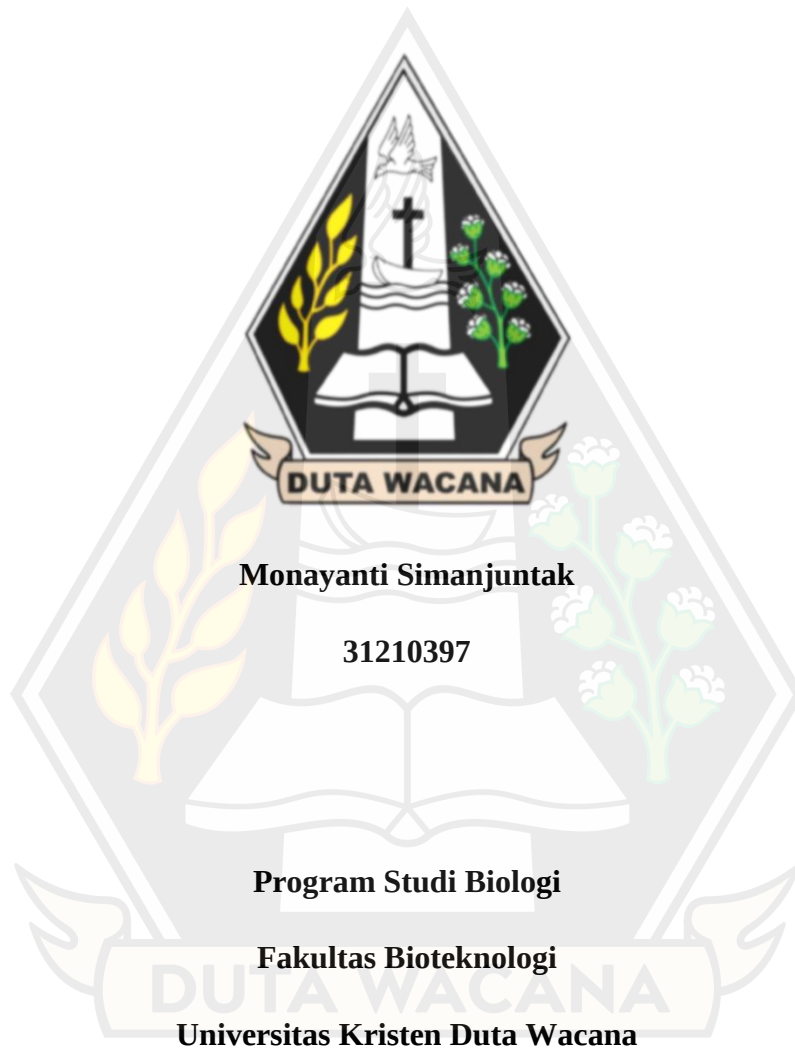


Desain dan Optimasi Primer dalam Identifikasi *Hypervariable Segment I D-Loop* DNA Mitokondria (mtDNA) pada Sampel *Buccal Swab* Manusia (*Homo sapiens*)

SKRIPSI



Monayanti Simanjuntak

31210397

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2025

Desain dan Optimasi Primer dalam Identifikasi *Hypervariable Segment I D-Loop* DNA Mitokondria (mtDNA) pada Sampel *Buccal Swab* Manusia (*Homo sapiens*)

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh

Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana



Monayanti Simanjuntak

31210397

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2025

PERNYATAAN PENYERAHAN KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Monayanti Simanjuntak
NIM/NIP/NIDN : 31210397
Program Studi : Biologi
Judul Karya Ilmiah : Desain dan Optimasi Primer dalam Identifikasi *Hypervariable Segment 1* D-loop DNA Mitokondria (mtDNA) pada Sampel *Buccal Swab* Manusia (*Homo sapiens*)

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)

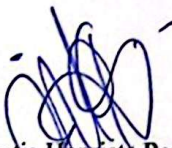
Karya Ilmiah dalam bentuk jurnal nasional terakreditasi
Scinta-2 yang akan di submit ke Jurnal Hayati IPB.
Jurnal yang ditulis dalam versi Bahasa Inggris mengikuti ketentuan Jurnal

**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 Permata Sari Purba, S.Si
NIDN/NIDK 0516069202

Yang menyatakan,



Monayanti Simanjuntak
NIM 31210397

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Skripsi dengan judul:

Desain dan Optimasi Primer dalam Identifikasi *Hypervariable Segment I D-loop* DNA Mitokondria (mtDNA) pada Sampel *Buccal Swab* Manusia (*Homo sapiens*)

Telah diajukan dan pertahankan oleh:

MONAYANTI SIMANJUNTAK

31210397

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, 04 Juli 2025

Dekan,

Ketua Program Studi Biologi,


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


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

LEMBAR PERSETUJUAN NASKAH SKRIPSI

Judul Skripsi : Desain dan Optimasi Primer dalam Identifikasi *Hypervariable Segment I D-Loop DNA Mitokondria (mtDNA)* pada Sampel *Buccal Swab Manusia (Homo sapiens)*

Nama : Monayanti Simanjuntak

Nomor Induk Mahasiswa (NIM) : 31210397

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

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

Hari/Tanggal Presentasi : 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

DU TA WA RA NA

Dwi Aditiyarini, S.Si., M Biotech., M.Sc.

NIK: 214 E 556

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Monayanti Simanjuntak

NIM : 31210397

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul:

“Desain dan Optimasi Primer dalam Identifikasi *Hypervariable Segment I* D-Loop DNA Mitokondria (mtDNA) pada Sampel *Buccal Swab* Manusia (*Homo sapiens*)”

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 dalam naskah ini dan disebutkan dalam Daftar Pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar – benarnya secara sadar dan bertanggungjawab 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



(Monayanti Simanjuntak)

NIM: 31210397

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas kasih dan anugerah-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tugas akhir yang berjudul **“Desain dan Optimasi Primer dalam Identifikasi *Hypervariable Segment I D-Loop* DNA Mitokondria (mtDNA) pada Sampel *Buccal Swab* Manusia (*Homo sapiens*)”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) dari Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana.

Penulis menyadari bahwa pada proses penulisan tugas akhir ini tidak dapat berjalan dan selesai dengan baik tanpa adanya dukungan, bimbingan, masukan, serta saran dari berbagai pihak.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Tuhan Yesus Kristus yang memberikan kekuatan serta kemampuan hingga penulis dapat menyelesaikan penelitian skripsi dengan baik.
2. Ibu Dr.-Ing. Wiyatiningsih, S.T., M.T. selaku Rektor Universitas Kristen Duta Wacana
3. Ibu Dr. Charis Amarantini, M.Si selaku Dekan Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana
4. Ibu Dwi Aditiyarini, S.Si., M Biotech., M.Sc. selaku ketua program studi Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana serta Dosen Wali penulis.
5. Ibu Dr. Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, S.Si selaku dosen pembimbing utama untuk segala masukan, saran, dan bimbingannya selama proses penyusunan tugas akhir.
6. Ibu Vira Saamia, S.Si., M.Biomed selaku dosen pembimbing pendamping, yang telah mendampingi penulis saat bekerja di laboratorium, bimbingan selama proses melakukan penelitian, dan untuk kepercayaannya akan penulis untuk melakukan penelitian mengenai DNA mitokondria.
7. Bapak dan Ibu dosen, staff, dan laboran Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana atas ilmu yang tak terhingga dan dukungan selama proses perkuliahan di Fakultas Bioteknologi UKDW
8. Pusat Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal Polri atas kesempatan dan bantuan kepada penulis untuk bisa melakukan penelitian mengenai DNA Mitokondria.
9. Bapak dan Ibu Kimia Biologi Forensik (Puslabfor) untuk bantuannya dan arahan selama penulis melakukan penelitian. Terutama untuk Sub – Bidang Biologi Serologi (Bapak Kopol Irfan rofik, Ibu Pembina Setia Betaria, Ibu Pembina Dwi Ana, Mas

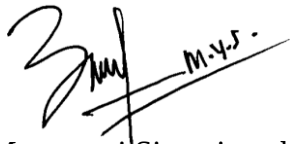
Penda Riski Suranto, Mba Briptu Ade Maysaroh, Mba Briptu Ajeng Tiara, dan Bang Briptu Afdhal Amri) yang sudah banyak membantu penulis dalam penelitian di Laboratorium Puslabfor

10. Alm. Richard Simanjuntak selaku bapak yang penulis cintai dan sayangi, meskipun pada akhirnya beliau tidak memiliki banyak cerita dimasa penulis menjalani masa perkuliahan ini. Penulis berterima kasih untuk setiap cinta, harapan, dan perjuangan yang beliau berikan hingga penulis berusia 19 tahun, bagi penulis beliau adalah bapak yang paling hebat dan keren. Penulis teringat akan pesan bapak saat itu yaitu “selalu berharap bahwa penulis dapat sukses dalam masa studinya”, dan saat ini penulis telah menyelesaikan masa studi strata 1. Kiranya beliau turut bangga dan bahagia melihat penulis (anak bungsu bapak) dapat menyelesaikan perkuliahan ini dengan baik.
11. Linda Gultom selaku mamah yang sangat penulis kasihi dan cintai. Terima kasih sebesar - besarnya untuk dukungan, kasih sayang, doa, dan semangat yang selalu diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan masa perkuliahan. Semangat dan kesabaran mamah dalam mendukung penulis untuk menyelesaikan perkuliahan sangat besar sehingga penulis dapat bertahan hingga saat ini.
12. Ka Megawati Simanjuntak Amd.Ak, Bang Yosua Juan Carlos Simanjuntak, dan Ka Monika Simanjuntak, S.Ak yang penulis sayangi. Terima kasih sudah selalu memberikan dukungannya baik secara moral maupun material. Banyak hal yang sudah dilalui bersama baik suka maupun duka, namun doa dan dukungan yang terus mengalir membuat penulis dapat menyelesaikan masa perkuliahan dengan baik. Penulis berharap Tuhan selalu memberkati dan menyertai setiap langkah kita kedepannya.
13. Keluarga besar penulis yaitu keluarga Simanjuntak dan keluarga Gultom yang selalu mendoakan dan mendukung penulis untuk dapat menyelesaikan perkuliahan dengan baik.
14. Teman-teman Bioteknologi UKDW angkatan 2021 yang selalu kebersamai penulis selama menempuh masa perkuliahan. Terutama untuk Diva, Steffy, Jeniffer, Nike, Ditha, Alba, Irene dan Edo yang selalu menemani penulis sejak masa perkuliahan dan saat proses menulis tugas akhir. Terima kasih untuk suka, duka, dan cerita indah yang telah dilalui bersama. Penulis berharap dimasa yang akan datang kita semua dapat memiliki kehidupan yang penuh dengan cerita indah
15. Teman – teman *volunteers* Realino dan Adik – adik KBR (Bongsuwung dan Jombor) yang selalu memberikan semangat dan tawa bagi penulis dalam proses menyelesaikan tugas akhir. Penulis merasa senang dapat berdinamika bersama dan bertemu dengan

- keluarga baru semasa mengemban ilmu di Yogyakarta. Kehadiran kalian memberi warna indah dalam masa perkuliahan penulis, cerita yang baru setiap minggunya menjadi semangat penulis dalam menyelesaikan masa perkuliahan dan menjadi pengingat bagi penulis untuk bisa menjadi manusia yang bermanfaat bagi setiap orang.
16. Antonia Anindyanari Pramartastri Nitisara yang sudah mau berjuang bersama dalam menyelesaikan proses penelitian dan penulisan tugas akhir ini. Penulis berharap Tuhan selalu memberkati dan semua mimpi atas masa depan yang kita harapkan dapat terjadi.
 17. D.M. Yunita Nurelisa Tarigan yang selalu memberikan dukungan moril dan doa kepada penulis selama masa perkuliahan dan dalam menyelesaikan tugas akhir.
 18. Beasiswa *Online Scholarship Competition* (OSC) dan Yayasan Surya Edukasi Bangsa yang sudah memberikan dukungan dana pendidikan kepada penulis selama masa perkuliahan.
 19. Dan kepada diri sendiri, Monayanti Simanjuntak terima kasih untuk semua perjuangan, kesabaran, dan semangat yang tidak pernah habis dalam menjalani setiap fase perkuliahan hingga proses penyusunan skripsi ini. Setiap perjalanan yang telah dilalui penulis, tak lepas dari rasa takut, khawatir dan lelah yang hadir kedalam diri penulis. Namun, dengan tekad dan kekuatan dari Tuhan penulis mampu untuk melewati dan melanjutkan setiap perjalanan yang ada. Melalui proses menyelesaikan tugas akhir (skripsi) ini menjadi bukti dari usaha dan perjalanan yang tidak mudah dapat penulis lalui. Semoga dimasa yang akan datang penulis dapat terus belajar, berjuang, dan tidak menyerah akan segala mimpi yang ada.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalaskan kebaikan juga perhatiannya kepada para pihak yang mendukung penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tugas akhir ini tidak luput dari kesalahan dan kekurangan sehingga memerlukan bantuan saran dan kritik dari pembaca yang dapat menyempurnakan tugas akhir ini serta menjadi pedoman bagi penulis untuk kedepannya. Penulis berharap tugas akhir ini dapat bermanfaat untuk banyak pihak yang membacanya.

Yogyakarta, 19 Mei 2025

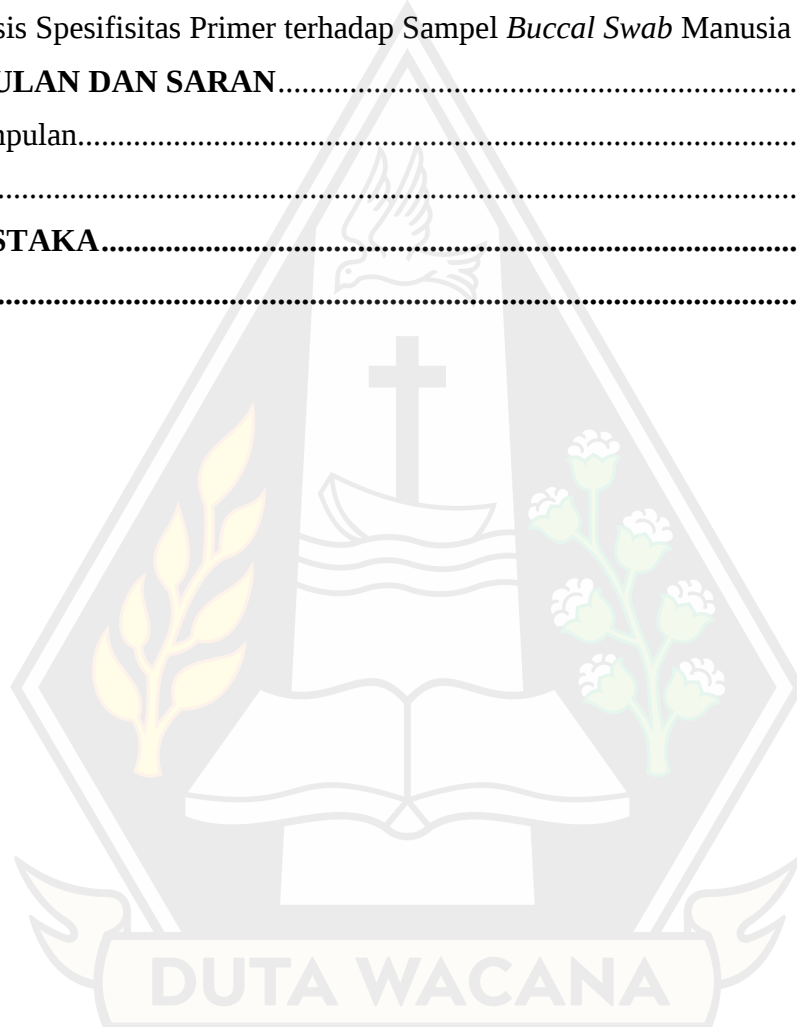


Monayanti Simanjuntak

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI	iii
LEMBAR PERSETUJUAN NASKAH SKRIPSI.....	iv
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 DNA mitokondria (mtDNA) dan <i>Hypervariable segment I</i> (HVS I).....	4
2.2 <i>Buccal Swab</i>	5
2.3 Konstruksi Primer dalam Biologi Forensik.....	6
2.4 Primer Spesifik untuk Amplifikasi DNA	7
2.5 Kekurangan dan Kelebihan <i>Hypervariable Segment I</i> D-loop mtDNA Sebagai Marker	9
BAB III METODE PENELITIAN	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Bahan.....	11
3.3 Alat	11
3.4 Cara Kerja	12
3.4.1 Desain primer	12
3.4.2 Preparasi sampel (pengambilan dan pengumpulan sampel)	14
3.4.3 Ekstraksi DNA	15
3.4.4 Kuantifikasi DNA	16
3.4.5 Handling Primer	16
3.4.6 Optimasi primer dan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	17

3.4.7	Elektroforesis produk amplifikasi dengan gel agarose	17
3.4.8	Sekuensing produk PCR dan Analisis sekuens <i>HVS I</i> DNA mitokondria.....	18
3.5	Analisis Data	20
3.6	Alur Kerja Penelitian.....	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		21
4.1	Desain primer <i>HVS I</i> D-loop mtDNA	21
4.2	Analisis <i>in silico</i> primer <i>HVS I</i> D-loop mtDNA	22
4.3	Optimasi Primer Menggunakan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) Gradient	28
4.4	Analisis Spesifisitas Primer terhadap Sampel <i>Buccal Swab</i> Manusia	33
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....		45
5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....		46
LAMPIRAN.....		57



DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Literatur target gen hypervariable segment I (HVS I) D-loop mtDNA	13
Tabel 3. 2 Standar penting dalam mendesain primer	13
Tabel 3. 3 Sampel penelitian	14
Tabel 4. 1 Urutan basa kandidat pasangan basa <i>hypervariable segment I</i> mtDNA	21
Tabel 4. 2 Analisis in silico dari kandidat primer <i>HVS I</i> D-loop mtDNA	23
Tabel 4. 3 Analisis Primer NCBI BLAST	27
Tabel 4. 4 Similaritas sekuens dari Primer HVS I A dan B	35
Tabel 4. 5 Analisis Variasi nukleotida dan prediksi <i>haplogroup</i> primer <i>HVS I</i> DNA Mitokondria	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur dasar genom DNA mitokondria (mtDNA) daerah hypervariable (HVS I, HVS II, dan HVS III) pada area D-loop.....	5
Gambar 2. 2 Mukosa Buccal	6
Gambar 2. 3 Swab untuk pengambilan sampel	6
Gambar 3. 1. Alur Kerja Penelitian.....	20
Gambar 4. 1. Posisi penempelan primer gen HVS I pada whole genome mtDNA.....	22
Gambar 4. 2. Optimasi primer HVS I A dan B	30
Gambar 4. 3. Hasil uji primer HVS I A dan B terhadap sampel dengan suhu annealing 56.5°C	32
Gambar 4. 4. Chromatogram hasil sekuensing sampel Z dengan Primer HVS I A dan B.....	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Kelaikan Etik	57
Lampiran 2. Pengambilan sampel dan Dokumen instrumen penelitian.....	58
Lampiran 3. Proses Ekstraksi DNA	59
Lampiran 4. Proses Kuantifikasi	60
Lampiran 5. Hasil Kuantifikasi DNA Ekstraksi Sampel	61
Lampiran 6. Handling Primer	61
Lampiran 7. PCR Mixture.....	63
Lampiran 8. Kondisi running PCR.....	63
Lampiran 9. Hasil Kuantifikasi DNA PCR sampel Z.....	64
Lampiran 10. Hasil Kuantifikasi DNA PCR sampel	65
Lampiran 11. Elektroforesis DNA PCR.....	65
Lampiran 12. Proses ExoSAP-IT™ dan Kondisi running pada Thermocycler	67
Lampiran 13. Proses cycle sequencing BigDye Mixture dan Kondisi running sampel.....	68
Lampiran 14. Purification cycle sequencing mixture	69
Lampiran 15. Ilustrasi tampilan komputer untuk settingan dalam proses sekuensing.....	69
Lampiran 16. Dokumentasi proses sequencing sampel	69
Lampiran 17. Hasil Blast sekuens sampel Z	70
Lampiran 18. Dokumentasi Kegiatan di Laboratorium	71
Lampiran 19. Surat Keterangan Penelitian	73
Lampiran 20. Hasil blast primer <i>HVS I A forward</i>	74
Lampiran 21. Hasil blast primer <i>HVS I A reverse</i>	75
Lampiran 22. Hasil blast primer <i>HVS I B forward</i>	76
Lampiran 23. Hasil blast primer <i>HVS I B reverse</i>	77
Lampiran 24. Visualisasi hasil Optimasi dan Uji Primer HVS I A, B, dan Kontrol	78
Lampiran 25. Pengujian Haplogroup F1a	79
Lampiran 26. Pengujian Haplogroup F1a2	80

ABSTRAK

Desain dan Optimasi Primer dalam Identifikasi *Hypervariable Segment I* D-Loop DNA Mitokondria (mtDNA) pada Sampel *Buccal Swab* Manusia (*Homo sapiens*)

Monayanti Simanjuntak

Analisis DNA dalam proses identifikasi individu membutuhkan konsentrasi DNA yang cukup tinggi, tetapi seringkali sampel yang ditemukan sudah mengalami degradasi pada bagian DNA inti. Beberapa metode lain diketahui dapat digunakan untuk proses identifikasi individu, salah satunya dengan memanfaatkan DNA mitokondria (mtDNA). DNA mitokondria (mtDNA) adalah suatu bagian dari sel yang dapat digunakan dalam proses identifikasi karena diturunkan secara maternal dan memiliki rekombinasi yang lebih rendah jika dibandingkan dengan DNA inti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui spesifisitas dan efektifitas primer yang didesain dalam identifikasi *hypervariable segment* (HVS I) pada sampel *buccal swab* manusia. Penelitian ini mengujikan kandidat primer terhadap sampel *buccal swab* manusia yang diekstraksi dengan menggunakan PrepFilerTM Forensic DNA Extraction Kit. Pembuatan primer yang menarget daerah *hypervariable segment* I dilakukan dengan menggunakan beberapa situs NCBI, Primer3Plus dan dianalisis pada NetPrimer Biosoft. Kandidat primer yang mentarget *hypervariable segment* I (HVS I) disintesis di Genewiz (China) dan dilakukan optimasi menggunakan PCR gradient dengan sampel *buccal swab*. Tahap lanjutan dari proses identifikasi individu dilakukan dengan Sanger sekuensing. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua pasangan primer yang telah didesain mampu mengamplifikasi wilayah *hypervariable segment* I (HVS I) DNA mitokondria dengan panjang basa 340bp dan 401bp dengan suhu optimal *annealing* di 56.5 °C. Hasil analisis sekuensing dengan pasangan primer HVS I A dan HVS I B menunjukkan bahwa variasi nukleotida dari sampel terdapat sebanyak 8 – 13 variasi. Variasi nukleotida secara umum disebabkan oleh mutasi subsittusi transisi, transversi, dan delesi dengan ditemukan tiga situs variasi nukleotida yang sama pada setiap primer uji. Dari hasil analisis sekuensing sampel Z, diketahui bahwa sampel termasuk kedalam *haplogroup* F1a dan F1a2 yang sebagian besar dimiliki oleh populasi Asia Tenggara. Penelitian ini dapat digunakan untuk pengungkapan kasus forensik yang barang buktinya berupa sampel yang sudah lama atau mengalami degradasi.

Kata kunci: *Buccal Swab*, Desain Primer, *Hypervariable Segment I*, mtDNA, PCR gradient

ABSTRACT

Primer Design and Optimization in Identification of Hypervariable Segment I D-Loop Mitochondrial DNA (mtDNA) in Buccal Swab Samples of Human (*Homo sapiens*)

Monayanti Simanjuntak

DNA analysis in the process of individual identification requires a fairly high concentration of DNA, but often the samples found are already degraded in the core DNA section. Several other methods are known to be used for individual identification, one of which utilizes mitochondrial DNA (mtDNA). Mitochondrial DNA (mtDNA) is a part of the cell that can be used in the identification process because it is maternally inherited and has lack recombination when compared to nuclear DNA. This study aims to determine the specificity and effectiveness of primers designed in the identification of hypervariable segment (HVS I) in human buccal swab samples. This study tested candidate primers against human buccal swab samples extracted using the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit. Preparation of primers targeting the hypervariable segment I region was carried out using several sites such as NCBI, Primer3Plus and analyzed on NetPrimer Biosoft. Primer candidates targeting hypervariable segments I (HVS I) were synthesized at Genewiz (China) and optimized using gradient PCR with buccal swab samples. The next step of the individual identification process was Sanger sequencing. The results showed that the two primer pairs that had been designed were able to amplify the hypervariable segment I (HVS I) region of mitochondrial DNA with a base length of 340 bp and 401 bp with an optimal annealing temperature of 56.5°C. The results of sequencing analysis with primer pairs HVS I A and HVS I B showed that the nucleotide variations of the samples were 8 -13 variations. Nucleotide variations are generally caused by transitional substitution mutations, transversions, and deletions with three sites of the same nucleotide variation found in each test primer. From the sequencing analysis of sample Z, it is known that the sample belongs to the F1a and F1a2 haplogroups, which are mostly shared by Southeast Asian populations. This research can be used for the disclosure of forensic cases where the evidence is in the form of old or degraded samples.

Keywords: Buccal Swab, Primer Design, Hypervariable Segment I, mtDNA, PCR gradient

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Analisis DNA menjadi sangat penting dalam berbagai bidang meliputi diagnostik medis, penelitian ilmiah, dan forensik. Analisis DNA adalah suatu proses identifikasi dengan memanfaatkan informasi genetik yang unik dan spesifik pada setiap individu (Saferstein, 2014). Pada bidang forensik, analisis DNA digunakan untuk identifikasi individu melalui pembuatan profil DNA. Pembuatan profil DNA individu dapat dilakukan dengan beberapa teknik antara lain *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR), *Short Tandem Repeat* (STR), *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) typing, *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphic DNA* (AFLP), *Y-chromosome Analysis*, *Mitochondrial DNA* (mtDNA) analysis, dan *Gender Typing* (Jaiswal & Nayyer, 2023). Proses tersebut dilakukan dengan menggunakan DNA yang terdapat dari sampel biologis seperti darah, urine, air liur, *buccal swab*, atau jaringan akan diekstraksi dan dianalisis.

Keberhasilan pembuatan profil DNA individu sangat dipengaruhi oleh kondisi sampel yang ditemukan pada tempat kejadian perkara (TKP), karena sifat dari DNA inti yang mudah terdegradasi (Kus et al., 2016). DNA sendiri tidak hanya terdapat pada inti sel (DNA inti) tetapi dapat ditemukan juga di dalam mitokondria yang biasa disebut sebagai DNA mitokondria (mtDNA) (Salem K. Alketbi, 2023). Pada beberapa kasus forensik yang bertujuan mengidentifikasi individu, DNA autosomal ditemukan dengan kondisi terdegradasi bahkan tidak ditemukan (Amorim et al., 2019). Degradasi DNA dapat terjadi karena adanya paparan faktor lingkungan dan waktu sampel ketika ditemukan sudah cukup lama sehingga mempengaruhi kualitas dan kuantitas dari DNA yang didapatkan (Bus et al., 2016). Kekurangan dari analisis menggunakan DNA inti untuk identifikasi individu pada sampel yang sudah mengalami degradasi dapat diatasi dengan menggunakan analisis profil DNA berdasarkan DNA mitokondria untuk tujuan forensik (Grela et al., 2021). DNA mitokondria sendiri banyak digunakan sebagai marker untuk identifikasi keragaman molekuler dan konservasi spesies *non human* (Galtier et al., 2009). Namun, penggunaan DNA mitokondria juga dilakukan untuk menganalisis urutan nukleotida dari manusia berdasarkan suatu daerah dari mtDNA (Maksum, 2008).

Identifikasi individu menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) dengan tujuan untuk menghasilkan profil DNA dapat dilakukan berdasarkan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR adalah suatu teknik dasar untuk memperbanyak daerah target *deoxyribonucleic acid* (DNA) melalui reaksi enzimatik (McDonald et al., 2024). Spesifisitas proses PCR yang baik bergantung pada salah satu komponen PCR yang berperan penting yaitu primer, sehingga reaksi dan kondisi yang diterapkan dalam proses amplifikasi (Lorenz, 2012). Proses amplifikasi dalam identifikasi individu menggunakan mtDNA umumnya dilakukan dengan menarget wilayah *hypervariable* yang relatif kecil pada genom mtDNA manusia (Greenberg et al., 1983; Lutz et al., 2000). Daerah dari *hypervariable* yang banyak digunakan dalam identifikasi individu untuk tujuan pengujian forensik antara lain *HVS I* dan *HVS II* (Budowle et al., 1999).

Proses identifikasi individu menggunakan metode PCR dengan menarget daerah *hypervariable* DNA mitokondria memerlukan sepasang primer yang mampu berkomplemen pada sekuens DNA target dan bersifat spesifik (Yudianto & Margaret, 2018). Primer yang digunakan dalam proses identifikasi individu perlu didesain secara spesifik dengan menggunakan *tools* yang tersedia secara online (Kamel, 2003). Suatu primer dapat dikatakan primer yang ideal jika sudah mampu memenuhi standar suatu primer yang ideal. Proses desain primer menjadi hal yang perlu diperhatikan untuk menjamin keberhasilan amplifikasi. Primer harus bersifat spesifik yaitu hanya berkomplemen dengan gen target dan tidak memiliki kecocokan dengan gen non-target (Ye et al., 2012). Penelitian (Yudianto et al., 2022) menunjukkan bahwa penggunaan mtDNA D-loop dengan menargetkan *HVS I* dan *HVS II* berdasarkan primer universal mampu dalam analisis kekerabatan keluarga. Hal tersebut didukung juga dengan pernyataan (Amorim et al., 2019) yaitu DNA mitokondria pada kasus forensik dapat dilakukan untuk pengujian garis keturunan, identifikasi korban bencana identifikasi orang hilang, dan penelusuran keluarga.

Pada penelitian yang dilakukan oleh (Daud et al., 2014), menunjukkan bahwa *hypervariable region* dapat dijadikan sebagai daerah target dan proses amplifikasi dan validasi primer dapat dilakukan dengan melakukan variasi pada suhu dan komponen PCR yang digunakan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan analisis desain dan optimasi primer spesifik dalam identifikasi *hypervariable segment I* D-loop DNA mitokondria (mtDNA) terhadap sampel *buccal swab* manusia (*Homo sapiens*). Penelitian yang dilakukan akan menggunakan satu bagian dari D-loop mtDNA yaitu *HVS I* (*Hypervariable segment I*), hal tersebut didasarkan oleh karena karakteristik dari

HVS I. Salah satu karakteristik dari *HVS I* yang membuat daerah tersebut dapat digunakan dalam identifikasi individu yaitu memiliki variasi yang tinggi dengan rentang urutan nukleotida yang rendah dan mudah untuk diurutkan (Guba et al., 2011). Hal ini membuat *HVS I* mampu digunakan sebagai daerah target yang penting dalam proses identifikasi forensik, studi populasi, dan analisis genetika (Amorim et al., 2019; Guba et al., 2011; Gumilar et al., 2016).

1.2 Rumusan Masalah

- a. Bagaimana spesifisitas ampikon yang didapatkan dengan daerah yang ditargetkan yaitu *hypervariable segment I (HVS I)* DNA mitokondria (mtDNA) dalam identifikasi individu?
- b. Bagaimana efisiensi primer primer *hypervariable segment I (HVS I)* DNA mitokondria (mtDNA) yang didesain dalam identifikasi individu dari sampel biologis?

1.3 Tujuan Penelitian

- a. Mengetahui spesifisitas ampikon yang didapatkan dengan daerah target yaitu *hypervariable segment I (HVS I)* DNA mitokondria (mtDNA) untuk identifikasi individu
- b. Mengetahui efisiensi primer *hypervariable segment I (HVS I)* DNA mitokondria (mtDNA) hasil desain primer dalam identifikasi individu dari sampel biologis

1.4 Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan primer yang optimal dalam mengamplifikasi gen target yaitu *hypervariable segment I (HVS I)* DNA mitokondria serta identifikasi individu pada sampel *buccal swab* manusia
2. Mendapatkan alternatif identifikasi individu dari barang bukti *Buccal Swab* dengan menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) berdasarkan daerah *hypervariable segment I (HVS I)* D-loop mtDNA
3. Menambah pengetahuan dalam bidang biologi forensik terutama pemanfaatan pengujian mtDNA untuk identifikasi individu.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa:

- a. Desain primer *HVS I A* dan *B* memiliki spesifisitas yang cukup baik dalam mengamplifikasi daerah *hypervariable segment I (HVS I)* D-loop DNA mitokondria (mtDNA) dari sampel biologis manusia. Primer *HVS I A* dan *B* memiliki suhu *annealing* optimal sebesar 56.5°C, dengan ukuran ampikon yang dihasilkan sebesar 401 bp (*HVS I A*) dan 340 bp (*HVS I B*).
- b. Pengujian efisiensi primer berdasarkan hasil sekuensing sampel Z menggunakan kedua primer uji menunjukkan bahwa primer *forward HVS I A* dan primer *HVS I B* (*forward* dan *reverse*) mampu menghasilkan data yang dapat untuk dianalisis secara baik. Dan dari hasil analisis sekuensing diketahui jika sampel Z termasuk kedalam *haplogroup F1a* (*forward HVS I A* dan *reverse HVS I B*) dan *F1a(F1a2)* (*forward HVS I B* dan primer *contig HVS I B*) dengan mutasi sebanyak 8-13 variasi. Situs mutasi identik dari *haplogroup F1a* yaitu situs 16304 yang terbaca pada sampel Z.

5.2 Saran

Adapun beberapa hal yang dapat diperbaiki dalam penelitian serupa, diantaranya:

1. Perlu dilakukan pengujian primer *HVS I A* dan *HVS I B* terhadap sampel biologis lain selain *buccal swab* yang dapat digunakan untuk pengujian menggunakan metode DNA mitokondria. Pengujian diharapkan terhadap sampel berupa barang bukti yang sudah terdegradasi
2. Perlu adanya dilakukan optimasi terhadap metode sekuensing baik secara komponen maupun kondisi *running* sampel. Digunakan sampel pembanding dari sampel uji untuk mengetahui proses mutasi yang terjadi pada sampel serta membantu proses klasifikasi *haplogroup* dari sampel uji atau individu.

DAFTAR PUSTAKA

- Akcesme, F. B. (2013). Efficient Algorithm for Primer Design. *Southeast Europe Journal of Soft Computing*, 2(2). <https://doi.org/10.21533/scjournal.v2i2.33>
- Al-mohanna, T. M. (2014). GUIDELINES FOR DESIGNING PRIMERS. *Howard Judelson*, 10(06), 1–5.
- Alonso, A., Albarrán, C., Martín, P., García, P., García, O., De La Rúa, C., Alzualde, A., Fernández De Simón, L., Sancho, M., & Fernández Piqueras, J. (2003). Multiplex-PCR of short amplicons for mtDNA sequencing from ancient DNA. *International Congress Series*, 1239, 585–588. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00401-6)
- Al-Sammarraie, H. K. I. (2016). Comparison between Two Different DNA Extraction Techniques Taken from Buccal Swabs Suitable for Genetic Analyzer. *Journal of Al-Nahrain University-Science*, 19(3), 108–113. <https://doi.org/10.22401/JNUS.19.3.14>
- 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. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7, e7314. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Andreson, R., Möls, T., & Remm, M. (2008). Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(11), e66–e66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn290>
- Anwar, M. A., Nurjanah, S. N., & Rahayu, W. P. (2022). Aplikasi Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) NCBI Pada Penelitian Molekuler Salmonella SPP. *Syntax Literate; Jurnal Ilmiah Indonesia*, 7(11), 15446. <https://doi.org/10.36418/syntax-literate.v7i11.9037>
- Apte, A., & Daniel, S. (2009). PCR Primer Design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(3). <https://doi.org/10.1101/pdb.ip65>
- Asif, S., Khan, M., Waqar Arshad, M., & 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>
- Asrori, I., Tjong, D. H., Novarino, W., Mansyurdin, M., Syaifullah, S., & Roesma, D. I. (2023). DNA primer design for sex identification of Sumatran tiger body samples. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(1). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240129>
- Atawodi, S., Atawodi, J., & Dzikwi, A. (2011). Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. *Sahel Medical Journal*, 13(2). <https://doi.org/10.4314/smj2.v13i2.64834>
- Aulia, N., Ahda, Y., Achyar, A., & Putri, D. H. (2023). Desain Primerdan Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Gen RET. *Jurnal Biology Science & Education* 2023, 12(1), 70–77.
- Banaganapalli, B., Shaik, N. A., Rashidi, O. M., Jamalalail, B., Bahattab, R., Bokhari, H. A., Alqahtani, F., Kaleemuddin, M., Al-Aama, J. Y., & Elango, R. (2019). In Silico PCR. In N. A. Shaik, K. R. Hakeem, B. Banaganapalli, & R. Elango (Eds.), *Essentials of Bioinformatics, Volume I* (pp. 355–371). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02634-9_16
- Bandelt, H.-J., Macaulay, V. A., & Richards, M. (2006). *Human mitochondrial DNA and the evolution of Homo sapiens*. Springer.

- Bei, Y., Pinet, K., Vrtis, K. B., Borgaro, J. G., Sun, L., Campbell, M., Apone, L., Langhorst, B. W., & Nichols, N. M. (2022). Overcoming variant mutation-related impacts on viral sequencing and detection methodologies. *Frontiers in Medicine*, 9, 989913. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.989913>
- Bilal, E., Rabadan, R., Alexe, G., Fuku, N., Ueno, H., Nishigaki, Y., Fujita, Y., Ito, M., Arai, Y., Hirose, N., Ruckenstein, A., Bhanot, G., & Tanaka, M. (2008). Mitochondrial DNA Haplogroup D4a Is a Marker for Extreme Longevity in Japan. *PLoS ONE*, 3(6), e2421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002421>
- Bonsu, D. O. M., Higgins, D., & Austin, J. J. (2020). Forensic touch DNA recovery from metal surfaces – A review. *Science & Justice*, 60(3), 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2020.01.002>
- Borah, P. (2011). Primer designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134–136.
- Bruijns, B. B., Tiggelaar, R. M., & Gardeniers, H. (2018). The Extraction and Recovery Efficiency of Pure DNA for Different Types of Swabs. *Journal of Forensic Sciences*, 63(5), 1492–1499. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13837>
- 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)
- Burpo, F. J. (2001). *A critical review of PCR primer design algorithms and cross- hybridization case study*.
- Buś, M. M., Nilsson, M., & Allen, M. (2016). Analysis of Mitochondrial 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>
- Cavalcanti, P., Nogueira, T. L. S., Carvalho, E. F. D., & Silva, D. A. D. (2024). Forensic use of human mitochondrial DNA: A review. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 96(4), e20231179. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202420231179>
- Chen, S. C. A., Catriona L Halliday, & Meyer Wieland. (2002). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Medical Mycology*, 40, 333–357.
- Chen, Y., Wu, W., Xing, L., Zhang, X., Wang, J., Xia, X., Zhao, R., & Zhao, R. (2023). Investigating the role of mitochondrial DNA D-loop variants, haplotypes, and copy number in polycystic ovary syndrome: Implications for clinical phenotypes in the Chinese population. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1206995. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1206995>
- 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>
- Comment, D., Gouy, A., Zingg, C., & Zieger, M. (2023). A holistic approach for the selection of forensic DNA swabs. *Forensic Science International*, 348, 111737. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111737>
- Court, D. S. (2021). Mitochondrial DNA in forensic use. *Emerging Topics in Life Sciences*, 5(3), 415–426. <https://doi.org/10.1042/ETLS20210204>

- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(6), 767–775. <https://doi.org/doi.org/10.1177/10406387209058>
- Dadhanian, A., Nelson, M., Caves, G., Santiago, R., & Podini, D. (2013). Evaluation of Copan 4N6FLOQSwabs™ used for crime scene evidence collection. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e336–e337. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.171>
- 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. 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>
- Draper, N. (2008). Identification of SNPs, or Mutations in Sequence Chromatograms. In M. Starkey & R. Elaswarapu (Eds.), *Genomics Protocols* (Vol. 439, pp. 35–52). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-188-8_3
- Duong, N. T., Macholdt, E., Ton, N. D., Arias, L., Schröder, R., Van Phong, N., Thi Bich Thuy, V., Ha, N. H., Thi Thu Hue, H., Thi Xuan, N., Thi Phuong Oanh, K., Hien, L. T. T., Hoang, N. H., Pakendorf, B., Stoneking, M., & Van Hai, N. (2018). Complete human mtDNA genome sequences from Vietnam and the phylogeography of Mainland Southeast Asia. *Scientific Reports*, 8(1), 11651. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29989-0>
- Elkins, K. M. (2015). Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology. In C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (Vol. 1275, pp. 17–30). Springer 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>
- Ferreira, T., & Rodriguez, S. (2024). Mitochondrial DNA: Inherent Complexities Relevant to Genetic Analyses. *Genes*, 15(5), 617. <https://doi.org/10.3390/genes15050617>
- Furda, A., Santos, J. H., Meyer, J. N., & Van Houten, B. (2014). Quantitative PCR-Based Measurement of Nuclear and Mitochondrial DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. In P. Keohavong & S. G. Grant (Eds.), *Molecular Toxicology Protocols* (Vol. 1105, pp. 419–437). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-739-6_31
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541–4550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>
- Garafutdinov, R. R., Galimova, A. A., & Sakhabutdinova, A. R. (2020). The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 39(9), 1251–1269. <https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1803354>
- 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)
- Grela, M., Jakubczak, A., Kowalczyk, M., Listos, P., & Gryzińska, M. (2021). Effectiveness of various methods of DNA isolation from bones and teeth of animals exposed to high temperature. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 78, 102131. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102131>

- Gruber, T., & Clay, Z. (2016). A Comparison Between Bonobos and Chimpanzees: A Review and Update. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 25(5), 239–252. <https://doi.org/10.1002/evan.21501>
- Guba, Z., Hadadi, É., Major, Á., Furka, T., Juhász, E., Koós, J., Nagy, K., & Zeke, T. (2011). HVS-I polymorphism screening of ancient human mitochondrial DNA provides evidence for N9a discontinuity and East Asian haplogroups in the Neolithic Hungary. *Journal of Human Genetics*, 56(11), 784–796. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.103>
- Gumilar, G. G., Purnamasari, Y., & Setiadi, R. (2016). *Mitochondrial DNA variant at HVI region as a candidate of genetic markers of type 2 diabetes*. 040004. <https://doi.org/10.1063/1.4941154>
- Gumilar, G. G., Susanti, S. E., & Munawaroh, H. S. H. (2021). Variasi Mutasi Daerah HVI DNA Mitokondria Suku BimaDompu Nusa Tenggara Barat. *Chemica Isola*, 1(1), 31–36.
- Habza-Kowalska, E., Grela, M., Gryzińska, M., & Listos, P. (2020). Molecular techniques for detecting food adulteration. *Medycyna Weterynaryjna*, 75(05), 6260–2020. <https://doi.org/10.21521/mw.6261>
- Hill, C., Soares, P., Mormina, M., Macaulay, V., Clarke, D., Blumbach, P. B., Vizuete-Forster, M., Forster, P., Bulbeck, D., Oppenheimer, S., & Richards, M. (2007). A Mitochondrial Stratigraphy for Island Southeast Asia. *The American Journal of Human Genetics*, 80(1), 29–43. <https://doi.org/10.1086/510412>
- Hofmann, S., Jaksch, M., Bezold, R., Mertens, S., Aholt, S., Paprotta, A., & Gerbitz, K.-D. (1997). Population Genetics and Disease Susceptibility: Characterization of Central European Haplogroups By mtDNA Gene Mutations, Correlation with D Loop Variants and Association With Disease. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1835–1846. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1835>
- 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>
- Huong Thao, D., Van Hai, N., & Thuy Duong, N. (2022). Complete human mtDNA genome sequences revealed haplotype features of the Hmong-Mien language family in Vietnam. *Academia Journal of Biology*, 44(2), 21–28. <https://doi.org/10.15625/2615-9023/17115>
- 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>
- Irwin, J. A., Saunier, J. L., Niederstätter, H., Strouss, K. M., Sturk, K. A., Diegoli, T. M., Brandstätter, A., Parson, W., & Parsons, T. J. (2009). Investigation of Heteroplasmy in the Human Mitochondrial DNA Control Region: A Synthesis of Observations from More Than 5000 Global Population Samples. *Journal of Molecular Evolution*, 68(5), 516–527. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9227-4>
- Jaisamut, K., Pitiwararom, R., Sukawutthiya, P., Sathirapatya, T., Noh, H., Worrapitirungsi, W., & Vongpaisarnsin, K. (2023). Unraveling the mitochondrial phylogenetic landscape of Thailand reveals complex admixture and demographic dynamics. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47762-w>
- Jaiswal, A. K., & Nayyer, S. (2023). DNA profiling in forensic investigation – A review. *IP International Journal of Forensic Medicine and Toxicological Sciences*, 8(1), 14–22. <https://doi.org/10.18231/j.ijfmts.2023.003>

- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, 109(3–4), 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>
- Kamel, A. A.-E. (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>
- Khrabrova, L. A., Blohina, N. V., Bazaron, B. Z., & Khamiruev, T. N. (2021). Variability of mitochondrial DNA D-loop sequences in Zabaikalskaya horse breed. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 25(5), 486–491. <https://doi.org/10.18699/VJ21.055>
- Kobayashi, H., Matsubara, S., Yoshimoto, C., Shigetomi, H., & Imanaka, S. (2025). A Comprehensive Review of the Contribution of Mitochondrial DNA Mutations and Dysfunction in Polycystic Ovary Syndrome, Supported by Secondary Database Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(3), 1172. <https://doi.org/10.3390/ijms26031172>
- Kong, Q.-P., Yao, Y.-G., Sun, C., Zhu, C.-L., Zhong, L., Wang, C.-Y., Cai, W.-W., Xu, X.-M., Xu, A.-L., & Zhang, Y.-P. (2004). Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA haplogroup F2 in China reveals T12338C in the initiation codon of the ND5 gene not to be pathogenic. *Journal of Human Genetics*, 49(8), 414–423. <https://doi.org/10.1007/s10038-004-0170-3>
- Kowalczyk, M., Staniszewski, A., & Kami, K. (2021). *Advantages, Possibilities, and Limitations of Mitochondrial DNA Analysis in Molecular Identification*. 69(3). https://doi.org/10.3409/fb_69-3.12
- Kumar, A., & Kaur, J. (2014). Primer Based Approach for PCR Amplification of High GC Content Gene: *Mycobacterium* Gene as a Model. *Molecular Biology International*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/937308>
- 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>
- Kusumawaty, D., Faridah, N., Fibriani, A., Priyandoko, D., Dzikrina, H., Puspitasari, D., Tallei, T. E., & Aryani, A. (2024). Successful Primer Picking and Pooling for the Design of Multiplex PCR Primers Specific to Pork, Beef, Chicken, and Rat DNA. *HAYATI Journal of Biosciences*, 31(4), 678–686. <https://doi.org/10.4308/hjb.31.4.678-686>
- Kwaśniewski, W., Stupak, A., Warowicka, A., Goździcka-Józefiak, A., Mosiewicz, J., & Mieczkowska, J. (2023). Mitochondrial DNA Polymorphism in HV1 and HV2 Regions and 12S rDNA in Perimenopausal Hypertensive Women. *Biomedicines*, 11(3), 823. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030823>
- Kwok, S., Chang, S. Y., Sninsky, J. J., & Wang, A. (1994). A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *Genome Research*, 3(4), S39–S47. <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.S39>
- Latifah, Muarifah, H., Sopian, Y., & Guntur, A. (2020). Analisis Genetik Gen KiSS1 pada Kambing Berdasarkan Sekuen DNA GenBank. *Journal of Tropical Animal Research (JTAR)*, 1(1), 0–28.
- Lawless, C., Greaves, L., Reeve, A. K., Turnbull, D. M., & Vincent, A. E. (2020). The rise and rise of mitochondrial DNA mutations. *Open Biology*, 10(5), 200061. <https://doi.org/10.1098/rsob.200061>
- Lax, N. Z., Turnbull, D. M., & Reeve, A. K. (2011). Mitochondrial Mutations: Newly Discovered Players in Neuronal Degeneration. *The Neuroscientist*, 17(6), 645–658. <https://doi.org/10.1177/1073858410385469>

- Leuthner, T. C., & Meyer, J. N. (2021). Mitochondrial DNA Mutagenesis: Feature of and Biomarker for Environmental Exposures and Aging. *Current Environmental Health Reports*, 8(4), 294–308. <https://doi.org/10.1007/s40572-021-00329-1>
- Li, H., Cai, X., Winograd-Cort, E. R., Wen, B., Cheng, X., Qin, Z., Liu, W., Liu, Y., Pan, S., Qian, J., Tan, C., & Jin, L. (2007). Mitochondrial DNA diversity and population differentiation in southern East Asia. *American Journal of Physical Anthropology*, 134(4), 481–488. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20690>
- Li, L.-C. (2007). Designing PCR Primer for DNA Methylation Mapping. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 402). Humana Press.
- 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>
- Livy, A., Lye, S., Jagdish, C. K., Hanis, N., Sharmila, V., Ler, L. W., & Pramod, B. (2012). Evaluation of Quality of DNA Extracted from Buccal Swabs for Microarray Based Genotyping. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 27(1), 28–33. <https://doi.org/10.1007/s12291-011-0154-y>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 3998. <https://doi.org/10.3791/3998-v>
- Lott, M. T., Leipzig, J. N., Derbeneva, O., Xie, H. M., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., & Wallace, D. C. (2013). mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current Protocols in Bioinformatics*, 44(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0123s44>
- Lutz, S., Wittig, H., Weissner, H.-J., Heizmann, J., Junge, A., Dima-Simonin, N., Parson, W., Edelmann, 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)
- Maksum, I. P. (2008). ANALISIS URUTAN NUKLEOTIDA DAERAH HIPERVARIABEL I (HVI) DNA MITOKONDRIA UNTUK MENENTUKAN MOTIF POPULASI SUKU SUNDA. *Jurnal Bionatura*, 10(2), 116–128.
- Malyarchuk, B. A., & Derenko, M. V. (2001). Variation of Human Mitochondrial DNA: Distribution of Hot Spots in Hypervariable Segment I of the Major Noncoding Region. *Russian Journal of Genetics*, 37(7), 991–1001. <https://doi.org/10.1023/A:1016707228425>
- Marshall, O. (2007). Graphical Design of Primers with PerlPrimer. In A. Yuryev (Ed.), *PCR Primer Design* (Vol. 402, pp. 403–414). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_21
- Mawlood, S. K., Alrowaithi, M., & Watson, N. (2015). Advantage of ForensiX Swabs in Retrieving and Preserving Biological Fluids. *Journal of Forensic Sciences*, 60(3), 686–689. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12704>
- 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>
- Messina, F., Scorrano, G., Labarga, C. M., Rolfo, M. F., & Rickards, O. (2010). Mitochondrial DNA variation in an isolated area of Central Italy. *Annals of Human Biology*, 37(3), 385–402. <https://doi.org/10.3109/03014461003720304>

- Mita, Y., Fukagawa, T., Watahiki, H., Kitayama, T., Fujii, K., Mizuno, N., & Sekiguchi, K. (2020). Developmental validation for Sanger sequencing of HV1 and HV2 in mitochondrial DNA. *Forensic Science International: Reports*, 2, 100159. <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100159>
- 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>
- Mona, S., Grunz, K. E., Brauer, S., Pakendorf, B., Castri, L., Sudoyo, H., Marzuki, S., Barnes, R. H., Schmidtke, J., Stoneking, M., & Kayser, M. (2009). Genetic Admixture History of Eastern Indonesia as Revealed by Y-Chromosome and Mitochondrial DNA Analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 26(8), 1865–1877. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp097>
- 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>
- Ngili, Y., Ubyaan, R., Palit, E. I. Y., Bolly, H. M., & Noer, A. S. (2012). Nucleotide Mutation Variants on D-Loop HVS1/HVS2 Mitochondrial DNA Region: Studies on Papuan Population, Indonesian. *European Journal of Scientific Research*, 72(1), 64–73.
- Nissanka, N., Minczuk, M., & Moraes, C. T. (2019). Mechanisms of Mitochondrial DNA Deletion Formation. *Trends in Genetics*, 35(3), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.01.001>
- Nissanka, N., & Moraes, C. T. (2020). Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO Reports*, 21(3), e49612. <https://doi.org/10.15252/embr.201949612>
- Nur Handayani, N. S., Pertiwi, I. M., & Nugraheni, K. A. (2023). Desain Mini Primer STR Lokus TH01 dan D21S11 untuk Amplifikasi DNA Darah Terpapar Suhu Tinggi. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences (IJLFS)*, 13(2), 109. <https://doi.org/10.24843/IJLFS.2023.v13.i02.p05>
- 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>
- Parakatselaki, M.-E., & Ladoukakis, E. D. (2021). mtDNA Heteroplasmy: Origin, Detection, Significance, and Evolutionary Consequences. *Life*, 11(7), 633. <https://doi.org/10.3390/life11070633>
- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current Protocols in Bioinformatics*, 42(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>
- Pliss, L., Brakmanis, A., Ranka, R., Elferts, D., Krumina, A., & Baumanis, V. (2011). The link between mitochondrial DNA hypervariable segment I heteroplasmy and ageing among genetically unrelated Latvians. *Experimental Gerontology*, 46(7), 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.02.016>
- Pranata, A., & Ahda, Y. (2021). DESAIN PRIMER UNTUK IDENTIFIKASI GEN LUCIFERASE PADA KUNANG-KUNANG GENUS *Lamprigera* (Lampyridae: Coeloptera).

- Purkan, Afaf B, Magdalena, S., Redianti, G., Rizka, A., Presty, N., & Deby, T. (2013). Varian in D-Loop of mitochondrial DNA from hair fibers of some Indonesian people. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, 3(6), 109–114. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14303/irjbb.2013.015>
- Putri, A. I., Achyar, A., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2021). Primer design, in silico PCR and optimum annealing temperature for *Escherichia coli* detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, 1(2), 52–60.
- 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*. 10(2).
- Rana, A. K. (2018). The Future of Forensic Biology. *Journal of Biomedicine*, 3, 13–18. <https://doi.org/10.7150/jbm.22760>
- Röck, A. W., Dür, A., Van Oven, M., & Parson, W. (2013). Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). *Forensic Science International: Genetics*, 7(6), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.07.005>
- 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
- Royani, J. I., Sinaga, O. F. B., Aliyah, K. N., Hardianto, D., Agustina, T., Rofiq, M. N., Kristantini, Handayani, T., Puspitasari, W., Sudarsono, Abdullah, L., & Asiyah, S. I. (2022). Screening of simple sequence repeats (SSR) primers from mutated *Indigofera zolligeriana* Miq plants. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1114(1), 012106. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1114/1/012106>
- 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>
- Saferstein, R. (2014). *Forensic Science From the Crime Scene to the Crime Lab* (First Edition). Pearson.
- Salas, A., Bandelt, H.-J., Macaulay, V., & Richards, M. B. (2007). Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics. *Forensic Science International*, 168(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.037>
- Salas, A., Carracedo, Á., Macaulay, V., Richards, M., & Bandelt, H.-J. (2005). A practical guide to mitochondrial DNA error prevention in clinical, forensic, and population genetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(3), 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.161>
- Salem K. Alketbi. (2023). The role of DNA in forensic science: A comprehensive review. *International Journal of Science and Research Archive*, 9(2), 814–829. <https://doi.org/10.30574/ijrsra.2023.9.2.0624>
- Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., & Dash, T. (2021). Understanding the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Program and a Step-by-step Guide for its use in Life Science Research. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika, Of*. <https://doi.org/10.18805/BKAP283>
- Saraswati, H., & Wahyuni, F. D. (2019). Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 33–38.

- 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.*
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). *Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review.* 2014.
- Sato, M., & Sato, K. (2012). Maternal inheritance of mitochondrial DNA. *Autophagy*, 8(3), 424–425. <https://doi.org/10.4161/auto.19243>
- Schurr, T. G., & Wallace, D. C. (2002). Mitochondrial DNA Diversity in Southeast Asian Populations. In *Human Biology* (Vol. 74, pp. 431–452). Wayne State University Press,.
- Septiasari, N. P. S. (2022). Optimasi PCR dengan Penanda Daerah D-loop DNA Mitokondria untuk Metode Tes DNA. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences (IJLFS)*, 12(2), 76. <https://doi.org/10.24843/IJLFS.2022.v12.i02.p03>
- Setiawan, T., Maksum, I. P., & Yusuf, M. (2023). Review: Mutasi DNA Mitokondria Penyebab Penyakit Mitokondria dan Diagnosis Mekanisme Molekulernya melalui Pendekatan. *Kimia Padjadjaran*, 2(1), 16–28.
- Sharma, M. (2021). BASIC CONCEPTS OF PRIMER DESIGNING: A MINIREVIEW. *International Journal of Latest Trends in Engineering and Technology*, 17(4), 010–012. <http://dx.doi.org/10.21172/1.174.03>
- Singh, J., Birbian, N., Sinha, S., & Giswami, A. (2014). A critical review on PCR, its types and applications. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH IN BIOLOGICAL SCIENCES*, 1(7), 65–80.
- Sprason, C., Tucker, T., & Clancy, D. (2024). MtDNA deletions and aging. *Frontiers in Aging*, 5, 1359638. <https://doi.org/10.3389/fragi.2024.1359638>
- Stadhouders, R., Pas, S. D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T. H. M., & Schutten, M. (2010). The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(1), 109–117. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035>
- Stefano, G. B., & Kream, R. M. (2016). Mitochondrial DNA heteroplasmy in human health and disease. *Biomedical Reports*, 4(3), 259–262. <https://doi.org/10.3892/br.2016.590>
- Stoneking, M., & Hedgecock, D. (1991). *Population Variation of Human mtDNA Control Region Sequences Detected by Enzymatic Amplification and Sequence-specific Oligonucleotide Probes.* 48, 370–382.
- Theda, C., Hwang, S. H., Czajko, A., Loke, Y. J., Leong, P., & Craig, J. M. (2018). Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. *Scientific Reports*, 8(1), 6944. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25311-0>
- Torres, J. B. (2016). A history of you, me, and humanity: Mitochondrial DNA in anthropological research. *AIMS Genetics*, 03(02), 146–156. <https://doi.org/10.3934/genet.2016.2.146>
- Tran, T. T. H., Nguyen, D. H., Tran, V. K., Nguyen, Q. L., Trinh, H. A., Luong, L. H., Tran, V. A., Pham, L. A. T., Nguyen, T. T., Nguyen, V. B., Tran, T. H., & Van Ta, T. (2018). Variation of Mitochondrial DNA HV1 AND HV2 of the Vietnamese Population. In P. V. Pham (Ed.), *Cancer Biology and Advances in Treatment* (Vol. 1292, pp. 37–63). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/5584_2018_301
- Tumonggor, M. K., Karafet, M. T., Hallmark, B., Lansing, S. J., Sudoyo, H., Hammer, F. M., & Cox, P. M. (2013). The Indonesian archipelago: An ancient genetic highway linking Asia and the Pacific. *Journal of Human Genetics*, 58, 165–173.
- Ullah, S., Garg, R. K., Noor, F., & Kaur, M. (2016). Mitochondrial DNA (mtDNA) sequence analysis as an additional tool for forensic identification purposes. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 38(2), 229. <https://doi.org/10.5958/0974-0848.2016.00059.2>

- Vadakedath, S., Kandi, V., Ca, J., Vijayan, S., Achyut, K. C., Uppuluri, S., Reddy, P. K. K., Ramesh, M., & Kumar, P. P. (2023). Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid (mtDNA), Maternal Inheritance, and Their Role in the Development of Cancers: A Scoping Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.39812>
- Van Neste, C., Van Nieuwerburgh, F., Van Hoofstat, D., & Deforce, D. (2012). Forensic STR analysis using massive parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 6(6), 810–818. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.03.004>
- Van Oorschot, R. A. H., Szkuta, B., Meakin, G. E., Kokshoorn, B., & Goray, M. (2019). DNA transfer in forensic science: A review. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 140–166. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.014>
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4>
- 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>
- Verdon, T. J., Mitchell, R. J., & Van Oorschot, R. A. H. (2013). The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.09.004>
- 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>
- Victoriano, C. M., Pask, M. E., Malofsky, N. A., Seegmiller, A., Simmons, S., Schmitz, J. E., Haselton, F. R., & Adams, N. M. (2022). Direct PCR with the CDC 2019 SARS-CoV-2 assay: Optimization for limited-resource settings. *Scientific Reports*, 12(1), 11756. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15356-7>
- 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>
- Wang, C. (2016). *Primer Design*. Centre for Medical Parasitology University of Copenhagen.
- Widhiantara, I. G. (2020). Mutasi DNA Mitokondria Pada Pria Infertil. *Jurnal Media Sains*, 4(1). <https://doi.org/10.36002/jms.v4i1.1127>
- Wu, J.-S., Lee, C., Wu, C.-C., & Shiue, Y.-L. (2004). Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics*, 20(11), 1710–1717. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth147>
- 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>
- Yuan, R.-T., Sun, Y., Bu, L.-X., & Jia, M.-Y. (2015). Gene mutations in the D-loop region of mitochondrial DNA in oral squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 11(6), 4496–4500. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3240>
- Yudianto, A., & Margaret, N. (2018). Local Mapping Profile of Mitochondrial DNA (MtDNA)-Loop in Forensic Identification. *Folia Medica Indonesiana*, 54(3), 179. <https://doi.org/10.20473/fmi.v54i3.10008>
- 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. 56(04).

- Yulita, N., Achyar, A., & Putri, D. H. (2023). Primer Design and Annealing Temperature Optimization for Catalase (CAT) Gene Amplification in Rice (*Oryzasativa*L.). *SERAMBI BIOLOGI*, 8(3), 437–444. <https://doi.org/10.24036/srmb.v8i3.222>
- Zhang, R., Nakahira, K., Guo, X., Choi, A. M. K., & Gu, Z. (2016). Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma. *Scientific Reports*, 6(1), 36097. <https://doi.org/10.1038/srep36097>
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR Past, Present and Future. *BioTechniques*, 69(4), 317–325. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>

