

**Konstruksi dan Optimasi Primer DNA Mitokondria Manusia
(*Homo sapiens*) pada Daerah *D-Loop: Hypervariable Segment II*
dalam Biologi Forensik**

Skripsi



Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara

31210395

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2025

**Konstruksi dan Optimasi Primer DNA Mitokondria Manusia
(*Homo sapiens*) pada Daerah *D-Loop: Hypervariable Segment II*
dalam Biologi Forensik**

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana



Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara

31210395

**Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana
Yogyakarta**

2025

PERNYATAAN PENYERAHAN KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara
NIM/NIP/NIDN : 31210395
Program Studi : Biologi
Judul Karya Ilmiah : Konstruksi dan Optimasi Primer DNA Mitokondria Manusia (*Homo sapiens*) pada Daerah *D-Loop: Hypervariable Segment II* dalam Biologi Forensik

dengan ini menyatakan:

- a. bahwa karya yang saya serahkan ini merupakan revisi terakhir yang telah disetujui pembimbing/promotor/reviewer.
- b. bahwa karya saya dengan judul di atas adalah asli dan belum pernah diajukan oleh siapa pun untuk mendapatkan gelar akademik baik di Universitas Kristen Duta Wacana maupun di universitas/institusi lain.
- c. bahwa karya saya dengan judul di atas sepenuhnya adalah hasil karya tulis saya sendiri dan bebas dari plagiasi. Karya atau pendapat pihak lain yang digunakan sebagai rujukan dalam naskah ini telah dikutip sesuai dengan kaidah penulisan ilmiah yang berlaku.
- d. bahwa saya bersedia bertanggung jawab dan menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku berupa pencabutan gelar akademik jika di kemudian hari didapati bahwa saya melakukan tindakan plagiasi dalam karya saya ini.
- e. bahwa Universitas Kristen Duta Wacana tidak dapat diberi sanksi atau tuntutan hukum atas pelanggaran hak kekayaan intelektual atau jika terjadi pelanggaran lain dalam karya saya ini. Segala tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran dalam karya saya ini akan menjadi tanggung jawab saya pribadi, tanpa melibatkan pihak Universitas Kristen Duta Wacana.
- f. menyerahkan hak bebas royalti noneksklusif kepada Universitas Kristen Duta Wacana, untuk menyimpan, melestarikan, mengalihkan dalam media/format lain, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (*database*), dan mengunggahnya di Repositori UKDW tanpa perlu meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis dan pemilik hak cipta atas karya saya di atas, untuk kepentingan akademis dan pengembangan ilmu pengetahuan.
- g. bahwa saya bertanggung jawab menyampaikan secara tertulis kepada Universitas Kristen Duta Wacana jika di kemudian hari terdapat perubahan hak cipta atas karya saya ini.

h. bahwa meskipun telah dilakukan pelestarian sebaik-baiknya, Universitas Kristen Duta Wacana tidak bertanggung jawab atas kehilangan atau kerusakan karya atau metadata selama disimpan di Repositori UKDW.

i. mengajukan agar karya saya ini: (*pilih salah satu*)

- ☐ Dapat diakses tanpa embargo.
- ☒ Dapat diakses setelah 2 tahun.*
- ☐ Embargo permanen.*

Embargo: penutupan sementara akses karya ilmiah.

*Halaman judul, abstrak, dan daftar pustaka tetap wajib dibuka.

Alasan embargo (*bisa lebih dari satu*):

- ☐ dalam proses pengajuan paten.
- ☐ akan dipresentasikan sebagai makalah dalam seminar nasional/internasional.**
- ☒ akan diterbitkan dalam jurnal nasional/internasional.**
- ☐ telah dipresentasikan sebagai makalah dalam seminar nasional/internasional ... dan diterbitkan dalam prosiding pada bulan ... tahun ... dengan DOI/URL ... ***
- ☐ telah diterbitkan dalam jurnal ... dengan DOI/URL artikel ... atau vol./no. ... ***
- ☐ berisi topik sensitif, data perusahaan/pribadi atau informasi yang membahayakan keamanan nasional.
- ☐ berisi materi yang mengandung hak cipta atau hak kekayaan intelektual pihak lain.
- ☐ terikat perjanjian kerahasiaan dengan perusahaan/organisasi lain di luar Universitas Kristen Duta Wacana selama periode tertentu.
- ☐ Lainnya (mohon dijelaskan)

Karya ilmiah dalam bentuk artikel jurnal nasional terakreditasi SINTA 2
akan disubmit ke Jurnal publisher Edukatika dalam Bahasa Inggris (Manuskrip)
sesuai dengan syarat dan ketentuan jurnal

**Setelah diterbitkan, mohon informasikan keterangan publikasinya ke repository@staff.ukdw.ac.id.

***Tuliskan informasi kegiatan atau publikasinya dengan lengkap.

Yogyakarta, 23 Juni 2025

Mengetahui,



Dr. Laurentia Henrieta Permeta Sari Purba, S.Si
NIDN/NIDK 0516069202

Yang menyatakan,




Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara
NIM 31210395

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Skripsi dengan judul:

**Konstruksi dan Optimasi Primer DNA Mitokondria Manusia (*Homo sapiens*) pada Daerah
D-Loop: Hypervariable Segment II dalam Biologi Forensik**

Telah diajukan dan dipertahankan oleh:

ANTONIA ANINDYANARI PARAMARTASTRI NITISARA

31210395

Dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Sains pada tanggal 27 Mei 2025

Nama Dosen

Tanda Tangan

1. Dr. Puji Rianti, S.Si., M.Si
(Ketua Tim Penguji)

:



2. Dr. Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, S.Si
(Dosen Pembimbing I/Dosen Penguji)

:



3. Vira Saamia, S.Si., M.Biomed
(Dosen Pembimbing II/Dosen Penguji)

:



Yogyakarta, 4 Juli 2025

Dekan,

Ketua Program Studi,



Dr. Charis Amarantini, M.Si
NIK. 914 E 155



Dwi Aditiyarini, S.Si., M.Biotech., M.Sc
NIK. 214 E 556

LEMBAR PERSETUJUAN NASKAH SKRIPSI

Judul Skripsi : Konstruksi dan Optimasi Primer DNA Mitokondria Manusia
(*Homo sapiens*) pada Daerah *D-Loop: Hypervariable Segment II*
dalam Biologi Forensik

Nama : Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara

NIM : 31210395

Pembimbing I : Dr. Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, S.Si

Pembimbing II : Vira Saamia, S.Si., M.Biomed

Hari, Tanggal Ujian : Selasa, 27 Mei 2025

Yogyakarta, 23 Juni 2025

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Dr. Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, S.Si
NIK. 224 E 591


Vira Saamia, S.Si., M.Biomed
NIP. 198605192008122001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi,


Dwi Adityarini, S.Si., M.Biotech., M.Sc
NIK. 214 E 556

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara

NIM : 31210395

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul:

“Konstruksi dan Optimasi Primer DNA Mitokondria Manusia (*Homo sapiens*) pada Daerah D-Loop: Hypervariable Segment II dalam Biologi Forensik”

adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu di dalam naskah ini dan disebutkan dalam Daftar Pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 19 Mei 2025

DUTA WACANA



(Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara)

NIM: 31210395

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala kasih dan kebolehan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan naskah tugas akhir yang berjudul **“Konstruksi dan Optimasi Primer DNA Mitokondria Manusia (*Homo sapiens*) pada Daerah D-Loop: Hypervariable Segment II dalam Biologi Forensik”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) dari Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana.

Penulis menyadari bahwa selama penelitian dan proses penyusunan naskah akhir ini tidak dapat berjalan dan selesai dengan baik tanpa adanya dukungan, bimbingan, saran, serta masukan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengungkapkan rasa syukur dan terima kasih kepada:

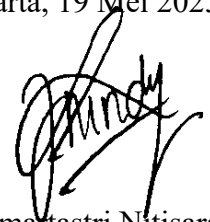
1. **Tuhan Yesus**, pegangan dan penuntun hidup penulis.
2. Seluruh analis forensik Sub-bidang Biologi Serologi, Bidang Kimia Biologi Forensik, Pusat Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal Polisi Republik Indonesia; **Pak Irfan, Bu Beta, Mas Riski, Bu Ana, Mba Ade, Mba Ajeng, dan Bang Afdhal**.
3. **Ibu Puji Rianti**, selaku dosen penguji penulis yang telah memberikan masukan sekaligus apresiasi untuk penulis.
4. **Ibu Laurentia Henrieta Permita Sari Purba**, selaku dosen pembimbing utama penulis yang selalu memberikan bahunya untuk penulis bercerita, rasa percaya, dukungan, dan apresiasi segala bentuk progress penelitian penulis.
5. **Ibu Vira Saamia**, selaku dosen pembimbing pendamping penulis ketika bekerja di laboratorium yang selalu menunjukkan rasa percaya kepada penulis, bahwa penulis mampu melaksanakan dan menyelesaikan penelitian dengan topik besar “DNA mitokondria”.
6. Orang tua terbaik di dunia, **Bapak Deon Seto Kumoro Garjito Purbo** dan **Ibu Zita Dewi Sumarah** yang selalu memberikan dukungan kepada penulis dari awal, pertengahan, hingga akhir proses penelitian dan penulisan naskah akhir. Terima kasih untuk Bapak dan Ibu yang selalu mendengarkan keluh kesah penulis dan tidak pernah putus berdoa untuk keberhasilan penulis dalam menata masa depan.
7. Hanya satu dan selamanya Adik perempuan tercinta penulis, **Inosensia Amaraduhita Paramartika** yang selalu menemani, memberikan *support*, serta menghibur penulis ketika sedang merasa penat. Terima kasih untuk Ino yang selalu berdoa untuk kelancaran skripsi

penulis, kiranya Ino juga dilancarkan dan dimudahkan dalam segala urusan studi maupun perjalanan hidupnya.

8. Kakung **Thomas Aquino Soenarto** dan Uti **Sri Malelowati**; *In memoriam* Kakung **Martinus Samiyo** dan Uti **Maria Immaculata Suwartinah**, yang penulis percaya bahwa doa mereka selalu menyertai penulis dalam proses menyelesaikan studi Sarjana.
9. **Fransisca Victory Kusumaningrum**, selaku sahabat penulis yang sedari akhir Semester I (akhir 2021) sudah berjalan di telapak yang sama. Terima kasih untuk Caca yang selalu menemani 24/7 penulis dalam penyusunan naskah akhir dan dengan cinta mau memberikan waktunya untuk mengisi masa kuliahnya bersama penulis.
10. **Monayanti Simanjuntak**, selaku teman baik seperjuangan penulis yang Tuhan Yesus selalu persatukan dari penerimaan beasiswa, kesamaan minat asisten dosen, pengabdian, seminar proposal, hingga skripsi. Terima kasih banyak untuk Mona yang selalu sabar ketika berdampingan dengan penulis. Kiranya Mona dan penulis dapat terus mendukung satu sama lain dalam meraih cita-cita dan keberhasilan.
11. **Zahra, Perla, Indah, Balqis, Berlian, Delga, Lisa, Retta, Eli, Samuel, Dutarya, Ruben, Dhimas, Edoambarta, dan Vincent**, selaku teman-teman penulis yang Tuhan boleh kasih untuk satu atau lebih momen kami bercerita dan saling mendukung satu sama lain.
12. **Bapak, Ibu, kakak, adik, teman-teman, keluarga, dan saudara lainnya** yang tidak dapat penulis sebutkan namanya satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tugas akhir ini tidak luput dari kekurangan, sehingga memerlukan bantuan berupa saran dan kritik yang membangun dari pembaca. Kiranya masukan yang diterima dapat berkontribusi dalam menyempurnakan tugas akhir ini sebagai pedoman di kemudian hari. Akhir kata, penulis berdoa agar tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi banyak pihak yang membacanya.

Yogyakarta, 19 Mei 2025



Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara

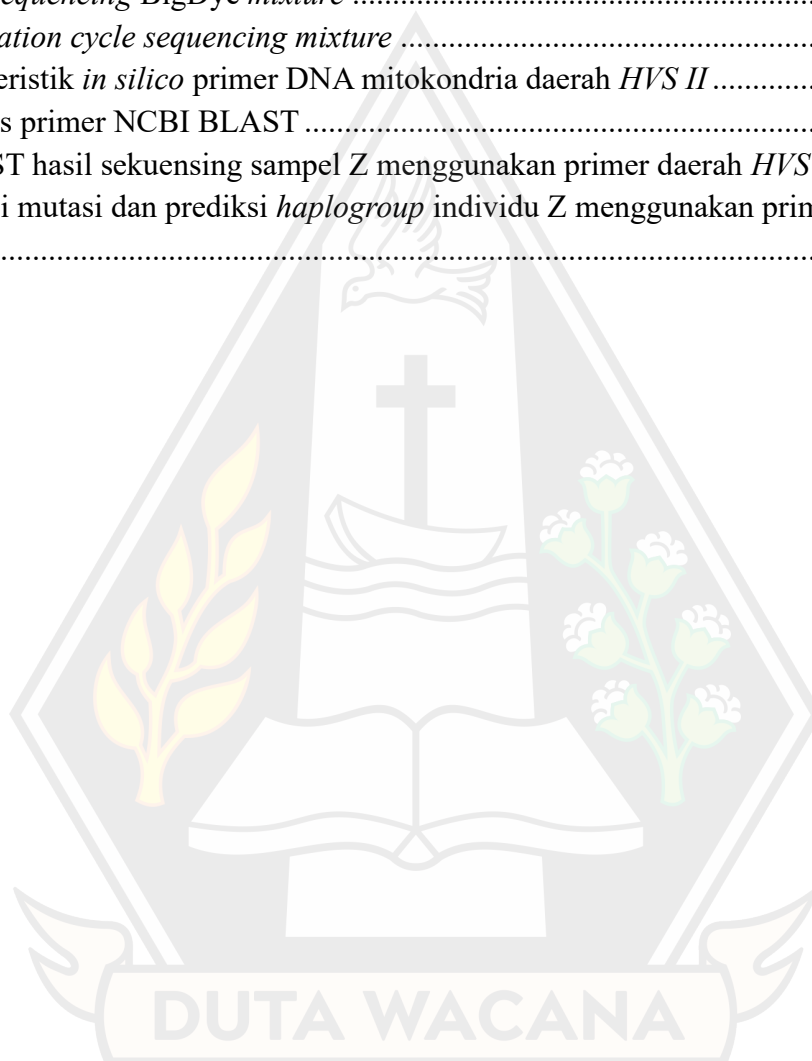
DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL LUAR	i
HALAMAN SAMPUL DALAM.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI	iii
LEMBAR PERSETUJUAN NASKAH SKRIPSI.....	iv
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah.....	3
1.3. Tujuan penelitian	3
1.4. Manfaat penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Biologi forensik.....	4
2.2. DNA mitokondria.....	5
2.3. <i>HVS II D-Loop</i> mtDNA	7
2.4. Heteroplasma pada <i>HVS II D-Loop</i> mtDNA	8
2.5. Pentingnya konstruksi primer spesifik dalam teknik PCR	10
BAB III METODE PENELITIAN	13
3.1. Tempat dan waktu penelitian.....	13
3.1.1. Tempat penelitian.....	13
3.1.2. Waktu penelitian	13
3.2. Bahan penelitian.....	13
3.3. Alat penelitian	13
3.4. Cara kerja.....	15

3.4.1.	Konstruksi primer	16
3.4.2.	Pengumpulan sampel dan preparasi	17
3.4.3.	Ekstraksi DNA	19
3.4.4.	Kuantifikasi DNA.....	20
3.4.5.	Optimasi primer: PCR gradien	20
3.4.6.	Elektroforesis produk PCR.....	22
3.4.7.	Sekuensing produk PCR	23
3.5.	Analisis data	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		27
4.1.	Konstruksi primer <i>HVS II</i>	27
4.2.	Analisis karakteristik <i>in silico</i> primer <i>HVS II</i>	28
4.3.	Optimasi primer <i>HVS II</i> menggunakan teknik PCR gradien	34
4.4.	Konfirmasi spesifisitas primer <i>HVS II</i> terhadap sekuens individu dan prediksi <i>haplogroup</i>	38
4.4.1.	Analisis variasi mutasi.....	42
4.4.2.	Analisis <i>haplogroup</i>	45
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....		49
5.1.	Simpulan	49
5.2.	Saran	49
DAFTAR PUSTAKA		50
LAMPIRAN.....		60

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Karakteristik nDNA dan mtDNA	6
Tabel 2. Posisi daerah <i>HVS II D-Loop</i> mtDNA.....	16
Tabel 3. Syarat dan ketentuan primer sesuai standar universal.....	17
Tabel 4. Profil sampel penelitian.....	18
Tabel 5. <i>PCR mixture</i>	21
Tabel 6. <i>Cycle sequencing BigDye mixture</i>	24
Tabel 7. <i>Purification cycle sequencing mixture</i>	25
Tabel 8. Karakteristik <i>in silico</i> primer DNA mitokondria daerah <i>HVS II</i>	28
Tabel 9. Analisis primer NCBI BLAST	34
Tabel 10. BLAST hasil sekuensing sampel Z menggunakan primer daerah <i>HVS II</i>	40
Tabel 11. Variasi mutasi dan prediksi <i>haplogroup</i> individu Z menggunakan primer daerah <i>HVS II</i>	42



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur DNA mitokondria (Amorim <i>et al.</i> , 2019).....	5
Gambar 2. Peristiwa homoplasma dan heteroplasma DNA mitokondria (Ortiz <i>et al.</i> , 2018).....	9
Gambar 3. Amplifikasi DNA target dalam siklus PCR (Yilmaz <i>et al.</i> , 2012).....	12
Gambar 4. Skema utama penelitian.....	15
Gambar 5. Tampilan kuantifikasi DNA menggunakan NanoVue Nanodrop	20
Gambar 6. Kondisi PCR gradien untuk mengamplifikasi daerah <i>HVS II D-Loop</i> mtDNA	22
Gambar 7. Kondisi <i>cycle sequencing</i> BigDye.....	24
Gambar 8. Peta lokasi primer <i>HVS II</i> pada wilayah <i>D-Loop</i> mtDNA.....	27
Gambar 9. Ilustrasi DNA <i>fold</i> primer <i>HVS II</i>	33
Gambar 10. Optimasi primer <i>HVS II</i> menggunakan teknik PCR gradien.....	36
Gambar 11. Uji sampel menggunakan primer <i>HVS II</i> pada suhu optimal 56.5°C	37
Gambar 12. Kromatogram hasil sekuensing sampel Z dengan primer daerah <i>HVS II</i>	39
Gambar 13. Sejarah migrasi <i>haplogroup</i> N21 dan L4b2 (FamilyTreeDNA Discover, 2022).....	47



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Borang pemantauan bimbingan skripsi	60
Lampiran 2. Surat keterangan kelaikan etik penelitian	62
Lampiran 3. Surat keterangan penelitian Puslabfor Bareskrim Polri	63
Lampiran 4. Format informasi dokumen pemesanan primer	64
Lampiran 5. Data kuantifikasi sampel hasil ekstraksi untuk “optimasi PCR” (N dan M). 65	
Lampiran 6. Data kuantifikasi sampel hasil ekstraksi untuk “uji sampel PCR” (L, S, Z, I, dan R)	66
Lampiran 7. Hasil visualisasi elektroforesis optimasi dan uji sampel format berwarna	67
Lampiran 8. Hasil kuantifikasi DNA PCR	68
Lampiran 9. Ilustrasi <i>setting up Fast Sequencing Assay</i>	69
Lampiran 10. Kandidat pasangan primer <i>HVS II</i> dalam pengujian <i>in vitro</i>	69
Lampiran 11. Hasil BLAST Primer <i>HVS II A Forward</i>	70
Lampiran 12. Hasil BLAST Primer <i>HVS II B Forward</i>	71
Lampiran 13. Hasil BLAST Primer <i>HVS II A & B Reverse</i>	72
Lampiran 14. Hasil edit sekuens menggunakan MEGA X-64 (BioEdit)	73
Lampiran 15. Hasil BLAST sekuensing sampel Z dan <i>coverage cover</i> menggunakan primer <i>HVS II A Forward</i>	74
Lampiran 16. Hasil BLAST sekuensing sampel Z dan <i>coverage cover</i> menggunakan primer <i>HVS II B Forward</i>	75
Lampiran 17. Variasi nukleotida dan prediksi <i>haplogroup</i> primer <i>HVS II A Forward</i> (Mitomaster Mitomap)	76
Lampiran 18. Variasi nukleotida dan prediksi <i>haplogroup</i> primer <i>HVS II B Forward</i> (Mitomaster Mitomap)	77
Lampiran 19. Dokumentasi penelitian	78

ABSTRAK

“Konstruksi dan Optimasi Primer DNA Mitokondria Manusia (*Homo sapiens*) pada Daerah *D-Loop: Hypervariable Segment II* dalam Biologi Forensik”

Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara

Analisis genetik berbasis DNA menjadi metode yang sangat penting dalam forensik. Secara umum, analisis genetik dilakukan dengan cara membuat profil DNA untuk membuktikan kebenaran identitas seseorang dalam suatu kasus. Namun, jejak biologis yang ditemukan di tempat kejadian perkara seringkali mengalami kerusakan atau berasal dari sampel yang sudah tua. Pemeriksaan forensik melalui pendekatan molekuler menggunakan daerah *Hypervariable Segment II* di dalam DNA mitokondria dapat dijadikan sebagai alternatif solusi. DNA mitokondria diwariskan secara maternal dan mempunyai daya salin tinggi sehingga menjadikan DNA mitokondria sebagai marka genetik yang ideal untuk kasus-kasus dengan kondisi tertentu. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan mengoptimalkan primer spesifik DNA mitokondria manusia *D-Loop HVS II* sebagai salah satu komponen penting dalam proses amplifikasi. Primer daerah *HVS II* dirancang dan diseleksi menggunakan situs NCBI, Primer3Plus, dan NetPrimer Biosoft. Primer dirancang untuk memastikan spesifisitas terhadap DNA target dan digunakan untuk mengamplifikasi DNA yang diambil dari sampel usap bukal. DNA dari sampel usap bukal diekstraksi menggunakan PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit. Konsentrasi dan kemurnian ekstrak DNA diukur menggunakan NanoVue. Primer yang dirancang disintesis oleh Genewiz (China) dan optimasi primer dilakukan dengan PCR gradien. Proses pembacaan sekuens individu dilakukan dengan metode sekuensing Sanger. Hasil penelitian ini meliputi dua utas primer selektif pengkode daerah spesifik *HVS II* yang mampu mengamplifikasi daerah target sepanjang 433-513 bp pada suhu *annealing* optimal 56.5°C. Analisis hasil sekuensing menunjukkan adanya heteroplasma dan bahwa individu Z dikelompokkan dalam *haplogroup* N21 dan L4b yang masih dalam satu garis keturunan. Pengujian primer *HVS II A* dan *HVS II B* secara *in silico* dan *in vitro* dapat digunakan untuk mempermudah pemeriksaan kasus-kasus forensik.

Kata kunci: biologi forensik, konstruksi primer, DNA mitokondria, *HVS II D-Loop*, PCR gradien

ABSTRACT

“Construction and Optimization of Human (*Homo sapiens*) Mitochondrial DNA Primers in the *D-Loop Hypervariable Segment II* Region in Forensic Biology”

Antonia Anindyanari Paramartastri Nitisara

DNA-based genetic analysis is a crucial method in forensic science. Generally, genetic analysis is conducted by creating a DNA profile to confirm an individual's identity in a case. However, biological traces found at crime scenes are often degraded or originate from old samples. Forensic examination using a molecular approach that targets the *Hypervariable Segment II (HVS II)* region of mitochondrial DNA can serve as an alternative solution. Mitochondrial DNA is maternally inherited and exists in high copy numbers, making it an ideal genetic marker for cases involving degraded or limited biological samples. This study aims to design and optimize human mitochondrial DNA *D-Loop HVS II* specific primers as one of the important components in the amplification process. Primers targeting the *HVS II* region were designed and selected using the NCBI database, Primer3Plus, and Net-Primer Biosoft. The primers were carefully designed to ensure specificity for the target region and were used to amplify DNA obtained from buccal swab samples. DNA from buccal swab samples was extracted using the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit. The concentration and purity of the extracted DNA were measured using a NanoVue spectrophotometer. The designed primers were synthesized by Genewiz (China), and primer optimization was carried out using gradient PCR. The process of reading individual sequences was carried out using the Sanger sequencing method. The results of this study include two selective primer threads encoding the *HVS II* region that can amplify the target region along 433-513 bp at an optimal annealing temperature of 56.5°C. Analysis of the sequencing results showed the presence of heteroplasmy and that individual Z was grouped into haplogroups N21 and L4b which are still in the same lineage. In silico and in vitro testing of *HVS II A* and *HVS II B* primers can be used to facilitate the examination of forensic cases.

Keywords: forensic biology, primer construction, mitochondrial DNA, *HVS II D-Loop*, gradient PCR

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Analisis genetik berdasarkan utas DNA unik individu untuk tujuan forensik dapat dilakukan melalui pembuatan profil DNA. Keberhasilan pembuatan profil DNA individu sangat bergantung pada kondisi sampel biologis yang ditemukan di tempat kejadian perkara (TKP) (Kuš *et al.*, 2016). Sejak tahun 1996, analisis genetik terhadap orang hilang menggunakan jejak biologis banyak dilakukan menggunakan profil DNA autosomal atau DNA inti (nDNA) (Pajnič *et al.*, 2001). DNA yang diisolasi dari sampel yang sudah tua atau rusak seringkali ditemukan dalam kondisi terdegradasi atau bahkan tidak tersedia sama sekali (Amorim *et al.*, 2019). Kondisi ini mengakibatkan sulitnya mendapatkan DNA autosomal yang cukup untuk proses identifikasi (Pajnič, 2019). Faktor-faktor yang mempengaruhi degradasi DNA inti umumnya berasal dari faktor eksternal yang berdampak pada kualitas sampel biologis, seperti kondisi substrat, lingkungan TKP, serta waktu pengambilan sampel (Buš *et al.*, 2016). Contoh sampel biologis yang telah mengalami degradasi, seperti sisa kerangka tulang (Holland *et al.*, 1993), sisa kerangka gigi (Victoria, 2024), sisa batang rambut, dan kuku jenazah yang sudah membusuk (Allouche *et al.*, 2008) umumnya mengandung DNA inti dalam jumlah yang sangat terbatas (Bhoyar *et al.*, 2024; Szargut *et al.*, 2025). Sebagai alternatif untuk mengatasi keterbatasan dalam penggunaan DNA inti, metode profil genetik berbasis DNA mitokondria (mtDNA) mulai diperkenalkan pada tahun 2004 dalam analisis biologi forensik (Pajnič *et al.*, 2004).

DNA mitokondria adalah material genetik yang terletak di dalam mitokondria, yaitu organel sel bermembran yang berada di sitoplasma (Court, 2021). Dalam biologi forensik, DNA mitokondria sering dimanfaatkan untuk analisis kasus paternitas dan hubungan kekerabatan, khususnya dalam penelusuran garis keturunan maternal. Berbeda dengan DNA inti yang diwariskan dari kedua orang tua, DNA mitokondria hanya diturunkan melalui garis ibu (Amorim *et al.*, 2019a). Selain itu, mtDNA juga sering digunakan dalam analisis DNA purba hingga triase identifikasi korban bencana (Court, 2021). Beberapa kelebihan penggunaan mtDNA, antara lain jumlah daya salin yang tinggi dalam satu sel, resisten terhadap cekaman dan degradasi, serta ukuran genomnya yang kecil (Kowalczyk *et al.*, 2021). DNA mitokondria berbentuk sirkuler dan tersusun atas daerah kontrol (Daud *et al.*,

2014) yang berperan dalam proses replikasi dan transkripsi (Amorim *et al.*, 2019a). Daerah kontrol atau daerah *non-coding* ini dikenal sebagai *Displacement Loop (D-Loop)* mtDNA dengan tiga *segment hypervariable*, yaitu *segment I, II, dan III (HVS I, II, dan III)* (Chong *et al.*, 2005). Analisis profil genetik mtDNA didasarkan pada kondisi variasi *Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)* melalui sekuensing pada dua wilayah paling bervariasi dalam genom, yaitu *HVS I* (nukleotida 16.024-16.365) dan *HVS II* (nukleotida 73-340) (Irwin *et al.*, 2011; Taylor & Turnbull, 2005). Informasi variasi SNPs pada daerah *hypervariable* digunakan untuk membentuk *haplotype* individu, yang kemudian diklasifikasikan ke dalam *haplogroup* berdasarkan kesamaan garis keturunan maternal (H. Li *et al.*, 2024; Rakha *et al.*, 2016). Analisis variasi urutan nukleotida pada daerah *D-Loop* mtDNA memungkinkan analisis individu dalam skala populasi (Yudianto *et al.*, 2022).

Dalam proses analisis sekuens individu menggunakan *D-Loop* mtDNA, diperlukan beberapa tahapan, meliputi ekstraksi DNA, perancangan primer spesifik, amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR, serta proses sekuensing. Hasil sekuensing kemudian akan dibandingkan dengan *Cambridge Reference Sequence (rCRS)* sebagai acuan (H. Li *et al.*, 2024). *Polymerase Chain Reaction (PCR)* merupakan teknik dasar biologi molekuler untuk memperbanyak atau mengamplifikasi daerah atau gen target pada DNA melalui reaksi enzimatik yang bergantung pada spesifisitas primer (McDonald *et al.*, 2024). Pengujian DNA mitokondria saat ini melibatkan amplifikasi wilayah *HVS I* dan *HVS II* menggunakan primer spesifik yang mentarget lebih banyak *conserved region* (Sultana & Sultan, 2018). Konstruksi primer yang tepat menjadi salah satu faktor penting dalam menentukan keberhasilan proses PCR. Amplifikasi spesifik dari gen target mengharuskan primer tidak memiliki kecocokan dengan gen non-target atau bersifat spesifik hanya terhadap gen target (Ye *et al.*, 2012).

Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan optimasi pasangan primer yang spesifik terhadap daerah *HVS II* untuk mengetahui profil DNA seseorang menggunakan sampel usap bukal manusia. Penelitian ini hanya melibatkan satu *segment*, yaitu *HVS II* dari total tiga *segment* daerah kontrol *D-Loop* mtDNA. *HVS II* memiliki tingkat variasi genetik yang tinggi akibat keberadaan heteroplasma, yaitu kondisi ketika terdapat lebih dari satu jenis sekuens DNA mitokondria dalam satu individu (Connell *et al.*, 2023; Santos *et al.*,

2005; Sekiguchi *et al.*, 2003). Hal ini menjadikan *HVS II* sebagai marka penting dalam analisis genetik, khususnya dalam studi kekerabatan maternal (Asari *et al.*, 2008).

1.2. Rumusan masalah

- a. Bagaimana spesifitas primer yang dikonstruksi untuk mengamplifikasi daerah *HVS II D-Loop* mtDNA pada sampel usap bukal manusia?
- b. Bagaimana hasil sekuensing menggunakan primer daerah *HVS II D-Loop* mtDNA berdasarkan variasi mutasi dan efisensinya dalam memprediksi *haplogroup* skala populasi?

1.3. Tujuan penelitian

- a. Mengetahui spesifitas primer yang dikonstruksi dalam mengamplifikasi daerah *HVS II D-Loop* mtDNA pada sampel usap bukal manusia.
- b. Menganalisa hasil sekuensing menggunakan primer daerah *HVS II D-Loop* mtDNA berdasarkan variasi mutasi dan efisensinya dalam memprediksi *haplogroup* skala populasi.

1.4. Manfaat penelitian

- a. Menghasilkan pasangan primer spesifik daerah *HVS II D-Loop* mtDNA dalam skala laboratorium sebagai alternatif metode untuk kondisi sampel rusak dengan DNA autosomal terdegradasi.
- b. Mampu mengembangkan metodologi biologi forensik di Indonesia sebagai upaya penanganan kasus kriminal maupun kasus forensik lainnya secara cepat dan efisien.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Penelitian ini memberikan kesimpulan bahwa:

- a. Primer yang telah dikonstruksi menunjukkan spesifisitas yang baik dalam mengamplifikasi daerah *HVS II* pada wilayah *D-Loop* mtDNA dari sampel usap bukal manusia. Primer daerah *HVS II* mampu menghasilkan amplikon tunggal dengan ukuran 433 bp dan 513 bp. Suhu optimum dalam proses amplifikasi DNA mitokondria adalah 56.5°C.
- b. Analisis efisiensi primer melalui hasil sekuensing memperlihatkan kedua utas primer *forward HVS II* mampu menghasilkan data yang dapat diinterpretasikan secara bioinformatik, meskipun terdapat perbedaan hasil analisis. Hasil analisa menunjukkan bahwa individu Z diklasifikasikan dalam *haplogroup* L4b2 (*HVS II A*) dan N21 (*HVS II B*) yang merupakan *haplogroup* dari beberapa populasi di suatu wilayah Indonesia. Kondisi ini disertai dengan heteroplasma yang terjadi di dalam satu sel bukal individu.

5.2. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya maupun penelitian serupa:

- a. Perlu dilakukan optimasi komponen dan kondisi sekuensing, yaitu penambahan pengulangan sebagai cadangan data duplo dan melibatkan individu lain baik kerabat maupun non-kerabat sebagai pembandingan. Tujuannya adalah melihat kondisi heteroplasma serta memperdalam analisis bioinformatik terhadap prediksi *haplogroup* antar individu atau *intra-species Homo sapiens*.
- b. Pengujian primer *forward* dan *reverse HVS II A* dan *HVS II B* sebaiknya dilakukan juga terhadap sampel terdegradasi, yaitu sampel biologis selain sel bukal atau sel epitel untuk melihat kemampuan primer dalam mengamplifikasi mtDNA pada sampel yang sudah rusak.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5), 91–95. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1019>
- Allouche, M., Hamdoun, M., Mangin, P., & Castella, V. (2008). Genetic identification of decomposed cadavers using nails as DNA source. *Forensic Science International: Genetics*, 3(1), 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.07.008>
- Alshalah, Z. J., Nader, M. I., Alsaad, A. H., & Khaleel, A. I. (2022). Estimation of Mitochondrial DNA Sequences (HVI and HV II) Variations in Iraqi Population. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 21(2), 370–385.
- Al-Shuhaib, M. B. S., & Hashim, H. O. (2023). Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00587-6>
- Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019a). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7, 1–24. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019b). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7, e7314. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Droiun, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature Publishing Group*, 290(5806), 457–465. <http://dx.doi.org/10.1038/290457a0>
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23(2), 147–147. <https://doi.org/10.1038/13779>
- Anissa, R. K., Lisdiana, L., & Widyayanti, A. T. (2023). Optimasi Metode Nested PCR untuk Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* AHPND pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v13n1.p1-13>
- Apte, A., & Daniel, S. (2009). PCR Primer Design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(3), pdb.ip65. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip65>
- Asari, M., Azumi, J., Shimizu, K., & Shiono, H. (2008). Differences in tissue distribution of HV2 length heteroplasmy in mitochondrial DNA between mothers and children. *Forensic Science International*, 175(2–3), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.06.015>
- Asif, S., Khan, M., Arshad, M. W., & Shabbir, M. I. (2021). PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide. *Research in Molecular Medicine*, 9(2), 81–102. <https://doi.org/10.32598/rmm.9.2.1189.1>
- Astriani, P. L., Ratnayani, K., & Yowani, S. C. (2014). OPTIMASI SUHU ANNEALING DAN AMPLIFIKASI 0,3 kb GEN *rpoB* DI HULU DARI RRDR PADA ISOLAT P16 *Mycobacterium tuberculosis* MULTIDRUG RESISTANT DI BALI DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 2(2), 9–13.
- Bhoyar, L., Mehar, P., & Chavali, K. (2024). An overview of DNA degradation and its implications in forensic caseworks. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 14(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s41935-024-00389-y>
- Blakesley, R. W. (2001). Cycle Sequencing. In C. A. Graham & A. J. M. Hill (Eds.), *DNA Sequencing Protocols* (pp. 101–112). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-113-2:101>

- Borah, P. (2011). Primer designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134–136.
- Budowle, B., Wilson, M. R., DiZinno, J. A., Stauffer, C., Fasano, M. A., Holland, M. M., & Monson, K. L. (1999). Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. *Forensic Science International*, 103(1), 23–35. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00042-0](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00042-0)
- Bukyaya, J. L., Tejasvi, M. L. A., Avinash, A., P., C. H., Talwade, P., Afroz, M. M., Pokala, A., Neela, P. K., Shyamilee, T. K., & Srisha, V. (2021). DNA Profiling in Forensic Science: A Review. *Global Medical Genetics*, 08(04), 135–143. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1728689>
- Buś, M. M., Nilsson, M., & Allen, M. (2016). Analysis of Mitochondrial DNA from a Burned, Ninhydrin-Treated Paper Towel. *Journal of Forensic Sciences*, 61(3), 828–832. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13054>
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Butler, J. M., & Levin, B. C. (1998). Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends in Biotechnology*, 16(4), 158–162. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01173-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01173-1)
- Cabrera, V. M., Marrero, P., Abu-Amero, K. K., & Larruga, J. M. (2018). Carriers of mitochondrial DNA macrohaplogroup L3 basal lineages migrated back to Africa from Asia around 70,000 years ago. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1211-4>
- Calloway, C. D., Reynolds, R. L., Herrin, G. L., & Anderson, W. W. (2000). The Frequency of Heteroplasmy in the HVII Region of mtDNA Differs across Tissue Types and Increases with Age. *The American Journal of Human Genetics*, 66(4), 1384–1397. <https://doi.org/10.1086/302844>
- Carrasco, A. G. M., Chammas, R., & Furuya, T. K. (2025). Mitochondrial DNA alterations in precision oncology: Emerging roles in diagnostics and therapeutics. *Clinics*, 80, 100570. <https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2024.100570>
- Case, J. T., & Wallace, D. C. (1981). Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. *Somatic Cell Genetics*, 7(1), 103–108. <https://doi.org/10.1007/BF01544751>
- Chang, D. D., & Clayton, D. A. (1985). Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(2), 351–355. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.351>
- Chango, X., Flor-Unda, O., Gil-Jiménez, P., & Gómez-Moreno, H. (2024). Technology in Forensic Sciences: Innovation and Precision. *Technologies*, 12(8), 120. <https://doi.org/10.3390/technologies12080120>
- Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*, 106(1), 135–159. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt017>
- Chinnery, P. F., Taylor, G. A., Howell, N., Brown, D. T., Parsons, T. J., & Turnbull, D. M. (2001). Point Mutations of the mtDNA Control Region in Normal and Neurodegenerative Human Brains. *The American Journal of Human Genetics*, 68(2), 529–532. <https://doi.org/10.1086/318204>
- Chong, M. D., Calloway, C. D., Klein, S. B., Orrego, C., & Buoncristiani, M. R. (2005). Optimization of a duplex amplification and sequencing strategy for the HVI/HVII regions of human mitochondrial DNA for forensic casework. *Forensic Science International*, 154(2–3), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.128>

- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Connell, J. R., Lea, R. A., Haupt, L. M., & Griffiths, L. R. (2023). Mitochondrial DNA Analysis in Population Isolates: Challenges and Implications for Human Identification. *Current Molecular Biology Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s40610-023-00155-4>
- Court, D. S. (2021). Mitochondrial DNA in forensic use. *Emerging Topics in Life Sciences*, 5(3), 415–426. <https://doi.org/10.1042/ETLS20210204>
- Daud, S., Shahzad, S., Shafique, M., Bhinder, M. A., Niaz, M., Ali, A., & Husnain, T. (2014). Optimization and Validation of PCR protocol for three Hypervariable Regions (HVI, HVII and HVIII) in Human Mitochondrial DNA. *Advancements in Life Sciences*, 1(3), 165–170.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3(3), S30–S37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>
- Doda, J. N., Wright, C. T., & Clayton, D. A. (1981). Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6116–6120. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6116>
- Ebner, S., Lang, R., Mueller, E. E., Eder, W., Oeller, M., Moser, A., Koller, J., Paulweber, B., Mayr, J. A., Sperl, W., & Kofler, B. (2011). Mitochondrial Haplogroups, Control Region Polymorphisms and Malignant Melanoma: A Study in Middle European Caucasians. *PLoS ONE*, 6(12), e27192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027192>
- Elkins, K. M. (2015). Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology. *Springer Science+Business Media New York*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_2
- Erjavec, M. S. (2020). Annealing Temperature of 55°C and Specificity of Primer Binding in PCR Reactions. In M. L. Nagpal, O.-M. Boldura, C. Baltă, & S. Enany (Eds.), *Synthetic Biology—New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85164>
- Forensic MCQ. (2022). *History and development of forensic biology and DNA analysis* [Online post]. <https://forensicmcq.com/history-and-development-of-forensic-biology-and-dna-analysis/>
- Fregel, R., Cabrera, V., Larruga, J. M., Abu-Amero, K. K., & González, A. M. (2015). Carriers of Mitochondrial DNA Macrohaplogroup N Lineages Reached Australia around 50,000 Years Ago following a Northern Asian Route. *PLOS ONE*, 10(6), e0129839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129839>
- Gabriel, M. N., Calloway, C. D., Reynolds, R. L., & Primorac, D. (2001). Population Variation of Human Mitochondrial DNA Hypervariable Regions I and II in 105 Croatian Individuals Demonstrated by Immobilized Sequence-specific Oligonucleotide Probe Analysis. *Croatian Medical Journal Forensic Sciences*, 42(3), 328–335.
- Garg, N. (2008). PCR Primer Design: DREB Genes. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 01(01). <https://doi.org/10.4172/jcsb.1000002>
- Ghannam, M. G., & Varacallo, M. A. (2023). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6715–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715>

- Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E., & Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics*, 6, 130–135.
- Grandhi, S., Bosworth, C., Maddox, W., Sensiba, C., Akhavanfard, S., Ni, Y., & LaFramboise, T. (2017). Heteroplasmic shifts in tumor mitochondrial genomes reveal tissue-specific signals of relaxed and positive selection. *Human Molecular Genetics*, 26(15), 2912–2922. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx172>
- Greenberg, B. D., Newbold, J. E., & Sugino, A. (1983). Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*, 21(1–2), 33–49. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90145-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90145-2)
- Gumilar, G. G., Susanti, E. S., & Munawaroh, H. S. H. (2021). Variasi Mutasi Daerah HVI DNA Mitokondria Suku BimaDompnu Nusa Tenggara Barat. *Chemica Isola*, 1(1), 31–36.
- Hahn, A., & Zuryn, S. (2019). Mitochondrial Genome (mtDNA) Mutations that Generate Reactive Oxygen Species. *Antioxidants*, 8(9), 392. <https://doi.org/10.3390/antiox8090392>
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2000). Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17–29.
- Hanselle, T., Otte, M., Schnibbe, T., Smythe, E., & Krieg-Schneider, F. (2003). Isolation of genomic DNA from buccal swabs for forensic analysis, using fully automated silica-membrane purification technology. *Legal Medicine*, 5, S145–S149. [https://doi.org/10.1016/S1344-6223\(02\)00099-8](https://doi.org/10.1016/S1344-6223(02)00099-8)
- Holland, M., Fisher, D., Mitchell, L., Rodriquez, W., Canik, J., Merril, C., & Weedn, V. (1993). Mitochondrial DNA Sequence Analysis of Human Skeletal Remains: Identification of Remains from the Vietnam War. *Journal of Forensic Sciences*, 38, 542–553. <https://doi.org/10.1520/JFS13439J>
- Hong, S. B., Kim, K. C., & Kim, W. (2015). Population and forensic genetic analyses of mitochondrial DNA control region variation from six major provinces in the Korean population. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.017>
- Hung, J.-H., & Weng, Z. (2016). Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(9), pdb.prot093096. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093096>
- Hutter, G., Nickenig, C., Garritsen, H., Hellenkamp, F., Hoerning, A., Hiddemann, W., & Dreyling, M. (2004). Use of polymorphisms in the noncoding region of the human mitochondrial genome to identify potential contamination of human leukemia-lymphoma cell lines. *The Hematology Journal*, 5(1), 61–68. <https://doi.org/10.1038/sj.thj.6200317>
- Integrated DNA Technologies. (2024). *Checking oligos for Primer-Dimers and Hairpins* | IDT. Integrated DNA Technologies. <https://sg.idtdna.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>
- Irwin, J. A., Parson, W., Coble, M. D., & Just, R. S. (2011). mtGenome reference population databases and the future of forensic mtDNA analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3), 222–225. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.008>
- Ju, Y. S., Alexandrov, L. B., Gerstung, M., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Ramakrishna, M., Davies, H. R., Papaemmanuil, E., Gundem, G., Shlien, A., Bolli, N., Behjati, S., Tarpey, P. S., Nangalia, J., Massie, C. E., Butler, A. P., Teague, J. W., Vassiliou, G. S., Green, A. R., ... Campbell, P. J. (2014). Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *eLife*, 3, e02935. <https://doi.org/10.7554/eLife.02935>

- Khair, S. Z. N. M., Abd Radzak, S. M., & Mohamed Yusoff, A. A. (2021). The Uprising of Mitochondrial DNA Biomarker in Cancer. *Disease Markers*, 2021, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2021/7675269>
- Koressaar, T., & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Kowalczyk, M., Staniszewski, A., Kamińska, K., Domaradzki, P., & Horecka, B. (2021). Advantages, Possibilities, and Limitations of Mitochondrial DNA Analysis in Molecular Identification. *Folia Biologica (Kraków)*, 69(3), 101–111. https://doi.org/10.3409/fb_69-3.12
- Krishnan, K. J., Reeve, A. K., Samuels, D. C., Chinnery, P. F., Blackwood, J. K., Taylor, R. W., Wanrooij, S., Spelbrink, J. N., Lightowlers, R. N., & Turnbull, D. M. (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nature Genetics*, 40(3), 275–279. <https://doi.org/10.1038/ng.f.94>
- Kumar, A., & Chordia, N. (2015). In Silico PCR Primer Designing and Validation. *Methods in Molecular Biology*, 1275, 143–151. https://doi.org/DOI 10.1007/978-1-4939-2365-6_10
- Kumar, S., Kaur, R., Malik, M. A., Angmo, D., & Kaur, J. (2024). Extranuclear DNA Variations in the Susceptibility of Glaucoma. *Middle East African Journal of Ophthalmology*, 30(2), 113–120. https://doi.org/10.4103/meajo.meajo_132_23
- Kuś, M., Ossowski, A., & Zielińska, G. (2016). Comparison of three different DNA extraction methods from a highly degraded biological material. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 40, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2016.03.002>
- Li, H., Cao, Y., Yang, F., Liu, X., Tao, R., Xia, R., Zhu, R., Jiang, L., Liu, S., & Li, C. (2024). Quantitation of human mitochondrial DNA and whole mtGenomes sequencing of fingernail/hair shaft samples. *Forensic Sciences Research*, owae018. <https://doi.org/10.1093/fsr/owae018>
- Li, M., Schönberg, A., Schaefer, M., Schroeder, R., Nasidze, I., & Stoneking, M. (2010). Detecting Heteroplasmy from High-Throughput Sequencing of Complete Human Mitochondrial DNA Genomes. *The American Journal of Human Genetics*, 87(2), 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.014>
- Lim, J., Shin, S. G., Lee, S., & Hwang, S. (2011). Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 5(1), 28–39. <https://doi.org/10.1007/s11783-011-0302-x>
- Lutz, S., Wittig, H., Weisser, H.-J., Heizmann, J., Junge, A., Dima-Simonin, N., Parson, W., Edelman, J., Anslinger, K., Jung, S., & Augustin, C. (2000). Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Science International*, 113(1–3), 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00222-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00222-X)
- Maitriani, L. K. B., & Wirajana, I. N. (2015). DESAIN PRIMER UNTUK AMPLIFIKASI FRAGMENT GEN inhA ISOLAT 134 MULTIDRUG RESISTANCE TUBERCULOSIS (MDR-TB) DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION. *Journal of Applied Chemistry*, 3.
- Markham, Nicholas. R., & Zuker, M. (Eds.). (2008). *Bioinformatics*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-429-6>
- Martin, B., & Linacre, A. (2020). Direct PCR: A review of use and limitations. *Science & Justice*, 60(4), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2020.04.003>

- McDonald, C., Taylor, D., & Linacre, A. (2024). PCR in Forensic Science: A Critical Review. *Genes*, 15(4), 438. <https://doi.org/10.3390/genes15040438>
- Merheb, M., Matar, R., Hodeify, R., Siddiqui, S. S., Vazhappilly, C. G., Marton, J., Azharuddin, S., & Al Zouabi, H. (2019). Mitochondrial DNA, a Powerful Tool to Decipher Ancient Human Civilization from Domestication to Music, and to Uncover Historical Murder Cases. *Cells*, 8(5), 433. <https://doi.org/10.3390/cells8050433>
- Mitchell, S. L., Goodloe, R., Brown-Gentry, K., Pendergrass, S. A., Murdock, D. G., & Crawford, D. C. (2014). Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. *Human Genetics*, 133(7), 861–868. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1421-9>
- Miura, S., Sasaki, A., Kasai, S., Sugawara, T., Maeda, Y., Goto, S., Kasai, T., Shimizume, N., Jung, S., Iwane, T., Itoh, K., & Matsubara, A. (2022). Association of mitochondrial DNA haplogroup and hearing impairment with aging in Japanese general population of the Iwaki Health Promotion Project. *Journal of Human Genetics*, 67(6), 369–375. <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01011-6>
- Morovvati, S., Modarresi, M., Habibi, G., Kiarudi, Y., Karami, A., & Peyvandi, A. A. (2007). Sequence Analysis of Mitochondrial DNA Hypervariable Regions: An Approach to Personal Identification. *Archives of Medical Research*, 38(3), 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.10.011>
- mtDNA Haplogroup N21*. (2022, 2025). FamilyTreeDNA Discover. <https://discover.familytreedna.com/mtDNA/N21/story>
- Naue, J., Hörer, S., Sängler, T., Strobl, C., Hatzer-Grubwieser, P., Parson, W., & Lutz-Bonengel, S. (2015). Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA. *Mitochondrion*, 20, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.12.002>
- Nicholls, T. J., & Minczuk, M. (2014). In D-loop: 40years of mitochondrial 7S DNA. *Experimental Gerontology*, 56, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.027>
- Nuryady, Moh. M., Purwanti, E., Aldina, S. N., Wahyuni, S., Permana, T. I., Khoiriyah, Z., & Ariesaka, K. M. (2024). Desain Primer PCR Spesifik Secara In Silico Untuk Amplifikasi Gen COX-1 (Cytochrome Oxidase Subunit I) DNA Mitokondria Pada *Aedes aegypti*. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 18(1), 23–32. <https://doi.org/10.15408/kauniyah.v1i1.33726>
- Ortiz, G. G., Mireles-Ramírez, M. A., González-Usigli, H., Macías-Islas, M. A., Bitzer-Quintero, O. K., Torres-Sánchez, E. D., Sánchez-López, A. L., Ramírez-Jirano, J., Ríos-Silva, M., & Torres-Mendoza, B. (2018). Mitochondrial Aging and Metabolism: The Importance of a Good Relationship in the Central Nervous System. In H. Seligmann (Ed.), *Mitochondrial DNA - New Insights*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76652>
- Pajnič, I. Z. (2019). Uporaba mitohondrijske DNA v forenzičnih preiskavah. *Slovenian Medical Journal*, 89(1–2), 55–72. <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.2932>
- Pajnič, I. Z., Balažic, J., & Komel, R. (2004). Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population. *International Journal of Legal Medicine*, 118(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00414-003-0394-3>
- Pajnič, I. Z., Šterlinko, H., Balažic, J., & Komel, R. (2001). Parentage testing with 14 STR loci and population data for 5 STRs in the Slovenian population. *International Journal of Legal Medicine*, 114(3), 178–180. <https://doi.org/10.1007/s004140000179>
- Peng, M.-S., Quang, H. H., Dang, K. P., Trieu, A. V., Wang, H.-W., Yao, Y.-G., Kong, Q.-P., & Zhang, Y.-P. (2010). Tracing the Austronesian Footprint in Mainland Southeast Asia: A

- Perspective from Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 27(10), 2417–2430. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq131>
- Pfeiffer, H., Brinkmann, B., Hühne, J., Rolf, B., Morris, A. A., Steighner, R., Holland, M. M., & Forster, P. (1999). Expanding the forensic German mitochondrial DNA control region database: Genetic diversity as a function of sample size and microgeography. *International Journal of Legal Medicine*, 112(5), 291–298. <https://doi.org/10.1007/s004140050252>
- Picard, M., Wallace, D. C., & Burelle, Y. (2016). The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*, 30, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.003>
- Pierron, D., Heiske, M., Razafindrazaka, H., Rakoto, I., Rabetokotany, N., Ravololomanga, B., Rakotozafy, L. M.-A., Rakotomalala, M. M., Razafiarivony, M., Rasoarifetra, B., Raharijesy, M. A., Razafindralambo, L., Ramilisonina, Fanony, F., Lejambale, S., Thomas, O., Mohamed Abdallah, A., Rocher, C., Arachiche, A., ... Letellier, T. (2017). Genomic landscape of human diversity across Madagascar. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.1704906114>
- Pooja, S., Sudesh, D., Poonam, K., Joginder, S. D., & Suresh, K. G. (2014). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. *African Journal of Biotechnology*, 13(19), 1920–1928. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13459>
- Pranata, A., & Ahda, Y. (2021). DESAIN PRIMER UNTUK IDENTIFIKASI GEN LUCIFERASE PADA KUNANG-KUNANG GENUS *Lamprigera* (Lampyridae: Coeloptera). *Prosiding SEMNAS BIO 2021*, 1739–1747.
- Purkan, Afaf, B., Magdalena, S. H., Lia, N. E., Redianti, G. N., Rizka, A. A., Presty, N., & Deby, T. J. (2013). Varian in D-Loop of mitochondrial DNA fro. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, 3(6), 109–114. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14303/irjbb.2013.015>
- Putri, G. I., Nurjayadi, M., Declan, J. L., Juliansyah, D. A., Fahriza, T., Azzahra, M., Kartika, I. R., Kurniadewi, F., Sukmawati, D., Saamia, V., Saputro, A. O., Wiranatha, I. M., Abomoelak, B., & El-Enshasy, H. A. (2023). PRIMERS USING POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 10(2), 346–354.
- Rakha, A., Peng, M.-S., Bi, R., Song, J.-J., Salahudin, Z., Adan, A., Israr, M., & Yao, Y.-G. (2016). EMPOP-quality mtDNA control region sequences from Kashmiri of Azad Jammu & Kashmir, Pakistan. *Forensic Science International: Genetics*, 25, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.08.009>
- Rizky, B. N. (2020). DNA forensic evidence from oral cavity. *Biochemical and Cellular Archives*, 20, 2817–2821. <https://doi.org/10.35124/bca.2020.20.S1.2817>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (Vol. 1275, pp. 31–56). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Rubin, J. D., Vogel, N. A., Gopalakrishnan, S., Sackett, P. W., & Renaud, G. (2023). HaploCart: Human mtDNA haplogroup classification using a pangenomic reference graph. *PLOS Computational Biology*, 19(6), e1011148. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011148>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *SCIENCE*, 239, 487–491.
- Salas, A., Lareu, V., Calafell, F., Bertranpetit, J., & Carracedo, Á. (2000). mtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies. *European Journal of Human Genetics*, 8(12), 964–974. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200563>

- Santos, C., Montiel, R., Sierra, B., Bettencourt, C., Fernandez, E., Alvarez, L., Lima, M., Abade, A., & Aluja, M. P. (2005). Understanding Differences Between Phylogenetic and Pedigree-Derived mtDNA Mutation Rate: A Model Using Families from the Azores Islands (Portugal). *Molecular Biology and Evolution*, 22(6), 1490–1505. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi141>
- Sari, M. T., Susilowati, A., Aritonang, S. B., Astirin, O. P., Etikawati, N., & Saamia, V. (2024). Primer design of the CO1 gene (Cytochrome Oxidase-1) for Sumatran elephant (*Elephas maximus sumatranus*) for rapid detection using real-time PCR method. *Biodiversitas*, 25(10), 3840–3849. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d251044>
- Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S., & Yowani, S. C. (2018). DESAIN DNA PRIMER SECARA IN SILICO SEBAGAI PENDETEKSI MUTASI GEN *gyrA* Mycobacterium tuberculosis UNTUK METODE POLYMERASE CHAIN REACTION. *Journal of Applied Chemistry*, 6.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*, V, 93–102.
- Satiyarti, R. B., Sajati, N. D., & Mulyani, R. (2020). Identifikasi Mutasi DNA Daerah HV1 dan HV2 D-Loop Mitokondria dari Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2). *Jurnal Kartika Kimia*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.26874/jkk.v3i1.41>
- Scally, A. (2016). The mutation rate in human evolution and demographic inference. *Current Opinion in Genetics & Development*, 41, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.07.008>
- Sekiguchi, K., Kasai, K., & Levin, B. C. (2003a). Inter- and intragenerational transmission of a human mitochondrial DNA heteroplasmy among 13 maternally-related individuals and differences between and within tissues in two family members. *Mitochondrion*, 2(6), 401–414. [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(03\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(03)00028-X)
- Sekiguchi, K., Kasai, K., & Levin, B. C. (2003b). Inter- and intragenerational transmission of a human mitochondrial DNA heteroplasmy among 13 maternally-related individuals and differences between and within tissues in two family members. *Mitochondrion*, 2(6), 401–414. [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(03\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(03)00028-X)
- Šenovská, A., Drozdová, E., Brzobohatá, K., Chocholová Eva, Fialová Dana, & Šmerda Jaromír. (2021). Sanger sequencing of mitochondrial hypervariable region of ancient samples for DNA authentication and screening before high-throughput sequencing. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 40(A). <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2021.103216>
- Sessa, F., & Salerno, M. (2024). Special Issue “Molecular Biology in Forensic Science: Past, Present and Future.” *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2883. <https://doi.org/10.3390/ijms25052883>
- Sigurðardóttir, S., Helgason, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K., & Donnelly, P. (2000). The Mutation Rate in the Human mtDNA Control Region. *The American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1599–1609. <https://doi.org/10.1086/302902>
- Sołtyszewski, I. (2022). HISTORY, PRESENT AND FUTURE OF FORENSIC BIOLOGY. *Kriminalistika*, 2, 343–357.
- Staff, B. T. B. (2019, September 25). *PCR Primer Design Tips*. Behind the Bench. <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
- Stoneking, M. (2000). Hypervariable Sites in the mtDNA Control Region Are Mutational Hotspots. *The American Journal of Human Genetics*, 67(4), 1029–1032. <https://doi.org/10.1086/303092>

- Strandgren, C. (2008). *Studies of the Diversity of Lactobacillus spp. In Fecal Samples Using PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.*
- Sultana, G. N. N., & Sultan, M. Z. (2018). Medicolegal Aspects and Examination Techniques in Exhumation Cases with Alleged Human Rights Violation. *Journal of Forensic Sciences & Criminal Investigation*, 9(1). <https://doi.org/10.19080/JFSCI.2018.09.555755>
- Szargut, M., Cytacka, S., Dowejko, J., Zielińska, G., Diepenbroek, M., & Ossowski, A. (2025). Comparisons of aged samples and modern references provide algorithm for mtDNA analysis in challenging material. *Scientific Reports*, 15(1), 6682. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90375-8>
- Taanman, J.-W. (1999). The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1410(2), 103–123. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)
- Tagliabracci, A., & Turchi, C. (2020). mtDNA exploitation in forensics. In *The Human Mitochondrial Genome* (pp. 145–169). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819656-4.00007-3>
- Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 389–402. <https://doi.org/10.1038/nrg1606>
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145–154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>
- Tin, A., Grams, M. E., Ashar, F. N., Lane, J. A., Rosenberg, A. Z., Grove, M. L., Boerwinkle, E., Selvin, E., Coresh, J., Pankratz, N., & Arking, D. E. (2016). Association between Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood and Incident CKD in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(8), 2467–2473. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015060661>
- Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.09.005>
- Uren, C., Kim, M., Martin, A. R., Bobo, D., Gignoux, C. R., Van Helden, P. D., Möller, M., Hoal, E. G., & Henn, B. M. (2016). Fine-Scale Human Population Structure in Southern Africa Reflects Ecogeographic Boundaries. *Genetics*, 204(1), 303–314. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187369>
- Vashist, V., Banthia, N., Kumar, S., & Agrawal, P. (2023). A systematic review on materials, design, and manufacturing of swabs. *Annals of 3D Printed Medicine*, 9, 100092. <https://doi.org/10.1016/j.stlm.2022.100092>
- Verma, K., Sharma, S., Sharma, A., Dalal, J., & Bhardwaj, T. (2018). Data on haplotype diversity in the hypervariable region I, II and III of mtDNA amongst the Brahmin population of Haryana. *Data in Brief*, 17, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.01.011>
- Victoria, M. (2024). Mitochondrial DNA Analysis of Teeth for Identification of Natural Disaster Victims in Manila, Philippines. *Sriwijaya Journal of Forensic and Medicolegal*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.59345/sjfm.v2i1.124>
- Violita, V., Achyar, A., Zulyusri, Z., Atifah, Y., Putri, D. H., & Nabilah, R. (2024). Primer Design and Optimization of Annealing Temperature for Gene Amplification GSTL2 on Rice. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 17(2), 377–386. <https://doi.org/10.15408/kauniyah.v17i2.32859>

- Wallace, D. C. (1992). Mitochondrial Genetics: A Paradigm for Aging and Degenerative Diseases? *Science*, 256(5057), 628–632. <https://doi.org/10.1126/science.1533953>
- Wang, T.-Y., Wang, L., & Wang, F. (2011). Methodology Simplified preparation of a DNA ladder using PCR. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1631–1635. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1177>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yilmaz, A., Onen, H. I., Alp, E., & Menevse, S. (2012). Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. In *Polymerase Chain Reaction* (pp. 229–254). InTech. <https://doi.org/10.5772/37356>
- Yoshinaga, N., & Numata, K. (2022). Rational Designs at the Forefront of Mitochondria-Targeted Gene Delivery: Recent Progress and Future Perspectives. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8(2), 348–359. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c01114>
- Young, M. J., Sachidanandam, R., Hales, D. B., Brard, L., Robinson, K., Rahman, Md. M., Khadka, P., Groesch, K., & Young, C. K. J. (2022a). Identification of Somatic Mitochondrial DNA Mutations, Heteroplasmy, and Increased Levels of Catenanes in Tumor Specimens Obtained from Three Endometrial Cancer Patients. *Life*, 12(4), 562. <https://doi.org/10.3390/life12040562>
- Young, M. J., Sachidanandam, R., Hales, D. B., Brard, L., Robinson, K., Rahman, Md. M., Khadka, P., Groesch, K., & Young, C. K. J. (2022b). Identification of Somatic Mitochondrial DNA Mutations, Heteroplasmy, and Increased Levels of Catenanes in Tumor Specimens Obtained from Three Endometrial Cancer Patients. *Life*, 12(4), 562. <https://doi.org/10.3390/life12040562>
- Youngest, R., Saamia, V., Oktaviani, D. A., Aritonang, S. B., Wiranatha, I. M., & Rofiq, I. (2022). Str Locus Mutations In Paternity Case. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 24(1), 34–49. <https://doi.org/10.20473/jbp.v24i1.2022.34-49>
- Yuan, Y., Ju, Y. S., Kim, Y., Li, J., Wang, Y., Yoon, C. J., Yang, Y., Martincorena, I., Creighton, C. J., Weinstein, J. N., Xu, Y., Han, L., Kim, H.-L., Nakagawa, H., Park, K., Campbell, P. J., Liang, H., PCAWG Consortium, Aaltonen, L. A., ... Von Mering, C. (2020). Comprehensive molecular characterization of mitochondrial genomes in human cancers. *Nature Genetics*, 52(3), 342–352. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0557-x>
- Yudianto, A., Sosiawan, A., Palupi, R., & Novita, M. (2022). Sibling Analysis Using Mitochondrial DNA Displacement Loop (mtDNA D-Loop) Region in The Identification of Madurese Population. *Sapporo Medical Journal*, 56(04).
- Yulita, N., Achyar, A., & Putri, D. H. (2025). Primer Design and Annealing Temperature Optimization for Catalase (CAT) Gene Amplification in Rice (*Oryzasativa*L.). *Jurnal Serambi Biologi*, 8(3), 437–444.
- Yusoff, A. A. M., Mohd Khair, S. Z. N., Wan Abdullah, W. S., Abd Radzak, S. M., & Abdullah, J. M. (2020). Somatic mitochondrial DNA D-loop mutations in meningioma discovered: A preliminary data. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 16(6), 1517. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_1132_16
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). *PCR Past, Present and Future*. 69(4).