

ANALISIS POLIMORFISME GENETIKA ALDEHID DEHIDROGENASE 2 (ALDH2) PADA ETNIS MINANGKABAU

Taufik Hidayat¹, Yudha Nurhantari², Suhartini²

¹Departemen Forensik dan Medikolegal Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang

²Departemen Ilmu Kedokteran Forensik dan Medikolegal Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
e-mail: taufikhidayat@med.unand.ac.id

ABSTRAK

Enzim *Aldehid dehidrogenase 2* (ALDH2) merupakan isozim utama yang dapat mengkonversi asetaldehid menjadi asam asetat. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis polimorfisme genetik ALDH2 pada etnis Minangkabau. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Populasi dan sampel adalah kelompok orang etnis Minangkabau yang tinggal di Yogyakarta dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Dilakukan pemeriksaan polimorfisme genetik enzim ALDH2 dengan metode PCR-RFLP dengan enzim restriksi *EarI*. Dari 24 sampel yang dilakukan elektroforesis RFLP didapatkan frekuensi genotip *wild type* pada 5 sampel (20.8%), heterozigot polimorfisme pada 16 sampel (66.7%) dan homozigot polimorfisme/*polymorphic type* pada 3 sampel (12.5%). Terdapat sebaran frekuensi genotip polimorfisme ALDH2 heterozigot dan homozigot polimorfisme pada etnis Minangkabau dewasa muda non alkoholik dan sehat.

Kata kunci: aldehid dehidrogenase 2., polimorfisme., etnis Minangkabau

ABSTRACT

Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) is the main isozymes that can converted efficiently acetaldehyde into acetic acid. The aim of this study is to analyze genetic polymorphism of ALDH2 of Minangkabau ethnic group and its relationship with alcohol sensitivity. This research use descriptive methodology. Population and sample taken from Minangkabau people who lived in Yogyakarta who passed the inclusion and exclusion criteria. Examination of polymorphism of ALDH2 was conducted to the sample with PCR-RFLP with *EarI* Restriction enzyme. From 24 electrophoresis samples we got genotype frequency of wild type is 5 samples (20.8%), heterozygote polymorphism is 16 samples (66.7%) and homozygote polymorphism/polymorphic type is 3 samples (12.5%). We conclude that there are heterozygote polymorphism and homozygote polymorphism in the young adult, non alcoholic and healthy Minangkabau ethnic group.

Keywords: aldehyde dehydrogenase 2., polymorphism., Minangkabau ethnic

PENDAHULUAN

Metabolisme oksidatif alkohol tergantung pada 2 enzim utama yaitu alkohol dehidrogenase (ADH) dan aldehid dehidrogenase (ALDH). ALDH mengkonversi asetaldehid menjadi asetat, karbon dioksida dan air. Beberapa isoform ALDH mempunyai aktifitas lemah dan lambat dalam mengubah asetaldehid sehingga terjadilah penumpukan asetaldehid dalam tubuh¹. Penumpukan asetaldehid mengakibatkan gejala mabuk seperti muka kemerahan, takikardia, hipotensi, sakit kepala, mual, muntah, kelemahan otot dan mengantuk, meskipun kadar alkohol didalam darahnya masih relatif rendah. ALDH2

merupakan isozim utama yang dapat mengkonversi secara efisien asetaldehid menjadi asam asetat di hati².

Etnis Minangkabau termasuk ke dalam kelompok *Deutro Melayu* (Ras *Mongoloid*) dan menghuni pulau Sumatra bagian tengah³. Pada etnis Asia didapatkan sensitivitas yang rendah terhadap alkohol yang bervariasi antar kawasan⁴. Hal ini diakibatkan oleh polimorfisme genetik enzim ADH dan ALDH. Keadaan inilah yang mengakibatkan kepekaan orang oriental terhadap minuman beralkohol sangat heterogen. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis polimorfisme genetik ALDH2 pada etnis Minangkabau sehat non peminum alkohol.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan menganalisis polimorfisme genetika enzim ALDH2 pada etnis Minangkabau sehat non peminum alkohol. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dimulai bulan Agustus sampai Oktober 2016.

Populasi dalam penelitian ini adalah individu etnis Minangkabau. Populasi target penelitian adalah seluruh orang yang beretnis Minangkabau. Populasi terjangkau dari penelitian ini adalah orang beretnis Minangkabau yang tinggal di Daerah Istimewa Yogyakarta. Subjek penelitian merupakan sukarelawan yang bersedia diperiksa dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel diambil berdasarkan metode *consecutive sampling*. Kriteria inklusi meliputi sukarelawan laki-laki dan perempuan, etnis Minangkabau, sehat, berusia diatas 18 tahun serta menandatangani *informed consent* (bersedia diperiksa). Kriteria eksklusi adalah orang coba yang memiliki hubungan darah dan membatalkan keikutsertaan mengikuti penelitian oleh karena berbagai sebab. Besar sampel 24 orang yang memenuhi syarat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah etnis Minangkabau. Variabel tergantung adalah polimorfisme genetika enzim ALDH2. Variabel yang berpengaruh dalam pengukuran antara lain pengambilan sampel, pengolahan sampel dan pemeriksaan sampel.

Cara kerjanya sebagai berikut:

1. Diambil darah 5 cc dari *vena cubiti* setelah sebelumnya diberikan penjelasan dan persetujuan (*informed consent*) naracoba.
2. Darah dimasukkan ke dalam tabung EDTA dan dikirim ke laboratorium.
3. Pemeriksaan gen ALDH2 dengan cara:
 - a. Ekstraksi DNA:
Menggunakan protokol dari Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit:
Reagen dan cara ekstraksi DNA:
 1. Isi tabung dengan 300 µl darah EDTA ditambahkan 700 µl *red blood cell lysis*.
 2. Kocok larutan diatas dan inkubasi selama 10 menit didalam temperatur ruangan.
 3. Sentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰ C.
 4. Supernatan dibuang dengan hati-hati agar endapan tidak ikut terbuang, apabila masih merah ulangi 4-5 kali sampai larutan jernih.
 5. Tabung kemudian di *vortex*.
 6. Ke dalam tabung lalu ditambahkan 300 µl *nuclei lysis solution* kemudian tabung dibolak-balik.
 7. Selanjutnya kedalam tabung ditambahkan 100µl *protein precipitation solution* dan tabung di *vortex* selama 20 detik.
 8. Sentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰ C

9. Pindahkan supernatan ke dalam tabung yang berisi 300 µl isopropanolol dan tabung dibolak-balik.
10. Sentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰ C
11. Supernatan dibuang, ke dalam tabung ditambahkan 300 µl etanol 70%
12. Sentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit suhu 4⁰ C
13. Etanol 70% dalam tabung dibuang dan tabung dikeringkan
14. DNA direhidrasi dengan 100 µl DNA *rehydration solution*.
15. Simpan dalam suhu 4⁰ C semalaman.
- b. Mengukur kadar DNA dengan menggunakan spektrofotometer.
- c. Amplifikasi:
Pasangan primer yaitu *f primer* 5'-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3' dan *r primer* 5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTT-3' (Goedde *et al.*, 1989; Takeshita *et al.*, 1994). Amplifikasi PCR akan dilakukan menggunakan PCR *master mix* Promega 30 µl yang terdiri dari: Master mix sebanyak 15 µl. Pasangan primer F dan R sebanyak 2 µl. H₂O sebanyak 11 µl. DNA sebanyak 2 µl. PCR kondisi yang akan digunakan 35 siklus yang terdiri dari: 96⁰ C selama 4 menit, 94⁰ C selama 1 menit, 55⁰ C selama 1 menit, 72⁰ C selama 1 menit, 72⁰ C selama 7 menit dan 4⁰ C selama 7 menit.
- d. Proses elektroforesis
Hasil amplifikasi selanjutnya akan dicek dengan gel agarose 2% dengan pewarnaan ethidium bromida. Proses elektroforesis dengan 100 v selama 30 menit.
- e. Hasil elektroforesis kemudian dibaca dan didapatkan persebaran gen ALDH2.
- f. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).
Hasil amplifikasi kemudian *didigest* dengan enzim EarI (New England BioLabs.Inc) yang memotong DNA pada *recognition site* (5'-CTCTTC): Enzim EarI : 0,5 µl, Buffer : 4 µl, H₂O: 4 µl. PCR product: 1,5 µl. Disentrifuse, diinkubasi selama 5 menit suhu 37⁰ dan dielektroforesis dengan gel agarose 3%, 100 v selama 35 menit.
- g. Elektroforesis lagi dan pembacaan hasil
Setelah *digest* dan elektroforesis kemudian dilihat sebaran gambaran DNA enzim ALDH2. Hasilnya dikelompokkan atas 3 genotip yaitu *ALDH2*1/*1* (*wild type*), *ALDH2*2/*2* (homozigot polimorfisme), dan *ALDH2*1/*2* (heterozigot polimorfisme).
Analisis data dengan statistik deskriptif data kategorik, yaitu frekuensi tiap kategori (n) dan persentase tiap kategori (%), yang umumnya disajikan dalam bentuk tabel atau grafik. Dilakukan analisis *chi square* untuk menentukan kebermaknaan frekuensi genotip yang didapat. *Ethical clearance* penelitian ini dikeluarkan oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

HASIL

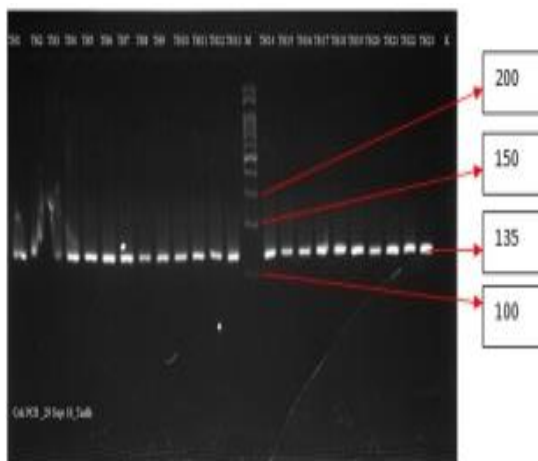
Karakteristik Subyek Penelitian

Karakteristik subyek penelitian seperti terlihat pada tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian

Data		Jumlah (n)	Persentase (%)
Jenis kelamin	Laki-laki	22	91,7
	Perempuan	2	8,3
Usia	18-28 tahun	24	100
	Pendidikan		
Mahasiswa S1/ sederajat	Mahasiswa S1/ sederajat	21	87,5
	Mahasiswa S2/ sederajat	3	12,5
Status pernikahan	Belum menikah	22	91,7
	Menikah	2	8,3
Riwayat minum alkohol	Belum pernah	24	100
	Pernah	0	0
Riwayat penyakit berat	Tidak pernah	24	100
	Pernah	0	0

Hasil pengamatan elektroforesis dengan media agarose 2% pada sampel etnis Minangkabau bisa terlihat pada gambar 1:



Gambar 1. Hasil elektroforesis

Ringkasan polimorfisme enzim ALDH2 pada etnis Minangkabau terlihat pada tabel 2 sebagai berikut.

Tabel 2. Polimorfisme enzim ALDH2 pada Etnis Minangkabau.

No	Sampel	RFLP- elektroforesis	Interpretasi
1	TH1	112bp, 23 bp	<i>Wild type</i>
2	TH2	112bp, 23 bp	<i>Wild type</i>
3	TH3	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
4	TH4	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
5	TH5	112bp, 23bp	<i>Wild type</i>
6	TH6	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
7	TH7	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
8	TH8	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
9	TH9	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
10	TH10	135bp	Polimorfisme homozigot
11	TH11	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
12	TH12	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
13	TH13	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
14	TH14	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
15	TH15	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
16	TH16	135bp	Polimorfisme homozigot
17	TH17	135bp	Polimorfisme homozigot
18	TH18	112bp, 23bp	<i>Wild type</i>
19	TH19	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
20	TH20	112bp, 23bp	<i>Wild type</i>
21	TH21	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
22	TH22	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
23	TH23	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot
24	TH24	112bp, 23bp, 135bp	Polimorfisme heterozigot

Ringkasan jumlah dan frekuensi polimorfisme *ALDH2* pada etnis Minangkabau seperti terlihat pada tabel 3 berikut.

Tabel 3. Jumlah dan frekuensi polimorfisme genetika *ALDH2* pada etnis Minangkabau.

No	Klasifikasi	Jumlah (n)	Frekuensi (%)
1	<i>Wild type (ALDH2*1/*1)</i>	5	20.8
2	Polimorfisme heterozigot (<i>ALDH2*1/*2</i>)	16	66.7
3	Polimorfisme homozigot (<i>ALDH2*2/*2</i>)	3	12.5
Total		24	100

1. PEMBAHASAN

Gen *ALDH2* menempati lokus 12q24.2 dan mempunyai polimorfisme G-A (Glu487Lys). Amplifikasi gen *ALDH2* menggunakan metode PCR dengan menggunakan *forward* primer (5'-CAATTACAGGGTCAACTGCT) dan *reverse* primer (5'-CAACACTCACAGTTTTCTCTT)⁵. Kedua primer inilah yang akan menjadi untaian komplementer dari *template* DNA. F-primer berkomplementer dengan untaian yang satu dan R-primer berkomplementer dengan untaian yang lainnya. R-primer memiliki 2 nukleotida yang tidak berkomplementer dengan kodon yang terdapat di *template strand*. Kondisi ini didesain secara khusus untuk membentuk area restriksi untuk enzim Ksp 632I dalam produk PCR^{2,6}. Pada penelitian ini digunakan enzim EarI yang memiliki area restriksi yang sama dengan enzim Ksp 632I. Enzim EarI merupakan strain *E coli* yang membawa gen EarI dari *Enterobacter aerogenes* (C. Pollison).

DNA akan terpotong oleh enzim EarI di area yang dikenali oleh enzim tersebut (area restriksi) yaitu 5'-CTCTTC. Reaksi restriksi (RFLP) tersebut terjadi pada suhu 37°C selama 5-15 menit. Pada prosedur selanjutnya dilakukan identifikasi golongan alel gen *ALDH2* dengan menggunakan RFLP yang kemudian kembali dibaca menggunakan agarose gel elektroforesis dan sinar UV. Jika terdapat perbedaan molekul dalam urutan nukleotida, fragmen dengan ukuran yang berbeda mungkin dihasilkan. Perbedaan dalam hasil panjang fragmen DNA adalah disebabkan dari substitusi dasar, penambahan, penghapusan atau penyusunan ulang dalam rekognisi enzim restriksi.

Hasil pemisahan dengan menggunakan RFLP ini kemudian dikelompokkan menjadi 3 genotip berbeda yaitu genotip *ALDH2*1/*1* (GG, *wild type*), *ALDH2*1/*2* (GA, *heterozygote*) dan *ALDH2*2/*2* (AA, *polymorphic type*) dan

distribusi ketiga jenis genotip ini adalah sangat berbeda (Bosro, 2011). Individu yang memiliki polimorfisme *ALDH2*1/*1* akan terpotong oleh enzim restriksi EarI, hal ini karena polimorfisme *ALDH2*1/*1* tidak mengalami mutasi atau substitusi dasar pada fragmen DNA-nya. Didapatkan hasil pemotongan genotip *ALDH2* yang *wild type* terletak di *band* 112bp dan 23 bp. Pada 5 naracoba (20.8%) dari 24 naracoba etnis Minangkabau merupakan *wild type*.

Individu dengan polimorfisme *ALDH2*1/*2* juga akan terpotong oleh enzim EarI. Hasil pemotongan genotip *ALDH2* dengan polimorfisme heterozigot terletak di *band* 135 bp, 112bp dan 23bp. Kondisi ini terjadi karena alel *ALDH2*1/*2* ini memiliki kondisi heterozigot dimana alel ini membawa satu alel dari *wild type* dan satu alel lagi dari *polymorphic type* yang telah terjadi mutasi atau disebut juga alel *mutant*. Pada 16 naracoba (66.7%) dari 24 naracoba etnis Minangkabau merupakan polimorfisme heterozigot.

Individu dengan polimorfisme *ALDH2*2/*2* tidak akan terpotong oleh enzim EarI. Jadi didapatkan alel *ALDH2*2/*2* hanya terletak pada *band* 135bp. Kondisi ini terjadi karena telah terjadinya mutasi pada genotip *ALDH2* yang akhirnya terbentuk polimorfisme *ALDH2*2/*2* yaitu *polymorphic type* atau alel mutan. Pada 3 naracoba (12.5%) dari 24 naracoba etnis Minangkabau merupakan polimorfisme homozigot /*polymorphic type*.

Mutasi ini bisa terjadi di fragmen DNA yang bisa disebabkan oleh adanya reaktif oksigen, sepsis, substitusi dasar, penambahan atau penghapusan. Homozigot *ALDH2*2* secara esensial pada dasarnya tidak menunjukkan aktifitas dari *ALDH2*, sedangkan heterozigot walau berkurang aktifitasnya tetapi masih terdeteksi. Satu perubahan nukleotida menghasilkan polimorfisme *Glu487Lys*. Ini sangat penting bagi fungsi *ALDH2*. Alel *ALDH2*1* (*487Glu*) memiliki aktifitas enzim penuh, sedangkan alel *ALDH2*2* (*487Lys*) tidak memiliki aktifitas. Ini berarti bahwa individu dengan *ALDH2*2* tidak bisa minum segelas bir karena adanya kelemahan dalam mendetoksifikasi asetaldehid^{7,8}.

Keberadaan alel *ALDH2*2* menyebabkan kecepatan metabolisme alkohol (dari asetaldehid menjadi asetat) berkurang sehingga terjadi penumpukan asetaldehid didalam darah yang dapat terjadi hanya dengan meminum sedikit alkohol. Alel *ALDH2*2* memberikan efek protektif yaitu adanya kecenderungan untuk tidak meminum alkohol dan rentan terhadap efek toksik yang dapat merusak berbagai organ vital^{9,10,11}

Frekuensi alel *ALDH2* bervariasi pada populasi yang berbeda⁸. Hasil yang diharapkan dalam penelitian ini setelah dilakukan RFLP adalah terdapatnya distribusi ketiga genotip *ALDH2* ini pada etnis Minangkabau. Etnis Minangkabau merupakan bagian dari ras Mongoloid. Ras Mongoloid memiliki distribusi genotip *ALDH2*1/*2 heterozygot polymorphic type* dan genotip *ALDH2*2/*2 polymorphic type* yang lebih banyak daripada ras *Kaukasoid* dan *Negroid*. Kedua atipikal *type ALDH2* diatas merupakan

slower alel yang menyebabkan sensitivitas orang-orang dari ras *Mongoloid* terhadap alkohol menjadi rendah sehingga mereka lebih cepat mabuk dibandingkan dengan orang-orang dari kedua ras lainnya. Penurunan aktifitas *ALDH2* tersebut dikarenakan adanya substitusi pada 1 nukleotida (dari G menjadi A) di kodon 487, sehingga terjadi perubahan *glutamic acid* (GAA) menjadi *lysine* (AAA) diposisi 487 subunit β dan menyebabkan isoenzimnya menjadi tidak aktif (Kitagawa *et al.*, 2000). Pada individu dengan alel *ALDH2*2* homozigot, meminum alkohol dapat memberikan efek kardiovaskular, disforia, palpitasi, mulut kering, sakit kepala, mual dan *facial flushing* yang muncul akibat penumpukan asetaldehid. Individu dengan alel ini dapat menurunkan risiko menjadi pecandu alkohol sampai 10 kali^{12,13,14,15,16,17,18,19,20}.

Polimorfisme *ALDH2* sesama ras *Mongoloid* pun berbeda tergantung subetnisnya, sehingga penelitian analisis polimorfisme genetik enzim *ALDH2* pada etnis Minangkabau ini diharapkan mampu memberikan sumbangsih yang bermakna terhadap kemajuan ilmu pengetahuan kedokteran, khususnya dibidang ilmu kedokteran forensik molekuler.

2. SIMPULAN DAN SARAN

Pada penelitian ini ditemukan *band* gen *ALDH2* etnik Minangkabau dewasa muda non peminum alkohol dan sehat berada diantara 100bp-200bp dengan *expected size* 135bp. Setelah dilakukan RFLP dengan enzim *EcoRI* didapatkan hasil frekuensi genotip *wild type* (*ALDH2*1/*1*) sebesar 20.8%, polimorfisme heterozigot (*ALDH2*1/*2*) sebesar 66.7% dan polimorfisme homozigot atau *polymorphic type* (*ALDH2*2/*2*) sebesar 12.5%. Penelitian pada ras dan subetnis yang menghuni Negara Kesatuan Republik Indonesia. Dilakukan analisis genotip *ADH* untuk mengetahui peran gen *ADH* dalam metabolisme alkohol pada etnis Minangkabau.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih untuk staf pengajar Departemen dan PPDS Ilmu Kedokteran Forensik dan Medikolegal Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan staf Instalasi Kedokteran Forensik RSUP dr. Sardjito Yogyakarta.

DAFTAR PUSTAKA

1. Scott, D.M., Taylor, R.E. Health Related Effects of Genetic Variations of Alcohol-Metabolizing Enzymes in African American. *Alcohol Research&Health*. 2007;30(I)
2. Wanandi, S.I. Distribution of Genetic Metabolism of Aldehid dehidrogenase 2 (ALDH2) in Indonesian Subjects. *Med.J.Indonesia*. 2002;11(3):135-142.
3. Koentjaraningrat. Manusia dan Kebudayaan di Indonesia. Djambatan, Jakarta.1987

4. Thomasson, H.R., et al. Alcohol and Aldehid dehidrogenase Genotypes and Alcoholism in Chinese Men. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 48:677-681
5. Goedde, H.W., Agrawal, D.P. Asetaldehid Metabolism: Genetic Variation and Physiological Implications. In: Alcoholism: Biomedical and Genetics Aspect. Pergamon Press, Elmsford. 1989
6. Bosron, W.F., Li, T.K. Genetic Polymorphisms of Human Liver Alcohol and Aldehid dehidrogenase, and Their Relationship to Alcohol Metabolism and Alcoholism. *Hepatology* 6.1986
7. Crabb, D.W., Edenberg, H.J., Bosron, W.F., Li, T.K. Genotypes for Aldehid dehidrogenase Deficiency and Alcohol Sensitivity. *J.Clin.Invest.* 1989;83, pp.314-316.
8. Cichoz-Lach, H., Partycka, J., Nesina, I., Celinski, K., Siomka, M., Wojcierowski, J. Genetic Polymorphism of Alkohol dehidrogenase 3 in Alkohol Liver Cirrhosis and In Alkohol Chronic Pancreatitis, *Alcohol and Alcoholism*. 2005;41,No.I,14-17.
9. Borrás, E., Coutelle, C., Rossel, A., et al., Genetic Polymorphism of Alkohol dehidrogenase in Europeans: The ADH2*2 Allele Decreases the Risk for Alcoholism and Its Associated with ADH3*1. *Hepatology*.2000;31(4):984-989.
10. Charalambous, M.P. Alcohol and the Accident and Emergency Department. *A Current Review, Alcohol and Alcoholism*.2002; 37(4):307-312.
11. Chiao-Chicy, C., et al. Interaction between the Functional Polymorphisms of the Alcohol-Metabolism Genes in Protection Against Alcoholism, *American Journal of Human Genetic*.1999; 65: 795-807.
12. Dharam, P., Agarwal, D.P., Helmut, K., Seitz. *Alcohol in Health and Disease*. New York.2001
13. Edenberg,H.J.The Genetics of Alkohol Metabolism.*AlcoholResearch&Health*.2007;30.(I)
14. Ehlers, C.L. Variations in ADH and ALDH in Southwest California Indians.2007; A, 14-17.
15. Eng, M.Y., Luczak, S.E., Wall, T.L. ALDH2,ADH1B&ADH1C Genotypes in Asians: A Literature Review. *Alcohol Research&Health*.2007;30(I)
16. Fachtiyah, Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., Rahayu, S. *Biologi Molekuler. Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta.2011
17. Greenfield, N.J., Pietruszko, R. Two Aldehid dehidrogenasees from Human Liver: Isolation via Affinity Chromatography and Characterization of the Isozymes. *Biochemica et Biophysica Acta*.1977;483,34-45.
18. Kayaalti, Z., Söylemezoğlu, T. Distribution of ADH1B, ALDH2, CYP2E1 *6, and CYP2E1 *7B genotypes in Turkish population. *AlcoholFayetteville,N.Y*.2010;44(5),415–23.
19. Kim, J. S., Kim, Y. J., Kim, T. Y., Song, J. Y., Cho, Y. H., Park, Y. C., Chung, H. W. Association of ALDH2 Polymorphism with Sensitivity to Asetaldehid-Induced

- Micronuclei and Facial Flushing after Alcohol Intake. *Toxicology*.2005;210(2-3), 169–74.
20. Luo, X., Kranzler, H.R., Zoo, L., *et.al.* Diplotype Tread Regression Analysis of the ADH Gene Cluster and the ALDH2 Gene Multiple Significant Association for Alcohol Dependence. *American Journal of Human Genetics*.2006; 78:973-987,2006.PMID 16685648