

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

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

Dini Astika Sari^{1*}, Irfan Martiansyah¹, Restu Prasetya Mukmin², Spto Nugroho Hadi², Indra Syahputra⁴, Dadang Afandi⁴, dan Riza-Arief Putranto^{1,3,*}

¹) Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI).

Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor 16128;

²) Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto.

Jl. DR. Soeparno, Purwokerto Utara 53122;

³) PT Riset Perkebunan Nusantara, Jl. Salak No 1A, Bogor 16128

⁴) PT Socfin Indonesia, Jl. KL Yos Sudarso No. 106, medan 20115, Sumatera Utara.

Alamat Korespondensi: *dini.astika@gmail.com; rizaputranto@iribb.org

ABSTRAK

Tanaman kelapa sawit memiliki kandungan polisakarida dan polifenol yang tinggi sehingga menyebabkan hasil isolasi RNA memiliki kualitas dan kuantitas yang rendah. Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi beberapa protokol isolasi RNA tanaman kelapa sawit untuk meningkatkan efektivitas, efisiensi, serta kualitas dan kuantitas. Penelitian dilakukan dengan melaksanakan teknik isolasi RNA berbasis manual dan *kit* komersial, yang terbagi atas tiga protokol uji, yaitu: 1) protokol manual modifikasi *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), 2) protokol *kit* isolasi RNA #1 berbasis *buffer* RLT yang mengandung guanidin thiosianat, dan 3) protokol *kit* isolasi RNA #2 berbasis *buffer* RAP yang mengandung guanidin hidroklorida. Sampel yang digunakan adalah daun dan akar dari bibit kelapa sawit yang ditanam dalam pembibitan terkendali, serta berumur kurang dari tiga bulan dengan bobot 0,1 gram dan 2,5 gram yang disesuaikan untuk tiap protokol. Variabel yang diamati adalah parameter kuantitatif, yakni: konsentrasi (ng/μl), kemurnian (rasio A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230}), serta parameter kualitatif, yakni: pita RNA pada elektroforesis gel agarosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara kuantitatif, RNA total hasil isolasi protokol *kit* isolasi RNA #2 memiliki hasil paling tinggi. Konsentrasi RNA total daun dan akar kelapa sawit yang didapatkan melalui protokol *kit* isolasi RNA #2 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 analisis kualitatif RNA berbasis elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa protokol *kit* baik *kit* #1 dan #2 memiliki profil integritas yang lebih baik dibandingkan protokol manual.

Kata kunci: kelapa sawit, optimasi, isolasi RNA, *kit*, manual

ABSTRACT

Oil palm contains high levels of polysaccharides and polyphenols causing the low quality and quantity of extracted RNA. The aim of this study was to optimize RNA isolation protocols from oil palm tissues referred to RNA quantitative and qualitative analyses. The research was carried out by performing both of manual and commercial kit techniques, and consisted of three main protocols, e.g: 1) modified-manual protocols of Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB), 2) commercial RNA kit protocol #1 with RLT buffer contains guanidine thiocyanate, and 3) commercial RNA kit protocol #2 with RAP buffer contains guanidine hydrochloride. The leaves and roots of 3-months-old seedlings in controlled nursery were used and weighted in a range of 0,1 gram and 2,5 gram which was adjusted for each protocol. The analysis was carried out by performing quantitative and qualitative analyses. Quantitative parameters, e.g: RNA concentration (ng/μl), RNA purity (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratio) and quality parameter of RNA by the electrophoresis gel agarose were observed. The result showed that total RNA yield from the commercial RNA kit protocol #2 performed the highest quality. Total RNA concentration of leaves and roots obtained from commercial RNA kit protocol #2 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 respectively. The result of agarose electrophoresis gel indicated both of the commercial RNA kit protocols performed higher integrity profile compared to manual protocol.

Keywords: oil palm, optimization, RNA isolation, kit, manual.

PENDAHULUAN

Ketersediaan RNA dengan kualitas tinggi merupakan syarat penting dalam beberapa analisis transkriptomika, seperti studi perbandingan ekspresi gen [*DGE (Differential Gene Expression)*] ataupun sekuensing RNA [*RNA-sequencing*] (Liu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Namun demikian, sangat sulit untuk mendapatkan RNA total dengan kualitas dan kuantitas tinggi terutama dari jaringan tanaman yang banyak mengandung komponen polisakarida dan polifenol. Sampel yang terkontaminasi oleh polisakarida dan polifenol akan menyebabkan RNA terdegradasi dan menurunkan kualitas serta kuantitas RNA. Isolasi RNA merupakan proses penting dengan tahapan yang cukup panjang dan rumit, serta menggunakan bahan kimia spesifik seperti fenol dan kloroform (Xiao *et al.*, 2012). Menurut Suehiro *et al.* (2005), tahapan yang panjang dalam proses isolasi RNA juga sekaligus menyebabkan kemungkinan terjadinya tingkat kontaminasi yang tinggi, 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).

Hingga saat ini, beberapa penelitian transkriptomika pada tanaman kelapa sawit masih mengalami kendala dalam proses isolasi RNA. Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi beberapa protokol isolasi RNA terkhusus untuk bibit tanaman kelapa sawit yang efektif dan efisien, serta menghasilkan RNA yang berkualitas tinggi dari segi kualitas maupun kuantitas. Protokol isolasi RNA yang diteliti berbasis manual dan *kit* komersial. Hal ini dikarenakan metode manual memiliki proses yang lebih panjang namun menunjukkan hasil yang lebih baik, sedangkan metode *kit* memiliki protokol yang lebih sederhana dan cepat, namun pada beberapa sampel menunjukkan hasil dengan kuantitas yang lebih rendah. Pada penelitian ini, dilakukan uji perbandingan dan optimasi antara protokol isolasi RNA manual yakni protokol *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Chang *et al.*, 1993) yang dimodifikasi, dengan protokol isolasi RNA berbasis *kit* #1 dan *kit* #2 terhadap sampel daun dan akar bibit kelapa sawit. Hasil optimasi isolasi RNA terbaik yang didapatkan dalam penelitian ini diharapkan mampu menjadi acuan pelaksanaan isolasi RNA pada tanaman kelapa sawit.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan bahan yaitu *buffer* ekstraksi

CTAB yang dimodifikasi dan terdiri atas CTAB 2%, PVP 2%, Tris HCl 100 mM pH 8, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, β -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, serta *kit* isolasi RNA komersial #1 dan #2. Alat yang digunakan antara lain *tube* (*Thermo Scientific*), *waterbath* (Mettler), spektrofotometer Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*), dan UV *transilluminator*.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI) Bogor, Jawa Barat. Penelitian dilaksanakan selama tiga (3) bulan dimulai dari bulan Oktober sampai dengan Desember 2018.

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah organ akar dan daun bibit tanaman kelapa sawit berumur kurang dari tiga bulan dari pembibitan terkontrol milik PT Socfindo, Tanah Gembus, Medan.

Penelitian dilakukan dengan melaksanakan teknik isolasi RNA berbasis manual dan *kit* komersial, menggunakan tiga protokol uji yakni: 1) manual CTAB modifikasi mengacu pada penelitian terdahulu oleh Martiansyah *et al.*, 2018, 2)

kit isolasi RNA #1 berbasis *buffer* RLT yang mengandung guanidin thiosianat, dan 3) protokol *kit* isolasi RNA #2 berbasis *buffer* RAP yang mengandung guanidin hidroklorida. Bahan berupa organ akar dan daun yang akan diisolasi memiliki bobot sampel 2,5 gram untuk teknik isolasi manual dan 0,1 gram untuk teknik isolasi *kit* komersial #1 dan #2. Variabel yang diamati adalah parameter kuantitatif, yakni: konsentrasi (ng/ μ l), kemurnian (A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230}) serta parameter kualitatif berdasarkan pita RNA pada elektroforesis gel agarosa. Kuantitas RNA total diperiksa menggunakan mesin spektrofotometer Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*). Kualitas RNA total ditentukan menggunakan prosedur elektroforesis gel agarosa 1,2% berdasarkan profil pita ganda 18S rRNA dan 28 S rRNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kuantitatif RNA dengan Spektrofotometer

Hasil uji kuantitatif RNA total dengan menggunakan protokol manual CTAB modifikasi disajikan pada Tabel 1. Isolasi RNA total tanaman kelapa sawit menggunakan protokol manual CTAB modifikasi menghasilkan 17 tabung berisi RNA total dari sampel daun kelapa sawit dan 15 tabung berisi RNA total dari sampel akar kelapa sawit.

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

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	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
Daun 10	127,70	1,86	1,68
Daun 11	323,60	1,94	2,04
Daun 12	43,20	1,82	1,56
Daun 13	112,00	1,88	1,98
Daun 14	30,90	1,79	1,62
Daun 15	34,60	1,74	1,26
Daun 16	23,80	1,67	1,08
Daun 17	50,00	1,87	1,75
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
Akar 9	121,10	1,83	1,85
Akar 10	2650,10	1,90	2,13
Akar 11	26,00	2,02	1,51
Akar 12	76,50	1,80	1,54
Akar 13	177,20	1,82	1,83
Akar 14	204,10	1,86	1,64
Akar 15	185,70	1,81	1,93

Isolasi RNA total tanaman kelapa sawit menggunakan protokol manual CTAB modifikasi menghasilkan 17 tabung berisi RNA total dari sampel daun kelapa sawit dan 15 tabung berisi RNA total dari sampel akar kelapa sawit. Hasil pengujian RNA total protokol manual CTAB modifikasi menunjukkan bahwa konsentrasi RNA total daun kelapa sawit yang didapatkan menunjukkan hasil

bervariasi dan berkisar pada konsentrasi 23,8-323,6 ng/ μ l dengan rentang rasio A₂₆₀/A₂₈₀ 1,52-1,94 dan rentang rasio A₂₆₀/A₂₃₀ 0,71-2,04. Konsentrasi RNA total akar kelapa sawit yang didapatkan menunjukkan hasil bervariasi dan berkisar pada konsentrasi 26,0-485,9 ng/ μ l dengan rentang rasio A₂₆₀/A₂₈₀ 1,80-2,02 dan rentang rasio A₂₆₀/A₂₃₀ 1,26-2,13. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa

RNA total daun kelapa sawit dengan profil kuantitas terbaik adalah sampel daun 11 yakni menunjukkan konsentrasi sebesar 323,6 ng/ μ l; rasio A_{260}/A_{280} 1,94; dan rasio A_{260}/A_{230} 2,04. RNA total akar kelapa sawit dengan profil kuantitas terbaik adalah sampel akar 10 yakni menunjukkan konsentrasi sebesar 2650,1 ng/ μ l; rasio A_{260}/A_{280} 1,90; dan rasio A_{260}/A_{230} 2,13.

Nilai rasio A_{260}/A_{280} RNA total daun dan akar kelapa sawit hasil isolasi protokol manual CTAB modifikasi 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 manual CTAB modifikasi 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. 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 kuantitatif RNA total dari sampel daun dan akar kelapa sawit dengan protokol *kit* komersial #1 disajikan pada Tabel 2.

Profil parameter kuantitatif RNA hasil isolasi menggunakan protokol *kit* komersial #1 menunjukkan konsentrasi RNA total daun kelapa sawit sebesar 85,4 ng/ μ l; rasio A_{260}/A_{280} sebesar 2,11; dan rasio A_{260}/A_{230} sebesar 1,69, sedangkan RNA total akar kelapa sawit yang didapatkan menunjukkan konsentrasi sebesar 67,8 ng/ μ l; 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 *kit* komersial #1 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 *kit* komersial #1 menggunakan *buffer* RLT yang mengandung guanidin thiosianat. Farrel (2005) menyebutkan bahwa, guanidin thiosianat mampu mendenaturasi

Tabel 2. Hasil uji kuantitatif RNA total dengan protokol *kit* komersial #1

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Daun	85,40	2,11	1,69
Akar	67,80	2,19	1,34

Tabel 3. Hasil uji kuantitatif RNA total protokol *kit* komersial #2

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Daun	338,00	2,13	2,09
Akar	184,40	2,18	2,20

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 memiliki nilai kelarutan yang lebih tinggi.

Hasil uji kuantitatif RNA total dari sampel daun dan akar kelapa sawit protokol *kit* komersial #2 disajikan pada Tabel 3. Profil parameter kuantitatif RNA hasil isolasi menggunakan protokol *kit* komersial #2 menunjukkan konsentrasi RNA total daun kelapa sawit sebesar 338 ng/ μ l; rasio A₂₆₀/A₂₈₀ sebesar 2,13; dan rasio A₂₆₀/A₂₃₀ sebesar 2,09, sedangkan RNA total akar kelapa sawit yang didapatkan menunjukkan konsentrasi sebesar 184,4 ng/ μ l; rasio A₂₆₀/A₂₈₀ sebesar 2,18; dan rasio A₂₆₀/A₂₃₀ sebesar 2,20.

Nilai rasio A₂₆₀/A₂₈₀ 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 A₂₆₀/A₂₃₀ 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 diekstraksi menggunakan *buffer* RAP yang mengandung guanidin hidroklorida yang disediakan oleh *kit* komersial #2. 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), *kit* komersial #2 didesain khusus untuk mendapatkan RNA berkualitas tinggi dan efektif untuk menghilangkan kontaminasi DNA selama proses purifikasi pada sampel tanaman dan jamur. *Kit* komersial #2 dilengkapi dengan *spin column* yang mengandung DNase sehingga sangat sensitif untuk mendeteksi

dan mereduksi adanya kontaminan DNA pada RNA.

Berdasarkan hasil uji kuantitas RNA total dari tiga protokol yang diuji mengindikasikan bahwa, RNA total hasil isolasi protokol *kit* komersial #2 memberikan hasil RNA total dengan profil parameter kuantitas terbaik dibandingkan dengan RNA total hasil isolasi protokol manual *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Chang *et al.*, 1993) modifikasi maupun *kit* komersial #1.

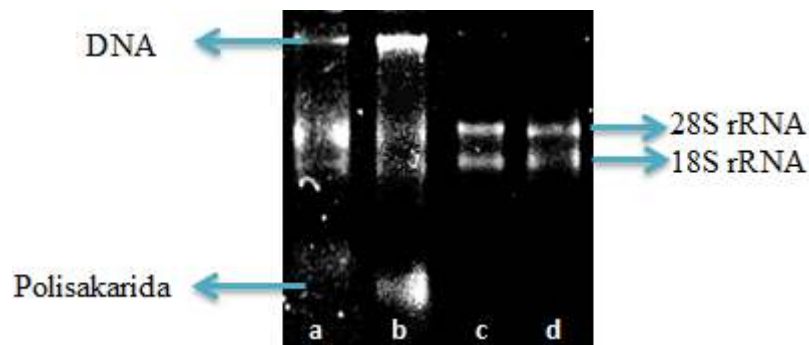
Uji Kualitatif RNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Pengujian parameter kualitatif RNA dapat dilakukan dengan metode elektroforesis gel agarosa. Hasil elektroforesis RNA total yang menunjukkan standar kualitas baik menunjukkan dua buah pita (Gambar 1 dan Gambar 2). Rapley dan Heptinstall (1998) menjelaskan dua pita tersebut merupakan

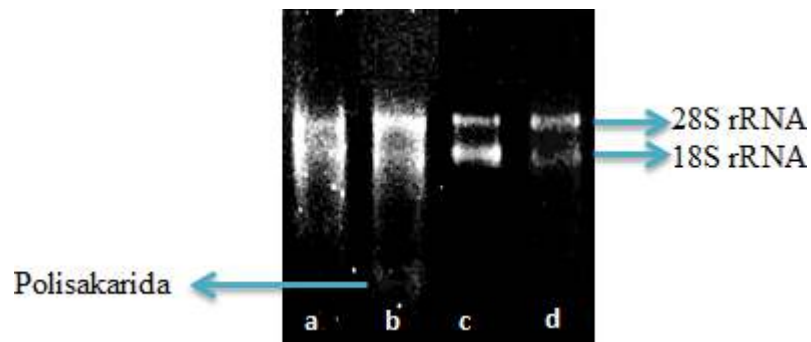
RNA ribosomal (rRNA), yaitu 18S rRNA dan 28S rRNA yang merupakan komponen terbanyak dalam RNA total.

Mengacu kepada profil konsentrasi RNA total daun kelapa sawit pada Tabel 2, konsentrasi RNA total sumuran a adalah 225,4 ng/ μ l, sumuran b adalah 43,2 ng/ μ l, sumuran c adalah 85,4 ng/ μ l dan sumuran d adalah 338 ng/ μ l. RNA total daun kelapa sawit yang di-*running* pada masing-masing sumuran dari a-d secara berurutan adalah sebanyak 1,1 μ l; 5,7 μ l; 2,9 μ l dan 1 μ l.

Mengacu kepada profil konsentrasi RNA total daun kelapa sawit pada Tabel 2, konsentrasi RNA total pada lajur a adalah 485,9 ng/ μ l, lajur b adalah 177,2 ng/ μ l, lajur c adalah 67,8 ng/ μ l dan lajur d adalah 184,4 ng/ μ l. RNA total akar kelapa sawit yang di-*running* pada masing-masing sumuran dari a-d secara berurutan adalah sebanyak 1 μ l; 1,4 μ l; 3,6 μ l dan 1,3 μ l.



Gambar 1. Hasil elektroforesis RNA total daun kelapa sawit: (a) protokol CTAB modifikasi-1; (b) protokol CTAB modifikasi-2; (c) protokol *kit* komersial #1; (d) protokol *kit* komersial #2.



Gambar 2. Hasil elektroforesis RNA total akar kelapa sawit: (a) protokol CTAB modifikasi-1; (b) protokol CTAB modifikasi-2; (c) protokol *kit* komersial #1; (d) protokol *kit* komersial #2.

Jumlah RNA total yang di-*running* dihitung dengan rumus $\frac{250 \text{ ng}}{\text{konsentrasi ng}/\mu\text{l}}$ sehingga akan berbeda-beda berdasarkan konsentrasi masing-masing RNA total. Rumus tersebut digunakan karena rata-rata konsentrasi RNA total daun dan akar kelapa sawit yang didapat pada penelitian ini kurang dari 250 ng/ μl .

Hasil uji kualitas RNA menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,2% menunjukkan bahwa pada visualisasi elektroforegram RNA total daun kelapa sawit masih terdapat kontaminasi protein atau DNA dan polisakarida pada sumuran a dan b yang merupakan RNA total hasil isolasi protokol manual CTAB modifikasi, namun tidak dijumpai kontaminasi protein/DNA dan polisakarida pada sumuran c dan d yang merupakan RNA total hasil isolasi protokol *kit* komersial #1 dan protokol *kit* komersial #2 (Gambar 1). Elektroforegram RNA total akar kelapa sawit menunjukkan bahwa masih terdapat kontaminasi polisakarida pada sumuran b

yang merupakan RNA total hasil isolasi protokol manual CTAB modifikasi-2 (ulangan 2), namun tidak dijumpai kontaminasi protein/DNA dan polisakarida pada sumuran a, c dan d yang merupakan RNA total hasil isolasi protokol manual CTAB modifikasi-1 (ulangan 1), *kit* komersial #1 dan protokol *kit* komersial #2 (Gambar 2).

Kontaminasi yang terjadi pada RNA total daun dan akar kelapa sawit hasil isolasi protokol manual CTAB modifikasi dikarenakan protokol manual memiliki kelemahan yakni tidak cukup sensitif dan tidak spesifik untuk untai tunggal RNA (Sambrook *et al.*, 1989), sehingga memungkinkan terdapatnya kontaminan pada sampel selama proses isolasi. Penggunaan *buffer* guanidin thiosianat dan *buffer* guanidin hidroklorida dengan kemampuan denaturasi protein tinggi pada *kit* komersial #1 dan protokol *kit* komersial #2 menghasilkan profil elektroforegram

yang mengindikasikan tidak adanya kontaminasi protein.

Elektroforegram RNA total daun dan akar kelapa sawit dari protokol manual CTAB modifikasi menunjukkan adanya *smear*. Menurut Xiao *et al.* (2012), protokol manual CTAB merupakan protokol isolasi RNA yang membutuhkan durasi dan tahapan panjang sehingga meningkatkan resiko terjadinya degradasi RNA selama proses isolasi. Xiao *et al.* (2012) dan Tattersall *et al.* (2005) juga menyebutkan bahwa, protokol isolasi manual RNA seperti CTAB tidak cocok digunakan untuk mengisolasi RNA dari jaringan tanaman berfamili *Arecaceae* 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 manual CTAB modifikasi 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 uji kualitatif RNA yang didasarkan pada elektroforegram yang memvisualisasi pita ganda 18S rRNA dan 28 S rRNA, teknik isolasi RNA berbasis *kit* komersial menunjukkan kualitas RNA terbaik, dan mengindikasikan keutuhan RNA total yang terisolasi (tidak terdegradasi dan tidak adanya kontaminasi protein dan polisakarida).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa, RNA total hasil isolasi protokol *kit* komersial #2 berbasis *buffer* RAP yang mengandung guanidin hidroklorida memiliki kuantitas dan kualitas yang paling tinggi dibandingkan RNA total hasil isolasi protokol *kit* komersial #1 berbasis *buffer* RLT yang mengandung guanidin thiosianat ataupun protokol manual CTAB modifikasi. Profil hasil uji kuantitatif RNA total daun dan akar kelapa sawit yang didapatkan melalui protokol *kit* komersial #2 secara berurutan menunjukkan konsentrasi sebesar 338 ng/ μ l dan 184,4 ng/ μ l; rasio A_{260}/A_{280} RNA total sebesar 2,13 dan 2,18; serta rasio A_{260}/A_{230} sebesar 2,09 dan 2,20.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Pengelola Dana Perkebunan Kelapa Sawit (BPDPKS) yang telah

mendanai penelitian ini (Grant Riset No. PRJ-31/DPKS/2018).

KONTRIBUTOR PENULIS

Riza merupakan pemilik gagasan riset serta mendesain eksperimen di dalam penelitian ini. Dini dan Restu menulis manuskrip penelitian. Dini dan Riza melakukan pengambilan sampel bibit kelapa sawit. Dini dan Irfan mendesain metode yang digunakan dalam penelitian ini. Sapto mengarahkan Restu selama kegiatan penelitian serta memberikan kritik dan saran dalam pengembangan manuskrip. Indra dan Dadang mempersiapkan sampel bahan tanam dalam area pembibitan terkontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Bryant, S., and D. L. Manning. 1998. Isolation of messenger RNA. *Methods Mol Biol.*, 86: 61-64.
- Chang, Puryear, and Cairney. 1993. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA From Pine Trees. *Plant Molecular 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., A. Hernandez, and S. S. Korban 2004. RNA Extraction from Different Apple Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 437 – 438.
- Iandolino, A. B., F. G. DaSilva, H. Lim, H. Choi, L. E. Williams, D. R. Cook. 2004. High quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 269-278.
- Liu, W., B. Wang, C. Duan, C., and B. Li. 2005. A Method for Isolating Functional RNA Callus of *Dendrobium candidum* Contained Rich Polysaccharides. *Colloid. Surface B.*, 4: 259-262.
- Macherey-Nagel. 2006. *Total RNA Purification from Plant*. Macherey-Nagel. Germany.
- Martiansyah, I., D. M. Amanah, and R.A. Putranto. 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. and J. Heptinstall. 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., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

- Suehiro, N., K. Matsuda, S. Okuda and T. Natsuaki. 2005. A Simplified Method for Obtaining Plant Viral RNA for RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, 125(1): 67-73.
- Tattersal, E.A.R., A. Ergul, F. Alkayal, L. Deluc, J. C. Cushman, and G. R. Cramer. 2005. Comparison of Methods for Isolating High Quality RNA from Leaves of Grapevine. *Amj Enol Viticult.*, 56: 400-406.
- Teare, J. M., R. Islam, R. Flanagan, S. Gallagher, M. G. Davies, and C. Grabau. 1997. Measurement of Nucleic Acid Concentration Using the DyNa Quant™ and the Genequant™. *BioTechniques*, 22(6): 1170-1171.
- Wang, X. C., W. M. Tain, Y. X. Li, Y. X. 2008. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Mol. Biotechnol.*, 38: 57-64.
- Xiao, Y., Y. Yaodong, C. Hongxing, F. Haikuo, M. Zilong, L. Xintao, S. M. Annaliese, X. Zhihui, and H. Xi. 2012. Efficient Isolation of High Quality RNA from Tropical Palms for RNA-seq Analysis. *Plant Omics Journal*, 5(6): 584-589.