

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

Langkah-langkah yang dilakukan pada penelitian ini adalah : pengumpulan sampel data urutan nukleotida daerah Hipervariabel II (HVII) DNA mitokondria (mtDNA) pada penderita Diabetes Mellitus tipe 2 (DM tipe 2) dari situs NCBI dengan proses pengunduhan; perbandingan urutan nukleotida sampel dengan urutan nukleotida standar (*complete genom*) yaitu *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) menggunakan program *SeqMan<sup>TM</sup>* versi 4.00 *DNASTAR*; dan perbandingan urutan nukleotida sampel dengan marker genetik pemicu DM tipe 2 yang telah dipublikasi di situs NCBI dan Mitomap.

#### 2.1. Bagan Alir Penelitian

Garis besar keseluruhan tahapan penelitian yang dilakukan ditunjukkan pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian**

## 2.2. Sampel dan Program yang Digunakan

Sampel pada penelitian ini berupa urutan nukleotida di daerah HVII pada penderita Diabetes Mellitus (DM) tipe 2 yang diunduh dari situs resmi *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Sedangkan program yang digunakan untuk menganalisis data urutan nukleotida sampel adalah *SeqMan<sup>TM</sup>* versi 4.00 *DNASTAR*.

## 2.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret-Oktober 2011 yang dilakukan di kota Bandung.

## 2.4. Tahapan Penelitian

### 2.4.1. Pengumpulan Sampel

Pertama-tama dilakukan penelusuran data urutan nukleotida sampel yang dipublikasi di situs NCBI, lalu seleksi data sampel yang relevan dan kemudian dilakukan proses pengunduhan data urutan nukleotida yang akan dianalisis dari situs NCBI. Gambar 3.2 menunjukkan kata kunci yang dimasukkan pada mesin pencari situs NCBI, untuk mendapatkan data sampel yang relevan, yaitu *mtDNA Diabetes* dengan jenis data *Nucleotide*.

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide mtdna diabetes

Save search Limits Advanced

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Default order

**Gambar 3.2. Kata Kunci yang Dimasukkan pada Mesin Pencari Situs NCBI.**

Kata kunci yang digunakan yaitu *mtDNA Diabetes* dengan jenis data *Nucleotide*. (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)

Gambar 3.3 menunjukkan informasi singkat mengenai sampel pada GenBank, yang muncul setelah kata kunci tersebut dimasukkan. Informasi ini termasuk kode dan sumber, nomor akses, judul artikel mengenai penelitian tentang data urutan nukleotida sampel, peneliti dalam studi tersebut, dan jurnal dimana artikel tersebut dipublikasi. Penanda merah menunjukkan *link FASTA* yang dipilih untuk mendapatkan satu data urutan nukleotida di daerah HVII.

### Homo sapiens isolate T10 mitochondrial control region, hypervariable segment II

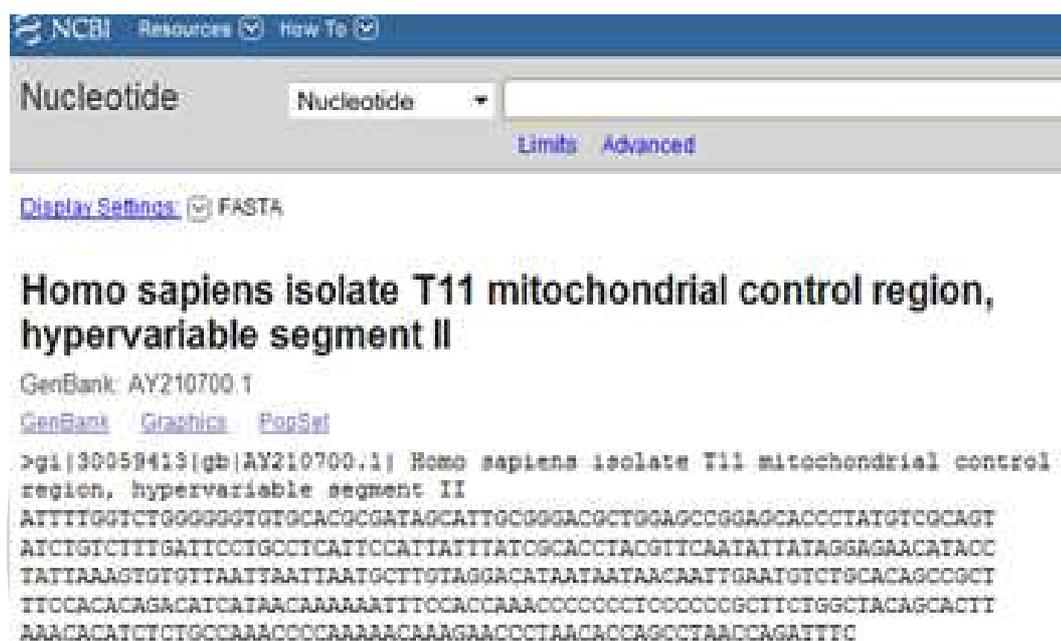
GenBank: AY210699.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

LOCUS AY210699 341 bp DNA linear PRI 22-APR-2003  
 DEFINITION Homo sapiens isolate T10 mitochondrial control region, hypervariable segment II.  
 ACCESSION AY210699  
 VERSION AY210699.1 GI:30059412  
 KEYWORDS .  
 SOURCE mitochondrion Homo sapiens (human)  
 ORGANISM [Homo sapiens](#)  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 341)  
 AUTHORS McLean,D.C. Jr., Spruill,I., Gevao,S., Morrison,E.Y., Bernard,O.S., Argyropoulos,G. and Garvey,W.T.  
 TITLE Three novel mtDNA restriction site polymorphisms allow exploration of population affinities of African Americans  
 JOURNAL Hum. Biol. 75 (2), 147-161 (2003)

**Gambar 3.3. Informasi Singkat Mengenai Sampel.** Tampilan ini muncul setelah kata kunci dimasukkan, penanda merah menunjukkan *link FASTA* yang dibuka untuk mendapatkan data berupa satu urutan nukleotida di daerah HVII mtDNA manusia. (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)

Gambar 3.4 memuat satu data urutan nukleotida dari satu kode sampel, dan informasi tentang nomor akses sampel pada GenBank. Data urutan nukleotida ini kemudian akan disalin dan dibandingkan dengan varian normal berupa *complete genom* pada *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS).



NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide Limits Advanced

Display Settings FASTA

**Homo sapiens isolate T11 mitochondrial control region, hypervariable segment II**

GenBank: AY210700.1

GenBank Graphics PopSet

```
>gi|30059413|gb|AY210700.1| Homo sapiens isolate T11 mitochondrial control
region, hypervariable segment II
ATTTTGGTCTGGGGGAGTGTGCACGCGATAGCATTGCGGGACGCTGGAGCCGGAGCCACCCATATGTCCGCAST
ATCTGTCTTTGATTCCTGCGCTCATTCCATTATTTATCGCACCTACGTTCAATATTATAGGAGAACATAACC
TATIAAAGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATGGAATGTCTGCACAGCCGCT
TTCCACACAGACATCATAACAAAAAATTTCCACCAAAACCCCGCTCCCGCGGCTTCTGGCTACAGCACTT
AAACACATCTCTGCCAAACCCAAAAACAAGAACCCCTAACCAACCCGCTAACCCAGATTTC
```

**Gambar 3.4. Data Urutan Nukleotida.** Urutan nukleotida ini berasal dari satu sampel. (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)

Setelah dilakukan proses pengunduhan data urutan nukleotida, dilakukan proses *alignment* data tersebut pada program *SeqMan<sup>TM</sup>* versi 4.00 *DNASTAR*, untuk kemudian digunakan pada proses selanjutnya, yaitu perbandingan data sampel dengan urutan standar (varian normal) pada rCRS. Kemudian dilakukan penelusuran lebih lanjut mengenai sumber sampel dan metode pengumpulan sampel dengan mengunduh artikel asli pada jurnal yang tertera di informasi singkat mengenai sampel. Hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah data urutan nukleotida tersebut berasal dari penderita DM tipe 2. Gambar 3.5 menunjukkan

halaman depan artikel orisinal dengan judul *Three Novel mtDNA Restriction Site Polymorphisms Allow Exploration of Population Affinities of African Americans* yang dipublikasi pada jurnal *Human Biology* volume 25 pada bulan April 2003.

### Three Novel mtDNA Restriction Site Polymorphisms Allow Exploration of Population Afnities of African Americans

McLean, David C.  
Spruill, Ida.  
Gevao, Sahr.  
Morrison, Errol Y. St. A.

More

Human Biology, Volume 75, Number 2, April 2003, pp. 147-161 (Article)



**Gambar 3.5. Judul Artikel yang Dirujuk.** Setelah dilakukan penelusuran lebih lanjut, diketahui bahwa data urutan nukleotida sampel berasal dari penderita Diabetes Mellitus tipe 2 yang dipublikasi pada artikel *Three Novel mtDNA Restriction Site Polymorphisms Allow Exploration of Population Affinities of African Americans*. (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)

#### 2.4.2. Perbandingan Data Urutan Nukleotida Sampel dengan rCRS

Data urutan nukleotida daerah HVII DNA mitokondria (mtDNA) manusia pada penderita Diabetes Mellitus tipe 2 (DM tipe 2) yang telah diunduh dari situs NCBI, masing-masing dibandingkan dengan varian normal. Varian normal yang digunakan adalah urutan nukleotida standar daerah HVII yang berasal dari *complete genom* yang telah dipublikasi dan direvisi oleh Andrews *et al.* pada tahun 1999 yaitu *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS). Pemotongan daerah HVII varian normal dari *complete genom* pada rCRS yang akan digunakan

sebagai standar dilakukan dengan menggunakan program *SeqMan<sup>TM</sup>* versi 4.00 *DNA STAR*.

Masing-masing urutan nukleotida sampel dimasukkan pada program tersebut, kemudian program akan secara otomatis menandai basa pada posisi tertentu yang berbeda dengan basa pada standar rCRS. Perbandingan dikelompokkan sesuai kode sampel orisinal, lalu dilakukan penentuan posisi jenis mutasi secara manual dengan menganalisis nukleotida yang mengalami mutasi. Perbedaan urutan nukleotida sampel dengan nukleotida standar menunjukkan adanya mutasi pada sampel.

#### **2.4.3. Perbandingan Data Urutan Nukleotida Sampel Dengan Marker Genetik yang Telah Dipublikasi**

Setelah posisi jenis mutasi pada sampel dengan frekuensi lebih dari 50% diketahui, maka posisi jenis mutasi tersebut dibandingkan dengan mutasi spesifik yang merupakan marker genetik pemicu diabetes mellitus tipe 2 di daerah HVII D-Loop DNA mitokondria manusia yang telah dipublikasi pada situs NCBI dan Mitomap. Bila mutasi spesifik pada sampel merupakan variasi mutasi yang baru, maka mutasi tersebut dapat dikategorikan sebagai kandidat marker genetik, sedangkan bila mutasi spesifik sampel sama dengan marker, maka dapat disimpulkan bahwa hasil penelitian ini menguatkan marker genetik yang telah dipublikasikan pada studi sebelumnya.