p-ISSN: 1410-0029; e-ISSN2549-6786
Agrin Vol. 23, No. 2, Oktober 2019

OPTIMASI DAN EFISIENSI TEKNIK ISOLASI RNA DAUN DAN AKAR KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* Jacq)

Optimization and Efficiency of RNA Isolation Techniques from Leaves and Roots of Oil Palm (Elaeis guineensis Jacq)

Restu Prasetya Mukmin[1*], Sapto Nugroho Hadi[1], dan Irfan Martiansyah[2]

[1]Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman
Jalan Dr. Suparno No. 73, Purwokerto, 53122
[2]Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI)
Jalan Taman Kencana No. 1, Bogor, 16128

*Alamat Korespondensi:

ABSTRAK

Tanaman kelapa sawit memiliki kandungan polisakarida dan polifenol yang tinggi. Kontaminasi polisakarida dan polifenol menyebabkan sulitnya proses isolasi RNA dari jaringan tanaman kelapa sawit. Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi beberapa protokol isolasi RNA tanaman kelapa sawit yang efektif dan efisien. Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan, pada bulan Oktober-Desember 2018 di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI), Jalan Taman Kencana No. 1 Bogor 16128. Penelitian dilakukan dengan melaksanakan teknik isolasi RNA menggunakan tiga protokol, yaitu modifikasi *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), kit isolasi RNA *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), dan kit isolasi *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel). Sampel yang digunakan adalah daun dan akar tanaman kelapa sawit berumur kurang dari tiga bulan dengan bobot 0,1 gram dan 2,5 gram yang disesuaikan untuk tiap protokol. Variabel yang diamati adalah konsentrasi (ng/µl), kemurnian (rasio A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230}), dan pita RNA pada elektroforesis gel agarosa. Hasil penelitian menunjukkan, RNA total hasil isolasi protokol *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) memiliki kualitas paling tinggi. Konsentrasi RNA total daun dan akar kelapa sawit yang didapatkan melalui protokol *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) sebesar 338 ng/µl dan 184,4 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} RNA total daun dan akar kelapa sawit sebesar 2,13 dan 2,18 serta rasio A_{260}/A_{230} sebesar 2,09 dan 2,20. Hasil elektroforesis gel agarosa menunjukkan integritas yang bagus dari RNA total hasil isolasi*RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) dan *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel), namun terdapat kontaminasi dan *smear* pada RNA total hasilisolasi CTAB modifikasi 1 dan 2.

Kata kunci: kelapa sawit, isolasi RNA, spektrofotometer, elektroforesis gel agarosa

ABSTRACT

Oil palm contains high levels of polysaccharides and polyphenols. The isolation process of RNA from oil palm tissues is challenging due to the polysaccharides and polyphenols contamination. The aim of this study was to optimize the effective and efficient RNA isolation protocols from oil palm tissues. The research was conducted using three protocols such as the modification of Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB), RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) and NucleoSpin RNAPlant (Macherey-Nagel). Samples used the leaves and roots of oil palm which are less than three months old with sample weights of 0,1 gram and 2,5 gram which was adjusted for each protocols. The RNA integrity including concentration (ng/µl), purity (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratio) and quality of RNA by the electrophoresis gel agarose were observed. The result showed that total RNA yield from the NucleoSpin RNAPlant (Macherey-Nagel) protocol have the highest quality. Concentration of leaves and roots of oil palm total RNA were obtained from NucleoSpin RNAPlant (Macherey-Nagel) protocol was 338 ng/µl and 184,4 ng/µl with A_{260}/A_{280} ratio of leaves and roots of oil palm total RNA was 2,13 and 2,1 also A_{260}/A_{230} ratio was 2,09 and 2,20. The result of agarose electrophoresis indicated good integrity of leaves and roots of oil palm total RNA from RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) and NucleoSpin RNAPlant (Macherey-Nagel) protocols, but the agarose electrophoresis also indacate contamination and smear of the leaves and roots of oil palm total RNA from CTAB modification 1 and 2 protocols.

Keywords: oil palm, RNA isolation, spectrofotometer, agarose electrophoresis

PENDAHULUAN

Ribonucleic Acid (RNA) merupakan bahan genetik yang berperan dalam ekspresi gen. RNA dalam genetika molekuler berfungsi sebagai perantara antara informasi yang dibawa DNA dan ekspresi fenotipe yang diwujudkan dalam bentuk protein. Farrel (2005) menyebutkan, molekul RNA ada dalam bentuk polimer panjang tidak bercabang dari gugus ribonukleotida monofosfat yang bergabung dengan ikatan fosfodiester. Selain itu, molekul RNA juga bersifat tidak stabil pada suhu tinggi, keadaan basa, serta terdegradasi apabila disimpan dalam waktu lama tanpa penanganan yang tepat.

Ketersediaan RNA dengan kualitas tinggi merupakan syarat penting untuk kloning molekuler dan studi ekspresi gen (Liu *et al*., 2005; Wang *et al*., 2008). Namun, sangat sulit untuk mendapatkan RNA total dengan kualitas tinggi terutama dari jaringan tanaman yang banyak mengandung komponen polisakarida dan polifenol. Sampel yang terkontaminasi oleh polisakarida dan polifenol akan menyebabkan RNA terdegradasi dan menjadi masalah pada saat analisis sekuen RNA. Schneiderbauer *et al*., (1991) dan Graham (1993) menyebutkan bahwa molekul RNA juga dapat terdegradasi secara enzimatik oleh RNase, sehingga menyebabkan kualitas dan kuantitas RNA total menjadi berkurang.

Isolasi RNA merupakan proses penting dengan tahapan yang cukup panjang dan rumit, serta menggunakan bahan kimia berbahaya seperti fenol dan kloroform (Xiao *et al*., 2012). Menurut Suehiro *et al*. (2005), tahapan yang panjang dalam proses isolasi RNA dapat menyebabkan adanya kontaminasi, sehingga hasil RNA total yang diperoleh tidak sesuai. Hal tersebut mendorong banyak peneliti untuk mengembangkan protokol baru untuk isolasi RNA dari beberapa jaringan tanaman yang sulit, seperti memiliki kandungan polisakarida dan polifenol yang tinggi (Gasic *et al*., 2004; Iandolino *et al*., 2004).

Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi beberapa protokol isolasi RNA tanaman kelapa sawit yang efektif dan efisien, serta menghasilkan RNA yang berkualitas tinggi dari segi kualitas maupun kuantitas. Protokol isolasi RNA yang diteliti seperti *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Chang *et al*., 1993) yang dimodifikasi, kit isolasi RNA *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), dan kit isolasi *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) digunakan dalam penelitian ini dengan menggunakan sampel daun dan akar kelapa sawit.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan selama tiga bulan, pada bulan Oktober-Desember

2018 di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI), Jalan Taman Kencana No. 1 Bogor 16128.

Bahan tanaman yang digunakan adalah bibit tanaman kelapa sawit berumur kurang dari tiga bulan dari kebun Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia. Sampel yang digunakan adalah daun dan akar. Bahan kimia yang digunakan antara lain, nitrogen cair, *buffer* ekstraksi CTAB yang terdiri atas CTAB 2%, PVP 2%, Tris HCl 100 mM pH 8, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, ß-*mercaptoethanol* 2%, *Chloroform: Isoamyl alcohol* (24:1), *Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol* (25:24:1), LiCl 10 M, *buffer* SSTE yang terdiri atas NaCl 1 M, SDS 0,5%, Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, *buffer* ekstraksi *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), *buffer* ekstraksi *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) etanol absolut, etanol 70%, RNase-*free water*, agarosa 1%, peq *Green, loading buffer* RNA dan kertas parafilm. Alat yang digunakan antara lain, timbangan analitik, mortar dan pestel, erlenmeyer 100 ml, aluminium *foil*, pipet kaca 5 dan 10 ml, *filler*, tabung 1,5 ml, tabung 2 ml dan 30 ml, *spin* kolom, *flow-through*, autoklaf, oven, *waterbath*, lemari asam, *microwave*, sentrifus, mikrosentrifus, mikropipet, tips, kulkas, *freezer*, spektrofotometer Nanodrop 2000, cetakan dan sisir gel, *tray* elektoforesis gel dan UV *transluminator*.

Penelitian dilakukan dengan melaksanakan teknik isolasi RNA menggunakan tiga protokol dan dua macam sampel. Protokol yang digunakan adalah protokol *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Chang *et al*., 1993) yang dimodifikasi (Martiansyah *et al*., 2018), kit isolasi *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), dan kit isolasi *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel). Sampel yang diisolasi, yaitu sampel daun dan akar kelapa sawit dengan bobot sampel 0,1 gram dan 2,5 gram yang disesuaikan untuk tiap protokol.Variabel yang diamati adalah konsentrasi (ng/µl), kemurnian (A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230}), dan pita RNA pada elektroforesis gel agarosa. Analisis data dilakukan dengan analisis hasil spektrofotometer dan analisis elektroforesis gel agarosa dari RNA total daun dan akar kelapa sawit yang diperoleh. Jumlah RNA total yang di-*running* dihitung dengan rumus $\frac{250\ ng}{konsentrasi\ ng/\mu l}$ Rumus tersebut digunakan karena rata-rata konsentrasi RNA total daun dan akar kelapa sawit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kuantitas dan Kualitas RNA dengan Spektrofotometer

Hasil uji kuantitas dan kualitas RNA total protokol CTAB modifikasi 1 disajikan pada Tabel 1. Isolasi RNA total tanaman

kelapa sawit menggunakan protokol CTAB modifikasi 1 menghasilkan 9 tabung berisi RNA total dari sampel daun kelapa sawit dan 8 tabung berisi RNA total dari sampel akar kelapa sawit. Hasil pengujian RNA total protokol CTAB modifikasi 1 menunjukkan bahwa, konsentrasi RNA total daun kelapa sawit yang didapatkan berkisar 35,2-225,4 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,52-1,80 dan rasio A_{260}/A_{230} berkisar 0,71-1,13. RNA total akar kelapa sawit yang didapatkan memiliki konsentrasi berkisar 71,7-485,9 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,87-1,95 dan rasio A_{260}/A_{230} berkisar 1,32-1,99. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa RNA total daun kelapa sawit dengan kualitas terbaik memiliki konsentrasi sebesar 55,3 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,80 dan rasio A_{260}/A_{230} berkisar 1,13 sedangkan RNA total akar kelapa sawit dengan kualitas terbaik memiliki konsentrasi sebesar 345,1 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,95 dan rasio A_{260}/A_{230} berkisar 1,99.

Isolasi RNA total tanaman kelapa sawit menggunakan protokol CTAB modifikasi 2 menghasilkan 8 tabung berisi RNA total dari sampel daun kelapa sawit dan 7 tabung berisi RNA total dari sampel akar kelapa sawit. Hasil uji kuantitas dan kualitas RNA total protokol CTAB modifikasi 2 disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil uji kuantitas dan kualitas RNA total protokol CTAB modifikasi 1

Sampel	Konsentrasi (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Daun 1	55,30	1,80	1,13
Daun 2	101,80	1,69	0,87
Daun 3	163,20	1,58	0,85
Daun 4	71,20	1,52	0,81
Daun 5	71,30	1,66	0,82
Daun 6	166,70	1,63	0,69
Daun 7	225,40	1,70	0,89
Daun 8	202,60	1,67	0,81
Daun 9	35,20	1,64	0,71
Akar 1	140,70	1,91	1,75
Akar 2	112,40	1,92	1,79
Akar 3	71,70	1,92	1,65
Akar 4	345,10	1,95	1,99
Akar 5	485,90	1,87	2,02
Akar 6	83,60	1,93	1,32
Akar 7	217,10	1,94	1,87
Akar 8	344,40	1,91	1,99

Tabel 2. Hasil uji kuantitas dan kualitas RNA total protokol CTAB modifikasi 2

Sampel	Konsentrasi (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Daun 1	127,70	1,86	1,68
Daun 2	323,60	1,94	2,04
Daun 3	43,20	1,82	1,56
Daun 4	112,00	1,88	1,98
Daun 5	30,90	1,79	1,62
Daun 6	34,60	1,74	1,26
Daun 7	23,80	1,67	1,08
Daun 8	50,00	1,87	1,75
Akar 1	121,10	1,83	1,85
Akar 2	2650,10	1,90	2,13
Akar 3	26,00	2,02	1,51
Akar 4	76,50	1,80	1,54
Akar 5	177,20	1,82	1,83
Akar 6	204,10	1,86	1,64
Akar 7	185,70	1,81	1,93

Hasil pengujian RNA total protokol CTAB modifikasi 2 menunjukkan bahwa, konsentrasi RNA total daun kelapa sawit yang didapatkan berkisar 23,8-323,6 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,67-1,94 dan rasio A_{260}/A_{230} berkisar 1,08-2,04. RNA total akar kelapa sawit yang didapatkan memiliki konsentrasi berkisar 26-2650,1 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,80-2,02 dan rasio A_{260}/A_{230} berkisar 1,26-2,13. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa RNA total daun kelapa sawit dengan kualitas terbaik memiliki konsentrasi sebesar 323,6 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,94 dan rasio A_{260}/A_{230} berkisar 2,04 sedangkan RNA total akar kelapa sawit dengan kualitas terbaik memiliki konsentrasi sebesar 2650,1 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,90 dan rasio A_{260}/A_{230} berkisar 2,13.

Nilai rasio A_{260}/A_{280} RNA total daun dan akar kelapa sawit hasil isolasi protokol CTAB modifikasi 1 dan 2 yang kurang dari 1,80 menunjukkan adanya kontaminasi protein. Gallagher (1989) menyatakan bahwa, nilai rasio A_{260}/A_{280} yang kurang dari 1,80 untuk RNA mengindikasikan adanya kontaminan protein dan fenol yang diserap kuat pada panjang gelombang 280 nm, serta DNA yang diserap kuat pada panjang gelombang 260 nm. Nilai rasio A_{260}/A_{230} RNA total daun dan akar kelapa sawit hasil isolasi protokol CTAB modifikasi 1 dan 2 yang kurang dari 1,80 menunjukkan adanya kontaminasi polisakarida dan residu organik lain. Menurut Rapley dan Heptinstall (1998) polisakarida terserap kuat pada panjang

gelombang 230 nm, sedangkan menurut Teare *et al*. (1997) absorbansi tinggi pada panjang gelombang 230 nm mengindikasikan adanya garam *buffer*, pelarut dan kontaminan lain.

Rendahnya kemurnian RNA total hasil isolasi tersebut dikarenakan protokol CTAB modifikasi 1 dan 2 merupakan protokol isolasi RNA manual. Menurut Sambrook *et al*. (1989), protokol manual tidak cukup sensitif dan tidak spesifik untuk untai tunggal RNA, serta rentan terpengaruh oleh adanya kontaminan pada sampel.

Hasil uji kuantitas dan kualitas RNA total dari sampel daun dan akar kelapa sawit protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) disajikan pada Tabel 3. Hasil pengujian RNA total protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) menunjukkan bahwa, konsentrasi RNA total daun kelapa sawit yang didapatkan sebesar 85,4 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} sebesar 2,11 dan rasio A_{260}/A_{230} sebesar 1,69. RNA total akar kelapa sawit yang didapatkan memiliki konsentrasi sebesar 67,8 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} sebesar 2,19 dan rasio A_{260}/A_{230} sebesar 1,34.

Nilai rasio A_{260}/A_{280} RNA total daun dan akar kelapa sawit hasil isolasi protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) yang lebih dari 2,0 menunjukkan RNA total yang murni, sedangkan nilai rasio A_{260}/A_{230} RNA total daun dan akar kelapa sawit yang kurang dari 1,80 menunjukkan adanya kontaminasi polisakarida. Nilai rasio A_{260}/A_{280} RNA total daun dan akar kelapa sawit yang lebih dari 2,0 menunjukkan bahwa RNA total tersebut murni dan tidak terkontaminasi oleh protein, fenol, maupun DNA genom. Hal tersebut dikarenakan protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) menggunakan *buffer* RLT yang mengandung guanidin thiosianat. Farrel (2005) menyebutkan bahwa, guanidin thiosianat mampu mendenaturasi protein dan merubah struktur tersier molekul RNase sehingga menghambat daya rusak protein terhadap RNA. Selain itu menurut Qiagen (2006), guanidin thiosianat yang terkandung dalam *buffer* RLT berfungsi untuk menonaktifkan enzim RNase sehingga menghasilkan isolat RNA utuh (tidak terdegradasi) dan mampu menghancurkan serta melarutkan sel dengan cepat sehingga membuat RNA larut.

Hasil uji kuantitas dan kualitas RNA total dari sampel daun dan akar kelapa sawit protokol *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) disajikan pada Tabel 4.

Tabel 3. Hasil uji kuantitas dan kualitas RNA total protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen)

Sampel	Konsentrasi (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Daun	85,40	2,11	1,69
Akar	67,80	2,19	1,34

Tabel 4. Hasil uji kuantitas dan kualitas RNA total protokol *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel)

Sampel	Konsentrasi (ng/µl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Daun	338,00	2,13	2,09
Akar	184,40	2,18	2,20

Hasil pengujian RNA total protokol *NucleoSpin RNAPlant*(Macherey-Nagel) menunjukkan bahwa, konsentrasi RNA total daun kelapa sawit yang didapatkan sebesar 338 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} sebesar 2,13 dan rasio A_{260}/A_{230} sebesar 2,09. RNA total akar kelapa sawit yang didapatkan memiliki konsentrasi sebesar 184,4 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} sebesar 2,18 dan rasio A_{260}/A_{230} sebesar 2,20.

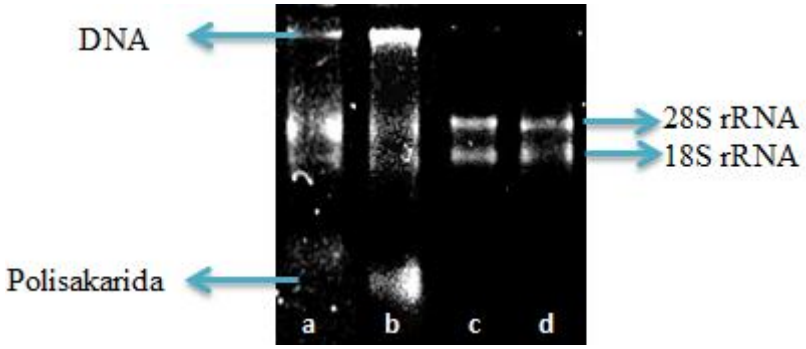
Nilai rasio A_{260}/A_{280} RNA total daun dan akar kelapa sawit yang lebih dari 2,0 menunjukkan bahwa RNA total tersebut murni dan tidak terkontaminasi oleh protein, fenol, maupun DNA genom sedangkan nilai rasio A_{260}/A_{230} RNA total daun dan akar kelapa sawit yang lebih dari 2,0 menunjukkan bahwa RNA total tersebut murni dan tidak terkontaminasi oleh polisakarida. RNA total tersebut didapatkan menggunakan *buffer* RAP yang mengandung guanidin hidroklodia dari *NucleoSpin RNAPlant (Macherey-Nagel)*. Qiagen (2006) menjelaskan, guanidin hidroklorida memiliki kemampuan denaturasi dan homogenisasi sel yang lebih rendah dibandingkan dengan guanidin thiosianat. Namun, hasil yang didapat dari penelitian ini menunjukkan bahwa guanidin hidroklorida yang terkandung dalam *buffer* RAP menghasilkan RNA total berkualitas tinggi. Hal tersebut dikarenakan menurut Macherey-Nagel (2006), *NucleoSpin RNAPlant* kit didesain khusus untuk mendapatkan RNA berkualitas tinggi dan efektif untuk menghilangkan kontaminasi DNA selama proses purifikasi pada sampel tanaman dan jamur. *NucleoSpin RNAPlant* kit memiliki *spin column* yang mengandung DNase sehingga sangat sensitif untuk mendeteksi dan mereduksi adanya kontaminan DNA

Berdasarkan hasil uji kuantitas RNA total dari keempat metode tersebut diketahui bahwa, RNA total hasil isolasi protokol *NucleoSpin RNAPlant* kit memberikan hasil RNA total dengan kuantitas tinggi serta nilai rasio A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230} yang paling baik dibandingkan dengan RNA total hasil isolasi protokol *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Chang *et al*., 1993) modifikasi 1 dan 2 maupun kit isolasi *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen).

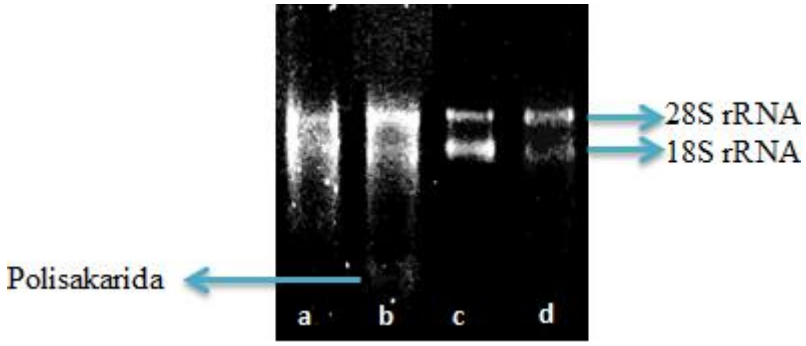
Uji Kuantitas dan Kualitas RNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Protokol isolasi RNA yang berhasil dapat dinilai berdasarkan kualitas RNA yang diketahui melalui elektroforesis gel

agarosa. Hasil elektroforesis RNA total melalui elektroforesis gel agarosa menunjukkan dua buah pita (Gambar 1 dan Gambar 2). Rapley dan Heptinstall (1998) menjelaskan dua pita tersebut merupakan RNA ribosomal (rRNA), yaitu 18S rRNA dan 28S rRNA yang merupakan komponen terbanyak dalam RNA total.



Gambar 1. Hasil elektroforeis RNA total daun kelapa sawit (a) protokol CTAB modifikasi 1; (b) protokol CTAB modifikasi 2; (c) protokol *RNeasy Plant Mini Kit*; (d) protokol *NucleoSpin RNAPlant.*



Gambar 2. Hasil elektroforeis RNA total akar kelapa sawit (a) protokol CTAB modifikasi 1; (b) protokol CTAB modifikasi 2; (c) protokol *RNeasy Plant Mini Kit*; (d) protokol *NucleoSpin RNAPlant.*

Kosentrasi RNA total akar kelapa sawit (Gambar 2) lajur a adalah 485,9 ng/µl, lajur b adalah 177,2 ng/µl, lajur c adalah 67,8 ng/µl dan lajur d adalah 184,4 ng/µl. RNA total akar kelapa sawit yang di-*running* pada lajur a sebanyak 1 µl, lajur b sebanyak 1,4 µl, lajur c sebanyak 3,6 µl dan lajur d sebanyak 1,3 µl.

Hasil uji kualitas RNA dengan elektroforesis gel agarosa menunjukkan adanya perbedaan intensitas fluoresensi pita RNA total yang diperoleh dari tiap protokol isolasi yang digunakan. Menurut Amanda dan Imam (2015), perbedaan intensitas fluoresensi pita RNA total pada gel elektroforesis disebabkan oleh adanya perbedaan jumlah RNA total yang dimasukkan ke dalam gel. Selain itu, hasil elektroforesis juga menunjukkan fluoresensi pita yang tidak terlalu jelas. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh terlalu sedikitnya volume RNA total yang di-*running*, karena jumlah RNA total yang dapat dimasukkan ke dalam gel menurut

Farrell (2005) sebanyak 15.000-20.000 ng. Namun, pada penelitian Amanda dan Imam (2015) jumlah RNA total sebanyak 620-2.620 ng yang diperoleh telah dapat memberikan visualisasi hasil yang jelas.

Hasil elektroforesis gel agarosa 1% menunjukkan bahwa, RNA total daun kelapa sawit masih terdapat kontaminasi protein atau DNA dan polisakarida pada lajur a dan b yang merupakan RNA total hasil isolasi protokol CTAB modifikasi 1 dan 2, namun tidak dijumpai kontaminasi protein/DNA dan polisakarida pada lajur c dan d yang merupakan RNA total hasil isolasi protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) dan protokol *NucleoSpin RNAPlant*(Macherey-Nagel) (Gambar 1). Hasil elektroforesis RNA total akar kelapa sawit menunjukkan bahwa, masih terdapat kontaminasi polisakarida pada lajur b yang merupakan RNA total hasil isolasi protokol CTAB modifikasi 2, namun tidak dijumpai kontaminasi protein/DNA dan polisakarida pada lajur a, c dan d yang merupakan RNA total hasil isolasi protokol CTAB modifikasi 1, *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) dan protokol *NucleoSpin RNAPlant*(Macherey-Nagel) (Gambar 2).

Kontaminasi yang terjadi pada RNA total daun dan akar kelapa sawit hasil isolasi protokol CTAB modifikasi 1 dan 2 dikarenakan menurut Sambrook *et al*. (1989) protokol CTAB merupakan protokol isolasi RNA manual yang tidak cukup sensitif dan tidak spesifik untuk untai tunggal RNA, sehingga memungkinkan terdapatnya kontaminan pada sampel selama proses isolasi. RNA total tanpa kontaminasi pada hasil elektroforesis protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) dan protokol *NucleoSpin RNAPlant*(Macherey-Nagel) dikarenakan oleh penggunaan *buffer* guanidin thiosianat dan *buffer* guanidin hidroklorida yang mampu mendenaturasi protein sehingga mencegah adanya kontaminan.

Hasil elektroforesis RNA total daun dan akar kelapa sawit yang diperoleh dari protokol CTAB modifikasi 1 dan 2 menunjukkan adanya *smear*. Menurut Xiao *et al*. (2012) protokol CTAB merupakan protokol isolasi RNA yang prosesnya membutuhkan waktu lama sehingga RNA dapat mengalami degradasi selama proses isolasi. Xiao *et al*. (2012) dan Tattersall *et al*. (2005) juga menyebutkan bahwa, protokol isolasi RNA seperti CTAB, kit Tiangen RNAplant dan kit Invitrogen TRIZOL tidak cocok digunakan untuk mengisolasi RNA dari jaringan tanaman berfamili *Palmaceae* karena tingginya kandungan polisakarida dan polifenolik pada bagian membran sel, sehingga menyebabkan terjadinya degradasi RNA dan kontaminasi DNA.

Smear tipis RNA total akar hasil isolasi protokol CTAB modifikasi 1 dan 2 juga menunjukkan adanya komponen RNA yang lain seperti, mRNA dan tRNA. Farrell

(2005) menjelaskan, komponen mRNA dan tRNA ada dalam jumlah yang sangat sedikit sehingga terlihat sebagai *smear* tipis di bawah pita 18S rRNA sampai mendekati bagian akhir gel. Menurut Bryant & Manning (1998), *smear* yang terjadi sepanjang jalur migrasi RNA tersebut juga menunjukkan degradasi akibat kontaminasi RNase selama proses isolasi.

Berdasarkan hasil elektroforesis tersebut diketahui bahwa, pita RNA total hasil isolasi protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) dan *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) memiliki integritas yang baik. Integritas dari pita RNA tersebut menunjukkan keutuhan RNA total yang tidak terdegradasi dan terkontaminasi protein dan polisakarida. Oleh karena itu, RNA total daun dan akar kelapa sawit yang didapat dari protokol *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) dan *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) memiliki kualitas yang paling baik dibandingkan dengan RNA total hasil isolasi protokol *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Chang *et al*., 1993) modifikasi 1 dan 2.

KESIMPULAN

RNA total hasil isolasi protokol *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) memiliki kuantitas dan kualitas yang paling tinggi dibandingkan RNA total hasil isolasi protokol CTAB modifikasi 1 dan 2 serta *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). Konsentrasi RNA total daun dan akar kelapa sawit yang didapatkan melalui protokol *NucleoSpin RNAPlant* (Macherey-Nagel) sebesar 338 ng/µl dan 184,4 ng/µl dengan rasio A_{260}/A_{280} RNA total daun dan akar kelapa sawit sebesar 2,13 dan 2,18 serta rasio A_{260}/A_{230} sebesar 2,09 dan 2,20.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih saya ucapkan kepada Dr. Ir. Anisur Rosyad, M. S., Dr. Ir. Priyono, DIRS dan Dr. Asmini Budiani, M. Si atas ijin penelitian, sehingga artikel penelitian ini bisa terwujud untuk dipublikasikan.

DAFTAR PUSTAKA

Amanda, U. D., dan Imam, C. C. 2015. Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineenssis* Jacq. var. Tenera). *Prosiding Seminar Nasional MASY BIODIV Indonesia*, 1(2): 171 – 176.

Bryant, S., and Manning, D. L. 1998. Isolation of messenger RNA. *Methods Mol Biol*., 86: 61 – 64.

Chang, Puryear, and Cairney. 1993. A simple and efficeint method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molekular Biology Reporter,* 11(2): 113 – 116.

Farrell, R. E. 2005. *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 3rd ed. Elsevier Academic Press. Burlington.

Gallagher, S.R. 1989. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and K. Struhl. *Current*

Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. New York.

Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S. S. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Rep*., 22: 437.

Graham, G. C. 1993. A method for extraction of total RNA from *Pinus radiata* and other conifers. *Plant Mol. Biol. Rep*., 11: 32 – 37.

Iandolino, A. B., DaSilva, F. G., Lim, H., Choi, H., Williams, L. E., Cook, D. R. 2004. High quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol. Rep*., 22: 269 – 278.

Liu, W., Wang, B., Duan, C., Li, B. 2005. A method for isolating functional RNA callus of *Dendrobium candidum* contented rich polysaccharides. *Colloid. Surface B.*, 4: 259 – 262.

Macherey-Nagel. 2006. *Total RNA Purification from Plant*. Macherey-Nagel. Germany.

Martiansyah, I., Amanah, DM., and Putranto, R.A. 2018. Semi-quantitative RT-PCR analysis of transcripts encoding protease inhibitor in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg latex. Proceeding of International Biotechnology Conference on Estate Crops 18–20 October 2017, Jakarta, Indonesia. [*IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 183*]. IOPScience Publishing.

Qiagen. 2006. *RNeasy® mini handbook*. 4th ed. Qiagen. Texas.

Rapley, R., dan Heptinstall, J. 1998. UV spectrophotometric analysis of ribonucleic acids. In: Rapley, R., Manning, D. L. (Eds.). 1998. Methods in molecular biology. Vol. 86. *RNA: Isolation and Characterization Protocols*. Humana Press Inc. Totowa.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Schneiderbauer, A., Sandermann, J. H., Ernst, D. 1991. Isolation of function RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Anal. Biochem*., 197: 91 – 95.

Suehiro, N., Matsuda, K., Okuda, S and Natsuaki, T. 2005. A simplifed method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, 125(1): 67 – 73.

Tattersal, E.A.R., Ergul, A., Alkayal, F., Deluc, L., Cushman, J.C. and Cramer, G.R. 2005. Comparison of methods for isolating high quality RNA from leaves of Grapevine. *Amj Enol Viticult.*, 56: 400 – 406.

Teare, J.M., Islam, R., Flanagan, R., Gallagher, S., Davies, M. G., and C. Grabau. 1997. Measurement of Nucleic Acid Concentration Using the DyNa QuantTM and the GenequantTM. *BioTechniques*, 22(6): 1170 – 1171.

Wang, X. C., Tain, W. M., Li, Y. X. 2008. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Mol. Biotechnol*., 38: 57 – 64.

Xiao, Y., Yaodong, Y., Hongxing, C., Haikuo, F., Zilong, M., Xintao, L., Annaliese, S. M., Zhihui, X., Xi, H. 2012. Efficient isolation of high quality RNA from tropical palms for RNA-seq analysis. *Plant Omics Journal*, 5(6): 584 – 589.