagai templat PCR. Proses amplifikasi templat ini oleh pasangan primer 9A/9B dan 9A/9C, berlangsung dengan baik dan dapat diamati dengan intensitas pita yang cukup jelas pada hasil elektroforesis agarosa. Berdasarkan pertimbangan proses PCR yang berjalan dengan baik, dan pola yang diperoleh untuk sampel 123, maka dapat dikatakan bahwa sampel ini tidak mengalami delesi 9 pb.

Sedangkan pada sampel C8F, perbedaan yang sangat mencolok antara intensitas pita 0,4 kb dan 0,1 kb (lajur 11 dan 12 gb. 1), menimbulkan keraguan dalam menyatakan delesi atau tidaknya sampel ini. Hal ini didasarkan pada kenyataan bahwa terdapatnya *heteroplasmy* dalam DNA mitokondria, dalam artian urutan masing-masing DNA mitokondria yang terdapat dalam satu sel tidak selalu sama. Oleh karena itu, amplifikasi melalui PCR terhadap mtDNA yang tidak dominan bisa saja terjadi. Fenomena *heteroplasmy* pada daerah antargen COII/tRNA^{Lys} sendiri pernah diamati pada individu Skotlandia (Thomas *et al.* 1998).

Berdasarkan hal tersebut, maka peneliti akhirnya melakukan re-PCR dengan menggunakan primer 9A/9C untuk mengamplifikasi fragmen 0,1 kb sampel C8F. Re-PCR juga dilakukan terhadap sampel C6D yang memiliki profil hasil PCR mirip dengan sampel C8F. Templat mtDNA yang digunakan pada proses re-PCR diperoleh dengan mengencerkan 10⁵ kali fragmen 0,4 kb hasil amplifikasi sebelumnya. Hasil re-PCR

menunjukkan terjadinya amplifikasi fragmen mtDNA 0,1 kb sampel C8F dan C6D, sebagaimana ditunjukkan oleh pita yang cukup jelas pada hasil elektroforesis gel agarosa (gambar 2). Berdasarkan hal tersebut, dapat dikatakan bahwa sampel C8F dan C6D tidak mengalami delesi 9 pb pada daerah antargen COII/tRNA^{Lys}.



Gambar IV.2. Produk re-PCR. 1. Standar ukuran 0,1 kb; 2. Pita 0,1 kb sampel C6D; 3. Kosong 4. Pita 0,1 kb sampel C8F; 5. Kontrol positif PCR; 6. Kontrol negatif PCR.

Meskipun seharusnya sistem deteksi ini akan menghasilkan 2 buah pita pada sampel non-delesi, akan tetapi terdapat 7 sampel yang hanya menunjukkan 1 pita 0,1 kb. Hal ini diduga sebagai akibat tidak optimumnya kondisi PCR atau templat yang kurang baik pada campuran reaksi yang seharusnya menghasilkan fragmen 0,4 kb. Berdasarkan hal tersebut peneliti melakukan optimasi suhu *annealing* pada rentang 54 – 58 °C, di samping itu lisis baru juga dilakukan sebagai upaya mendapatkan templat yang baik. Akan tetapi upaya ini ternyata tetap tidak dapat memberikan profil 2 pita untuk 7 sampel tersebut. Meskipun kenyataan ini sempat memberikan keraguan untuk mengambil kesimpulan, akan tetapi akhirnya peneliti mengelompokkan 7 sampel ini ke dalam varian non-delesi. Hal ini didasari oleh berjalan dengan baiknya setiap kontrol yang terlibat pada reaksi, dan keberadaan fragmen 0,1 kb. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, delesi atau non-delesi sebenarnya diamati dengan keberadaan fragmen 0,1 kb, dimana fragmen ini tidak akan muncul jika sampelnya delesi.

Dengan selalu mempertimbangkan hasil yang diperoleh untuk masing-masing kontrol, serta pola yang dimiliki oleh tiap sampel, maka dapat dikatakan bahwa seluruh sampel tersebut tidak mengalami delesi 9 pb pada daerah antargen COII/tRNA^{Lys}. Rekapitulasi hasil deteksi dari seluruh sampel diperlihatkan pada tabel 2. Dengan hasil ini, semua

sampel yang telah dideteksi dapat dikelompokkan ke dalam populasi non-delesi, sehingga mempermudah proses identifikasi.

Tabel 2. Hasil deteksi delesi 9 pb pada sampel dan kontrol

No.	Kode Sampel	Hasil
1	89	Non-delesi
2	123	Non-delesi
3	131	Non-delesi
4	C4A	Non-delesi
5	83B	Non-delesi
6	C6C	Non-delesi
7	C6D	Non-delesi
8	D	Non-delesi
9	C8F	Non-delesi
10	GF	Non-delesi
11	PIF	Non-delesi
12	VIF	Non-delesi
13	29F	Non-delesi
14	C1M	Non-delesi
15	10M	Non-delesi
16	35M	Non-delesi
17	63M	Non-delesi
18	134M	Non-delesi
19	XXAM	Non-delesi
20	P161	Non-delesi
21	P164	Non-delesi
22	P171F	Non-delesi
23	ASN	Non-delesi
24	GMR	Non-delesi
25	E ^{*)}	Delesi
26	99F ^{**)}	Non-delesi

*) = kontrol varian delesi

***) = kontrol varian non delesi

Pola non-delesi 9 pb pada seluruh sampel merupakan identitas bagi setiap individu yang dideteksi, sekaligus melengkapi analisis sebelumnya yang telah dilakukan pada daerah Hypervariabel 1 dan 2 (HV1 dan HV2). Hasil ini sangat bermanfaat dalam rangka proses identifikasi seseorang, karena semakin lengkap data yang dimiliki maka proses identifikasi akan semakin mudah dan pasti. Hal ini didasari oleh kenyataan bahwa banyak pengungkapan identitas individu yang tidak bisa dilakukan hanya dengan melakukan analisis satu daerah mtDNA saja.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil deteksi PCR menunjukkan 22 sampel forensik dan Bali merupakan varian non-delesi 9 pb. Hal ini melengkapi identitas mtDNA setiap sampel yang dideteksi dan memberikan kontribusi terhadap *database* mtDNA. Berdasarkan pertimbangan bahwa delesi 9 pb juga memiliki kemampuan dalam memisahkan individu, maka diharapkan dapat mengikutsertakannya pada pembuatan sistem penomoran mtDNA. Analisis terpadu dengan melihat data delesi, HV1 dan HV2 sangat dianjurkan dilakukan pada penelitian selanjutnya, untuk keperluan identifikasi seseorang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada HIBAH PASCA 2004/2006, dan rekan – rekan di kelompok penelitian mtDNA ITB.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A, Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G., (1981), Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* **290**, 457-467.
- Handoko, H.Y., Lum, J.K., Gustiani, Rismalia, Kartapradja, H., Sofro, A.S.M. and Marzuki, S., (2001), Length Variations in COII-tRNA^{Lys} Intergenic Region of Mitochondrial DNA in Indonesian Populations, *Hum. Biol.*, **73**, 205-223.
- Marzuki, S., Sudoyo, H. and Noer, A.S., (1991), Polymorphism of the Human Mitochondrial DNA and Forensic medicine, *Maj. Kedok. Indon.*, **41**, 737-740.
- Marzuki, S., Noer, A.S., Lertrit, P., Thyagarajan, D., Kapsa, R., Utthanaphol, P. and Byrne, E., (1991), Normal variants of human mitochondrial DNA and translation products: the building of a reference data base, *Hum. Genet.*, **88**, 139-145.
- Melton T., Peterson, R., Redd, A.J., Saha, N., Sofro, A.S., Martinson, J. and Stoneking, M., (1995), Polynesian genetic affinities with Southeast Asian populations as identified by mtDNA analysis, *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 403-414.
- Noer, A.S., Sudoyo, H., Lertrit, P., Thyagarajan, D., Utthanaphol, P., Kapsa, R., Byrne, E. and Marzuki, S., (1991), A tRNA^{Lys} mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome, *Am. J. Hum. Genet.*, **49**, 715-722.
- Noer, A.S., Martasih, F., Mulyani, S., Muktiningsih dan Wirahadikusumah, M., (1994), Analisis varian urutan nukleotida D-loop mtDNA manusia dari berbagai daerah di Indonesia. *Proseeding Seminar Bersama UKM-ITB*, I, 201-214.

- Redd A.J., Takezaki, N., Sherry S.T., McGarvey S.T., Sofro, A.S.M. and Stoneking, M., (1995) Evolutionary History of COII/tRNA^{Lys} Intergenic 9 Base Pair Deletion in Human Mitochondrial DNAs from Pasific, *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 605-615.
- Stone, C., Starrs, J.E. and Stoneking, M., (2001), Mitochondrial DNA Analysis of the Presumptive Remains of Jesse James, *J. Forensic Sci.*, **46**, 173-176.
- Syafrizayanti, (2004), *Haplotype dan Deteksi Sederhana Delesi 9-pb Daerah Antargen COII/tRNA^{Lys} DNA Mitokondria Manusia*, Tesis, Bidang Studi Magister Kimia Program Pasca Sarjana ITB.
- Thomas, M.G., Cook, C.E., Miller, K.W. P., Waring, M.J. and Hagelberg, E., (1998), Molecular instability in COII-tRNA^{Lys} intergenic region of human mitochondrial genome: multiple origins of the 9-bp deletion and heteroplasmy for expanded repeats, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **353**, 955-965.
- Wallace, D.C. (1997), Mitochondrial DNA in Aging and Disease. *Sci. Am.*, August, 22-29.
- Wrischnik, L.A., Higuchi, R.G., Stoneking, M., Erlichl, H.A., Arnheim, N. and Wilson A.C., (1987), Length Mutation in Human Mitochondrial DNA: Direct Sequencing of Enzimatically Amplified DNA, *Nucl. Acids Res.*, **12**, 529-542.