



PERBANDINGAN TIGA KIT EKSTRAKSI RNA UNTUK ANALISIS TRANSKRIPTOMIKA PADA KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Comparison of Three RNA Extraction Kits for Transcriptome Analysis of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Siti Zulaeha, Devit Purwoko, Imam Cartealy, Teuku Tajuddin*, Karyanti, Hayat Khairiyah
Balai Bioteknologi BPPT, Gd. 630 Kawasan PUSPIPTEK Setu Tangerang Selatan 15314
*Email: teuku.tajuddin@bppt.go.id

ABSTRACT

Obtaining high-quality RNA is very important at an early stage of molecular biology research. To isolate RNA, high skill and caution are required in following laboratory procedures because RNA is easily degraded, especially samples from plant tissue culture. One of the parameters used to check the total RNA quality is RIN (RNA Integrity Number). The aim of this study was to obtain RNA extraction methods on oil palm leaves, callus and somatic embryos that were of good quality and high concentrations for transcriptomic analysis. RNA extraction was carried out using Plant RNA PureLink (Ambion), Genezol RNA Extraction (Geneaid) and Ribospin™ Plant (Geneall) kit methods. The results showed that oil palm leaf, callus and somatic embryo RNA were successfully extracted using the Ribospin™ (Geneall) kit. Based on the total RNA number of more than 4 µg and the RIN value of more than 7, the extracted RNA could be used in RNA sequencing for transcriptomic analysis.

Keywords: *callus, oil palm, RNA analysis, RNA quality, somatic embryo*

ABSTRAK

Menghasilkan RNA berkualitas tinggi sangatlah penting pada tahap awal penelitian biologi molekuler. Untuk mengisolasi RNA diperlukan keterampilan dan kehati-hatian tinggi dalam mengikuti prosedur di laboratorium karena RNA lebih mudah terdegradasi, khususnya sampel hasil kultur jaringan tanaman. Salah satu parameter yang digunakan pada pengecekan kualitas RNA total adalah RIN (*RNA Integrity Number*). Penelitian bertujuan mendapatkan metode ekstraksi RNA pada daun, kalus dan embrio somatik kelapa sawit yang berkualitas baik dan memiliki konsentrasi tinggi untuk analisa transkriptomika. Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan metode kit Plant RNA PureLink (Ambion), Genezol RNA *Extraction* (Geneaid) dan Ribospin™ Plant (Geneall). Hasil menunjukkan bahwa RNA daun, kalus dan embrio somatik kelapa sawit telah berhasil diekstraksi dengan menggunakan kit Ribospin™ (Geneall). RNA hasil ekstraksi tersebut dapat digunakan untuk sekuensing RNA dengan tujuan analisis transkriptomika, dilihat dari jumlah total RNA yang lebih dari 4 µg dan nilai RIN lebih dari 7.

Kata Kunci: analisis RNA, embrio somatic, kalus, kelapa sawit, kualitas RNA

PENDAHULUAN

Mendapatkan RNA yang berkualitas tinggi merupakan langkah awal yang sangat penting dan kritis dalam penelitian biologi molekuler. RNA dengan kualitas dan konsentrasi yang tinggi adalah tuntutan utama pada penelitian dengan teknik *quantitative real-time* RT PCR, konstruksi *cDNA library*, mikro array, analisis *Northern blot*, analisis transkriptomika menggunakan NGS (*Next Generation Sequencing*) dan lainnya (Fleige et al. 2006, Schroeder et al. 2006, Kiewi et al. 2009, Gayral et al. 2011, Pereira et al. 2017).

Kajian sekuensing transkriptomika tumbuhan menggunakan teknologi NGS memiliki tantangan utama yaitu teknik isolasi RNA agar menghasilkan RNA dengan kualitas (RNA yang tidak terdegradasi, dan bebas dari pengotor) dan kuantitas yang baik (konsentrasi $\geq 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ atau kuantitas $\geq 2 \mu\text{g}$ dalam minimal volume 20 μL). Degradasi RNA diakibatkan oleh adanya aktivitas RNase yang tersebar di lingkungan maupun laboratorium yang dapat dengan cepat mendegradasi RNA (Sambrook dan Russell 2001). Metabolit primer maupun sekunder (fenolik dan polisakarida) pada tumbuhan dapat mengganggu proses isolasi RNA (Berenbaum dan Zangerl 2008, Bilgin et al. 2009, Macel et al. 2010, Agrawal 2011, Walter et al. 2012). Menurut Daohong et al. (2004), isolasi RNA tanaman sulit dilakukan karena tingginya kandungan polisakarida, pigmen, dan senyawa-senyawa lain yang terdapat di dalam jaringan tanaman. Jaringan tanaman kelapa sawit memiliki kandungan polisakarida, polifenol dan senyawa kompleks lainnya yang mengendap bersama RNA dan jumlahnya bervariasi pada jaringan sehingga menjadi permasalahan dalam memperoleh ekstrak RNA yang berkualitas tinggi (Qadri et al. 2019).

Ekstraksi RNA dapat dilakukan menggunakan metode konvensional maupun kit komersial. Metode konvensional menghasilkan RNA dalam jumlah banyak dengan waktu lebih lama namun kontaminasi DNA tinggi, sedangkan dengan kit komersial menghasilkan RNA yang cukup dengan kualitas yang baik serta membutuhkan waktu singkat (Habib et al.

2014). Pada umumnya metode ekstraksi RNA berbasis fenol/kloroform dan spin kolom. Metode ekstraksi RNA berbasis fenol/kloroform menghasilkan RNA lebih banyak dibanding metode spin kolom, namun RNA yang berkualitas dihasilkan dari metode spin kolom (Tesena et al. 2017). Xiao et al. (2012) mengembangkan protokol isolasi RNA dari 16 spesies tanaman *Palmaceae*, yaitu MRIP (*Methods for RNA Isolation from Palms*) dan membandingkannya dengan protokol isolasi RNA konvensional, seperti CTAB, Tiangen RNA plant, Invitrogen TRIZOL. Metode MRIP yang menggunakan kombinasi kit *ammonium thiocyanate*, GITC (*guanidine thiocyanate*) dan *acidic phenol* menghasilkan RNA dengan integritas yang baik dan dapat digunakan untuk aplikasi Illumina RNA sequencing dan *quantitative real-time* RT-PCR.

Kemampuan perolehan jumlah total RNA dan kualitas yang baik menjadi dasar dalam menentukan kit isolasi RNA yang akan digunakan. Total RNA terdiri dari mRNA (messenger/hasil ekspresi gen), tRNA (*transfer*) dan rRNA (*ribosomal*). Jumlah mRNA sekitar 1-3%, sedangkan rRNA sekitar 80% dari total RNA, yang mayoritas terdiri dari 25S dan 18S. Sehingga untuk mengecek kualitas RNA total digunakan parameter rasio rRNA (25S:18S). Umumnya rRNA 25S lebih labil dan lebih mudah terdegradasi dibanding 18S. Sehingga jika jumlah basa nukleotida 25S dalam rRNA menurun karena terjadinya degradasi, maka angka rasio 25S:18S akan menurun pula. Semakin rendah angka rasio rRNA berarti akan semakin rendah kualitas total RNA.

Tingkat kontaminasi sampel dievaluasi dengan menentukan rasio absorbansi sampel pada panjang gelombang 260 dan 280 nm ($A_{260}:A_{280}$). Rasio kontaminasi asam nukleat terukur pada 260 nm, sedangkan protein dan kontaminan lain terukur pada 280 nm. Nilai rasio total sampel RNA ≥ 1.8 dianggap baik dan dapat dilanjutkan untuk langkah berikutnya (Becker et al. 2010). Untuk studi transkriptomik menggunakan teknologi NGS, kualitas RNA diukur berdasarkan nilai RIN (*RNA integrity number*) (Kiewi et al. 2009, Qiao et al. 2017, Briones et al. 2018). Nilai RIN menunjukkan tingkat fragmentasi RNA (semakin besar nilai RIN maka RNA semakin utuh). Perangkat lunak algoritma RIN

memudahkan klasifikasi RNA total berdasarkan sistem angka dari 1 hingga 10. Angka 1 berarti semua RNA terdegradasi, sedangkan angka 10 menunjukkan RNA yang utuh sempurna. RNA dengan nilai RIN $\geq 7-8$ dianggap optimal untuk sebagian besar aplikasi molekuler lanjut (Schroeder et al. 2006, Opitz et al. 2010, Gayral et al. 2011, Gallego Romero et al. 2014, Reiman et al. 2017).

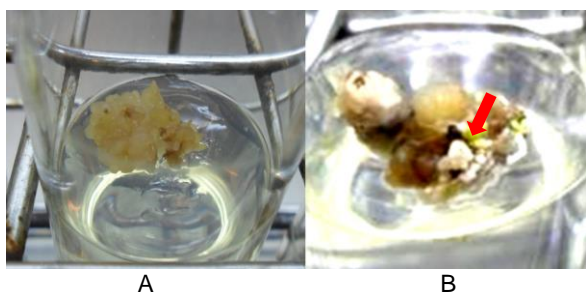
Dengan diperolehnya data transkripsi RNA pada tanaman kelapa sawit akan menambah informasi yang berguna bagi pengembangan kualitas kelapa sawit. Analisis data bioinformatika melalui sekuensing transkriptomika akan diperoleh informasi penting dengan dampak hasil yang bernilai ilmiah tinggi. Dengan demikian mendapatkan RNA yang berkualitas baik merupakan tahap yang penting sebelum dilakukan analisa lebih lanjut.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan tiga kit ekstraksi RNA (berbasis fenol/kloroform: Genezol RNA Extraction, serta berbasis spin kolom: Plant RNA PureLink dan Ribospin™ Plant) pada sampel daun, kalus dan embrio somatik kelapa sawit sehingga diperoleh RNA yang berkualitas baik dan konsentrasi tinggi untuk keperluan analisis transkriptomika pada kelapa sawit.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Gen, Balai Bioteknologi Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (PUSPIPTEK) Setu, mulai dari bulan Februari hingga Juli 2017.



Gambar 1. Bahan yang digunakan untuk isolasi RNA: kalus kelapa sawit (A); embrio kelapa sawit (tanda panah merah) (B)

Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun kelapa sawit yang diambil dari tanaman kelapa sawit (usia ± 5 tahun) yang ditanam di Kebun Induk area PUSPIPTEK Setu, Serpong, Banten. Sedangkan kalus dan embrio somatik merupakan hasil regenerasi daun kelapa sawit yang diperoleh dari Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Balai Bioteknologi BPPT (Gambar 1).

Metode

Isolasi RNA daun, kalus dan embrio somatik kelapa sawit pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 3 jenis kit komersial, yaitu Plant RNA PureLink (Ambion 2012), Genezol RNA Extraction (Geneaid 2015) dan Ribospin™ Plant (Geneall 2012) sesuai protokol pabrikan masing-masing. Deskripsi kit yang digunakan terkait spesifikasi, waktu yang dibutuhkan untuk isolasi RNA dan biaya yang dikeluarkan setiap sampel dirangkum pada Tabel 1. Secara umum, dilihat dari waktu pengerjaannya, ketiga metode isolasi RNA ini menghabiskan waktu sekitar 25 menit. Perkiraan biaya per sampel yang dibutuhkan, dengan biaya terendah yaitu Genezol RNA Extraction (Geneaid) sebesar Rp. 30.800/sampel, Ribospin™ Plant (Geneall) sebesar Rp. 86.400/sampel dan Plant RNA PureLink (Ambion) sebesar Rp. 171.536/sampel. Tiga sampel dari setiap jenis jaringan diekstraksi menggunakan tiga kit tersebut sehingga diperoleh sembilan satuan percobaan. Evaluasi kualitas dan kuantitas RNA pada setiap sampel dilakukan untuk setiap metode.

Kit Plant RNA PureLink

Sampel tanaman segar sebanyak 100 gram digerus menggunakan nitrogen cair hingga menjadi bubuk. Sampel bubuk dimasukkan ke dalam tabung bebas RNase, serta ditambahkan 0,5 mL Kit Plant RNA PureLink (yang disimpan pada suhu 4°C). Campuran sampel kemudian dikocok dengan vortex hingga sampel tersuspensi sempurna. Kemudian campuran diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, dan tabung diletakkan secara horizontal. Setelah itu campuran disentrifus pada kecepatan 12.000 $\times g$ selama 2 menit pada suhu ruang. Supernatan ditransfer ke dalam tabung baru, lalu ditambahkan 5M NaCl sebanyak 0,1 mL

Tabel 1. Deskripsi kit komersial yang digunakan pada penelitian

Nama kit (nomor katalog)	Keterangan umum	Spesifikasi kit	Waktu persiapan ^a	Harga per sampel ^b
GeneAll® Ribospin™ Plant (307-150)	Operasi secara manual, ekstraksi berbasis membran, tanpa phenol dan kloroform, purifikasi dengan enzim	sampel: 100 mg volume elusi RNA minimal: 30 µL	25 menit	Rp. 86.400
PureLink® RNA Mini Kit (12183018A)	Operasi secara manual, ekstraksi berbasis membran, tanpa phenol dan kloroform, purifikasi dengan enzim	sampel: 100 mg volume elusi RNA minimal: 30 µL	25 menit	Rp. 171.536
GENEzol™ (GZR100)	Operasi secara manual, ekstraksi berbasis membran, dengan phenol dan tanpa kloroform, purifikasi dengan enzim	sampel: 50 mg volume elusi RNA minimal: 50 µL	25 menit	Rp. 30.800

Keterangan : ^aWaktu persiapan berdasarkan prosedur yang tertera pada manual kit

^bBerdasarkan harga kit pada tahun 2017

dan larutan dicampur dengan cara diinversi 3-5 kali. Kemudian ditambah 0,3 mL kloroform dan larutan diinversi 3-5 kali. Campuran sampel disentrifus pada 12.000 ×g selama 10 menit pada suhu 4°C. Fase *aqueous* (fase atas) ditransfer ke tabung baru, dilanjutkan dengan penambahan isopropanol dengan volume yang setara. Sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian disentrifus pada 12.000 ×g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan menjaga agar pelet tidak terbuang, dan ditambahkan 1 mL etanol 75%. Setelah itu dilakukan sentrifus kedua pada kecepatan 12.000 ×g selama 1 menit pada suhu ruang. Akhirnya supernatan dipipet dan dipindahkan ke tabung baru secara hati-hati agar pelet tidak ikut terambil. Air bebas RNase ditambahkan sebanyak 10-30 µL dan stok RNA disimpan pada suhu -70°C.

Kit Genezol RNA Extraction

Sampel tanaman segar sebanyak 50-100 gram digerus menggunakan nitrogen cair hingga menjadi bubuk dan dimasukkan ke dalam tabung bebas RNase, lalu ditambahkan Kit genezol 1 mL (yang disimpan pada suhu 4°C). Campuran sampel kemudian dikocok dengan Vortex selama 10 detik hingga sampel tersuspensi sempurna, dan biarkan sampel selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan kloroform sebanyak 200 µL, dan dikocok

kembali dengan vortex hingga sampel tersuspensi sempurna. Campuran selanjutnya disentrifus pada kecepatan 12.000 ×g selama 15 menit pada suhu 4°C. Fase *aqueous* (fase atas) ditransfer ke dalam tabung baru, dan isopropanol ditambahkan dengan volume yang setara, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Sampel lalu disentrifus pada 12.000 ×g selama 10 menit pada suhu 4°C. Setelah supernatan dibuang, etanol 70% ditambahkan ke dalam tabung sebanyak 1 mL. Berikutnya sampel disentrifus pada kecepatan 12.000 ×g selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian diambil secara hati-hati agar pelet tidak terikut, dan dipindahkan ke dalam tabung baru. Setelah dikering-anginkan selama 5-10 menit pada suhu ruang, air bebas RNase ditambahkan sebanyak 20-50 µL. Akhirnya RNA yang diperoleh diinkubasi pada 55-60°C selama 10-15 menit, dan disimpan pada suhu -70°C.

Kit Ribospin™ Plant

Sampel tanaman segar sebanyak 100 gram digerus dalam cawan menggunakan nitrogen cair hingga menjadi bubuk. Sampel bubuk kemudian dimasukkan ke dalam tabung bebas RNase dan ditambahkan 350 µL buffer RPL, terus dikocok dengan vortex hingga sampel tersuspensi sempurna. Kemudian campuran didiamkan selama 3 menit pada suhu ruang. Pindahkan lisat pada

filter *EzPure* (kolom spin berwarna kuning). Setelah itu campuran disentrifus pada kecepatan 10.000 \times g selama 30 detik pada suhu ruang. Supernatan selanjutnya dipindahkan ke tabung baru, ditambahkan etanol 70% sebanyak 1 volume (biasanya 350 μ L), dan campuran dikocok dengan cara inversi. Sebelum disentrifus pada kecepatan 10.000 \times g selama 30 detik pada suhu ruang, campuran sampel dimasukkan ke dalam kolom mini spin (tipe W, lingkaran biru). Buffer RBW sebanyak 500 μ L kemudian ditambahkan pada kolom mini spin, dan disentrifus kembali pada kecepatan 10.000 \times g selama 30 detik pada suhu ruang. Campuran Dnase I sebanyak 70 μ L (yang terdiri dari: 2 μ L Dnase I dan 70 μ L DRB) terus ditambahkan ke dalam area tengah kolom mini spin, yang dilanjutkan dengan inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Buffer RBW 500 μ L sekali lagi ditambahkan pada kolom mini spin dan dibiarkan selama 2 menit, lalu disentrifus pada 10.000 \times g selama 30 detik pada suhu ruang. Kemudian buffer RNW 500 μ L ditambahkan pada kolom mini spin, terus disentrifus pada kecepatan 10.000 \times g selama 30 detik pada suhu ruang. Tahap berikutnya adalah mengulangi langkah: penambahan 500 μ L buffer RNW ke dalam kolom mini spin, dilanjutkan dengan sentrifus pada 10.000 \times g selama 30 detik pada suhu ruang. Untuk menghilangkan sisa buffer, larutan disentrifus pada kecepatan 10.000 \times g selama 1 menit pada suhu ruang, yang diikuti dengan pemindahan kolom mini spin ke dalam tabung baru. Setelah menambahkan 50 μ L air bebas RNase pada area tengah kolom mini spin, dilakukan sentrifus pada 10.000 \times g selama 1 menit pada suhu ruang. Kolom mini diambil dan stok RNA disimpan pada suhu -70°C .

Pengukuran sampel RNA

Analisa RNA secara kualitatif pada sampel daun, kalus dan embrio somatik kelapa sawit dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa dan divisualisasi menggunakan UV transilluminator. Sedangkan pengukuran secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, USA). Analisa RIN menggunakan Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA) berdasarkan metode Schroeder (2006).

Hanya RNA dengan kuantitas minimal 4 μ g dan nilai RIN minimal 7 yang dapat dilanjutkan untuk dilakukan sekuensing.

Analisis data

Analisis dilakukan terhadap kuantitas (jumlah total RNA dalam $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) dan kualitas (Rasio A260:A280 dan nilai RIN) RNA setiap jenis sampel yang diperoleh dari masing-masing kit menggunakan uji ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf nyata 5%. Jika homogenitas varian tidak terpenuhi maka perbandingan presisi kit dievaluasi secara statistik deskripsi menggunakan uji Levene (Jeffries et al. 2014) melalui perhitungan koefisien variasi (% CV) dengan taraf nyata 5%. Analisis statistik untuk data kuantitas dan kualitas RNA dilakukan menggunakan program Minitab® 16.2.4 ([http://www.minitab.com/en-us/Press-Releases/Minitab-16-s-“Assistant”--A-Powerful-Weapon-in-the-Statistics-Battle/.](http://www.minitab.com/en-us/Press-Releases/Minitab-16-s-“Assistant”--A-Powerful-Weapon-in-the-Statistics-Battle/))

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kajian perbandingan kit komersial Plant RNA PureLink, Genezol RNA Extraction dan Ribospin™ Plant dilakukan terhadap eksplan daun, kalus dan embrio somatik tanaman kelapa sawit dengan ulangan masing-masing tiga per sampel. Tahap awal optimasi metode digunakan sampel daun muda kelapa sawit. Setelah diperoleh hasil optimasi yang terbaik, metode tersebut digunakan untuk isolasi RNA dari sampel kalus dan embrio somatik kelapa sawit.

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian RNA pada sampel penelitian ini diukur menggunakan spektrofotometer nanodrop dan elektroforesis gel agarose 1% yang divisualisasi dibawah UV transilluminator, kemudian analisa RIN dideteksi menggunakan Agilent Bioanalyzer 2100. Perbedaan kemampuan setiap kit diuji secara statistik. Hasil pengukuran konsentrasi RNA kelapa sawit menggunakan metode tersebut diatas tertera pada Tabel 2.

Kuantitas dan kualitas RNA berdasarkan kit

RNA yang baik memiliki konsentrasi minimal 5-500 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Aranda et al. 2009) dan rasio A260/A230 sebesar 2,0-2,4 (Farrell 2010). Berdasarkan Tabel 2, konsentrasi rata-rata RNA hasil isolasi menggunakan Plant RNA Purelink dan Genezol memiliki

nilai yang sangat tinggi, yaitu lebih dari 300 ng·µL⁻¹ namun kemurniannya lebih rendah daripada Ribospin. Hal ini dimungkinkan karena RNA yang diperoleh sudah terdegradasi. RNA daun, kalus maupun embrio somatik menggunakan Ribospin memiliki kualitas yang baik. Konsentrasi RNA yang yang diperoleh juga cukup tinggi, yaitu lebih dari 100 ng·µL⁻¹, dengan kemurnian RNA berkisar antara 1,99-2,19. Hasil ini sesuai dengan deskripsi pabrikan (1,8-2,2).

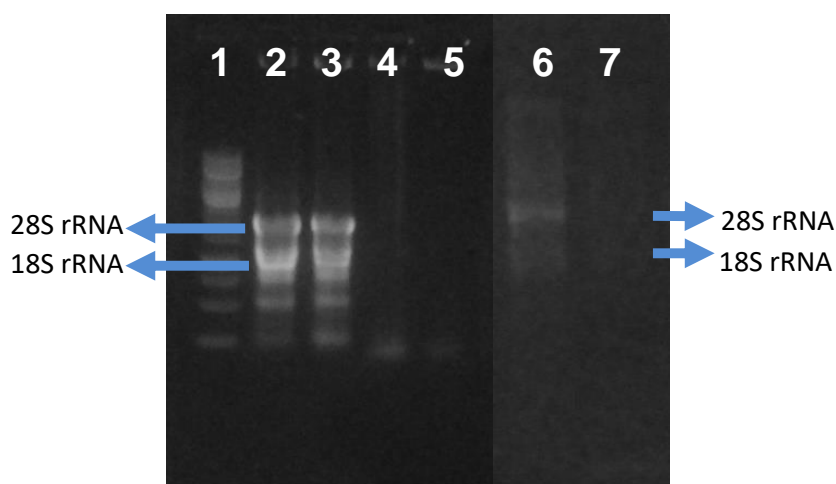
Hasil elektroforesis pada Gambar 2 menunjukkan RNA hasil isolasi menggunakan Plant RNA Purelink dan Ribospin™ Plant menghasilkan dua pita yang menunjukkan posisi 28S rRNA dan 18S rRNA. Sedangkan hasil isolasi RNA menggunakan Genezol, tidak tampak kedua pita khas RNA tersebut. Pada metode Plant RNA Purelink terlihat *smear* pada jalur

elektroforesisnya. *Smear* dapat menunjukkan komponen RNA seperti mRNA dan tRNA (Farrell 2010). Komponen mRNA tampak sebagai *smear* karena sedikitnya jumlah mRNA (1-4% dari total RNA) dan heterogenitas ukuran mRNA yang tinggi. Komponen tRNA dan rRNA termasuk RNA dengan berat molekul yang rendah sehingga terlihat sebagai *smear* tipis di bawah pita 18S rRNA hingga mendekati bagian akhir gel. *Smear* di sepanjang jalur migrasi RNA juga dapat menunjukkan adanya degradasi sampel akibat kontaminasi RNase selama proses isolasi (Bryant dan Manning 1998).

Evaluasi kemampuan setiap kit dalam mengekstraksi tiga jenis sampel jaringan kelapa sawit dilakukan secara statistik. Tiga kit yang digunakan menghasilkan jumlah konsentrasi RNA minimum (100 ng·µL⁻¹) yang dibutuhkan untuk analisis lebih lanjut.

Tabel 2. Kualitas dan kuantitas hasil isolasi RNA kelapa sawit yang diukur dengan Nanodrop.

Eksplan	Ulangan	Ribospin		Purelink		Genezol	
		Konsentrasi (ng·µL ⁻¹)	260/280	Konsentrasi (ng·µL ⁻¹)	260/280	Konsentrasi (ng·µL ⁻¹)	260/280
Kalus	1	119,3	2,13	421,3	1,72	726,3	1,56
	2	103,1	2,19	559,7	1,34	159,8	2,14
	3	213,0	2,13	623,7	1,32	106,3	2,17
Embrio	1	184,5	2,18	1215,1	1,63	738,2	1,62
	2	104,4	2,16	910,8	2,17	827,9	1,56
	3	120,9	2,19	760,5	2,35	735,5	1,6
Daun	1	69,5	2,13	822,2	2,09	645,4	1,42
	2	19,1	1,99	775,2	2,04	999,2	1,47
	3	73,5	2,15	315,3	2,12	572,3	1,7



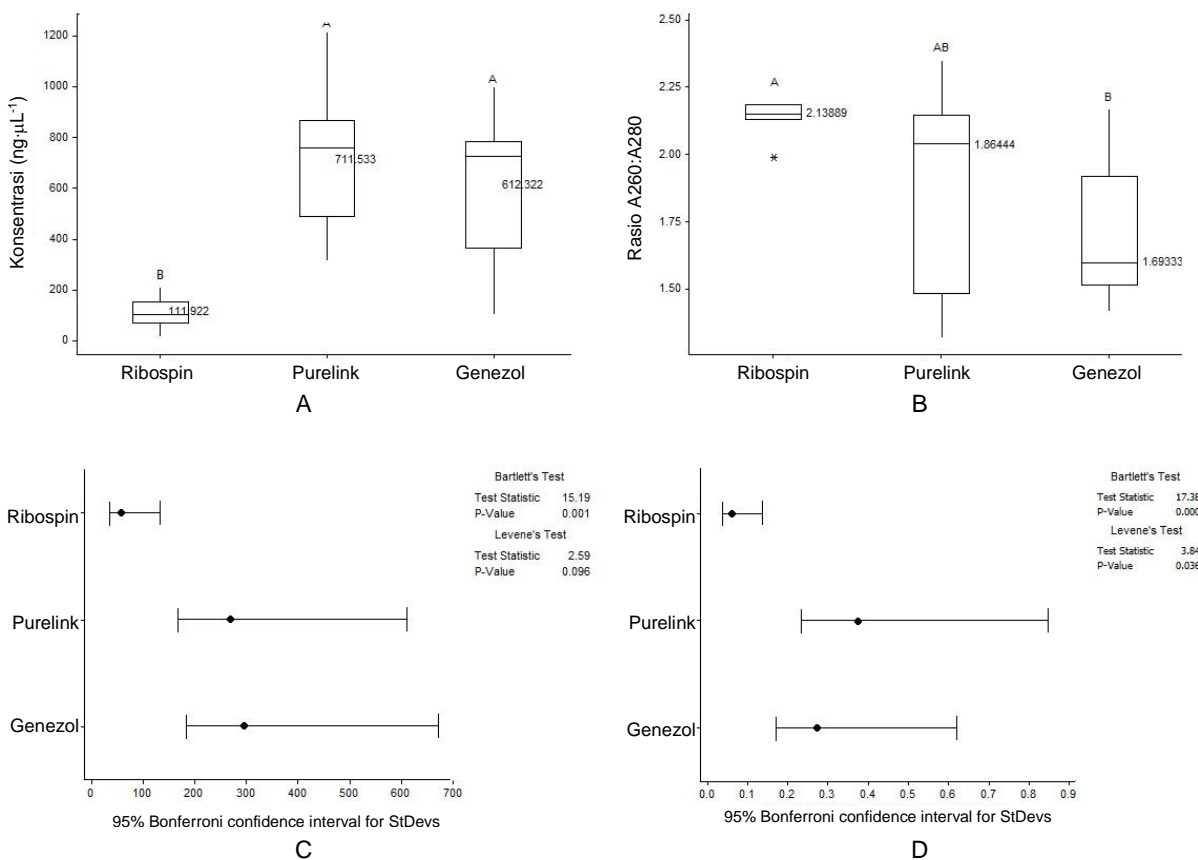
Gambar 2. Hasil visualisasi elektroforesis RNA daun kelapa sawit. (1) Marker 1 kb; (2 dan 3) RNA metode Plant RNA Purelink; (4 dan 5) RNA metode Genezol; dan (6 dan 7) RNA metode Ribospin™

Ribospin menghasilkan kuantitas yang berbeda dengan dua kit lainnya berdasarkan uji ANOVA $p < 0.00$ yang ditampilkan dalam bentuk diagram boxplot, sedangkan antara purelink dengan Genezol tidak berbeda (Gambar 3A). Sedangkan secara kualitas, Ribospin hanya berbeda nyata dengan Genezol dan Purelink tidak berbeda nyata baik dengan Ribospin maupun Genezol (Gambar 3B). Berdasarkan analisis uji Levene melalui perhitungan koefisien variasi (% CV) dengan taraf nyata 5% terdapat perbedaan yang signifikan baik kuantitas maupun kualitas RNA dari hasil Ribospin dibandingkan kit lainnya (Gambar 3C dan 3D). Ribospin menghasilkan kuantitas RNA dengan rata-rata $111,92 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ atau sekitar enam kali lebih rendah dari kedua kit lainnya. Konsentrasi RNA yang diperoleh dengan Ribospin lebih sedikit namun memiliki kualitas kemurnian yang lebih baik dibanding kit lainnya (Gambar 3B). Ribospin menghasilkan rata-rata kemurnian pada rasio A260:A280 sebesar 2,14 dan terdapat pencilaan sebesar 1,99. Berbeda dengan kit lainnya menghasilkan rata-rata kemurnian

lebih rendah dengan rentang yang cukup luas dari 1,50 sampai 2,00.

Kemampuan kit berdasarkan sampel

Kemampuan kit dalam ekstraksi sampel daun, kalus, dan embrio somatik pada penelitian ini beragam baik dari segi kuantitas maupun kualitasnya. Untuk sampel kalus semua kit mampu mengekstraksi dengan kuantitas yang tidak berbeda (Gambar 4A) dan cukup untuk analisis hilir. Namun dari segi kualitas (A260:A280) perbedaan nyata dihasilkan antara Ribospin dengan Purelink sedangkan Genezol tidak berbeda nyata (Gambar 4B). Ribospin dan Genezol memberikan nilai kualitas yang memenuhi standar untuk analisis hilir masing-masing yaitu 2,15 dan 1,96. Pada sampel embrio, Ribospin memiliki kemampuan ekstraksi yang paling rendah dan berbeda nyata dengan kit lainnya (Gambar 4A). Sedangkan secara kualitas Ribospin tidak berbeda nyata dengan Purelink namun berbeda nyata dengan Genezol (Gambar 4B). Hal yang

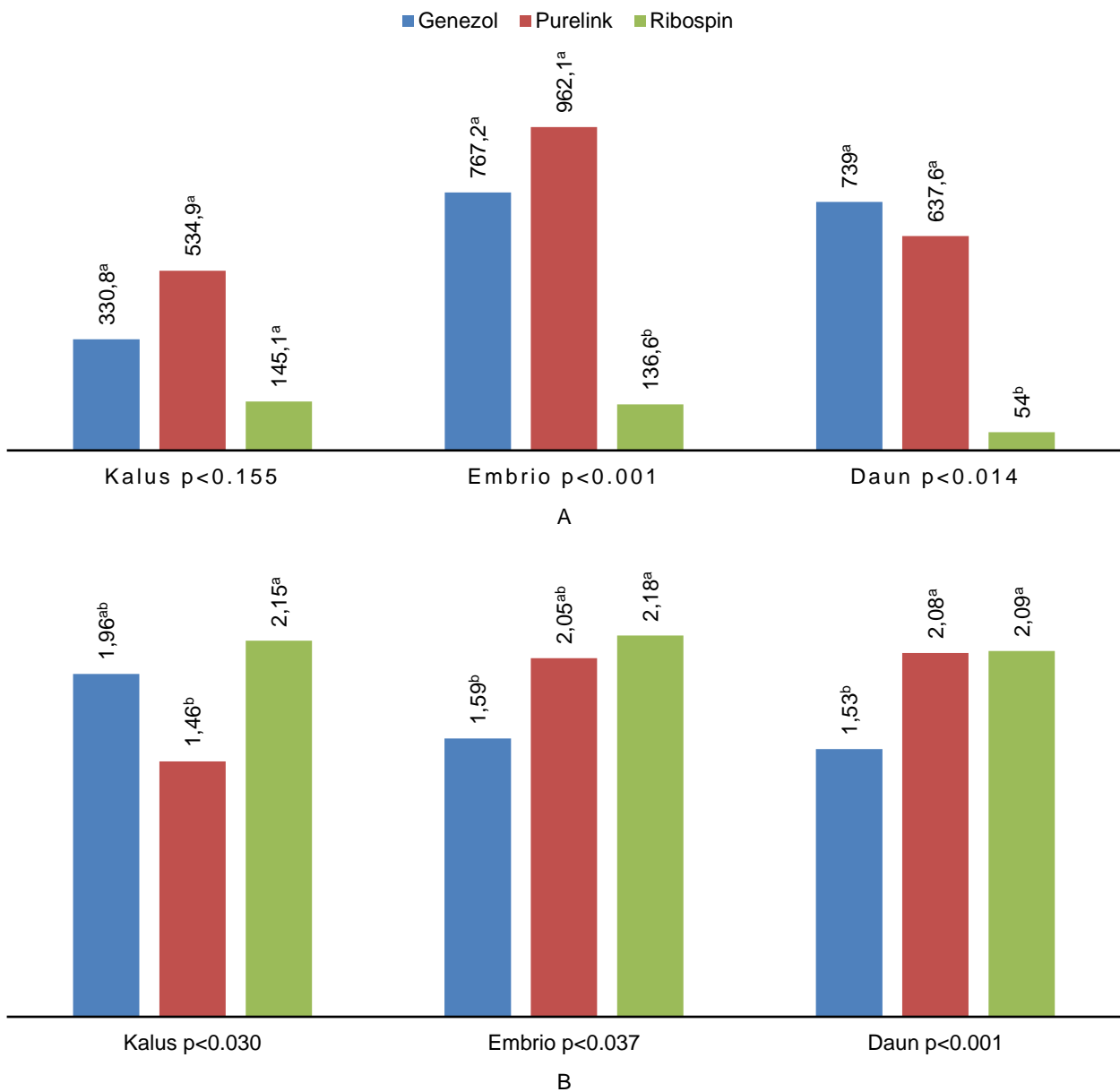


Gambar 3. Hasil analisis boxplot (A dan B) dan uji Levene (C dan D) kuantitas dan kualitas RNA kelapa sawit. (*Nilai dengan abjad yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan pasca uji Tukey's ($p > 0,05$))

sama diperoleh pada sampel daun, secara kualitas Ribospin dan Purelink tidak berbeda nyata namun berbeda nyata dengan Genezol sedangkan secara kuantitas Purelink dan Genezol tidak berbeda nyata namun berbeda nyata dengan Ribospin (Gambar 4A dan 4B). Secara umum Genezol menghasilkan RNA dengan kualitas paling rendah untuk sampel embrio dan daun namun tidak pada sampel kalus. Sedangkan Ribospin menghasilkan RNA dengan kuantitas terendah untuk semua sampel.

Perbandingan integritas RNA (RIN)

Integritas RNA dapat dinilai secara kualitatif dengan gel atau secara kuantitatif menggunakan sistem seperti Agilent Bioanalyzer 2100, yang menggunakan mikrofluida untuk memisahkan ukuran dan mengukur RNA. Alat ini mengukur jumlah ribosom 28S dan 18S RNA; RNA integritas tinggi memiliki rasio 28S:18S ~ 2.0. Alat ini juga mampu menghitung RNA Integrity Number (RIN) dengan mempertimbangkan distribusi ukuran penuh RNA, bukan hanya 28S dan 18S rRNA, dan dianggap lebih akurat

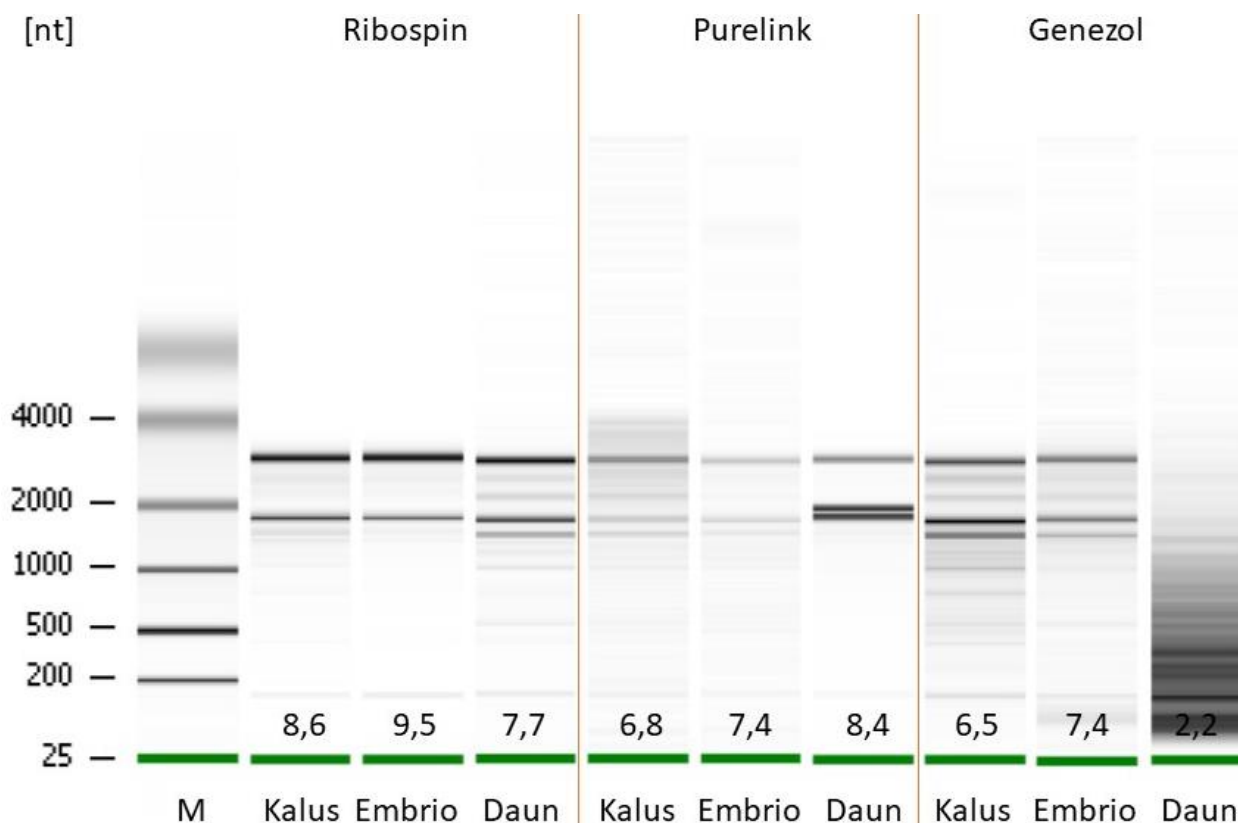


Gambar 4. Pengaruh kemampuan kit dalam menghasilkan kuantitas (A) dan kualitas (B) RNA dari sampel kalus, embrio dan daun kelapa sawit. (*Nilai dengan abjad yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan pasca uji Tukey's (p>0,05))

(Schroeder et al. 2006, Mueller et al. 2016). Nilai RIN berkorelasi dengan hasil eksperimen hilir sehingga menjadi standar baku sebelum analisis hilir dilanjutkan, hal ini penting karena terkait dengan biaya dan sumber daya yang telah dikeluarkan (Schroeder et al. 2006).

Secara umum dari hasil yang diperoleh kemampuan kit dalam isolasi RNA tergantung pada jenis sampel, tetapi kuantitas dan kualitas yang mampu

diperoleh dari masing-masing kit perlu menjadi perhatian. Hampir semua kit mampu memperoleh jumlah RNA $\geq 1 \mu\text{g}$ (kecuali Genezol untuk sampel embrio) sehingga cukup memadai untuk analisis hilir qPCR maupun NGS (Tabel 3 dan 4). Namun kenyataannya tidak semua kit mampu menghasilkan RNA dengan rasio A260:A280 $\geq 1,8$ hanya Ribospin yang memenuhi rasio tersebut untuk semua sampel. Purelink hanya untuk sampel



Gambar 5. Gambar gel yang dihasilkan untuk pemeriksaan kualitas RNA yang dilakukan melalui Bioanalyzer 2100

Tabel 4. Kualitas dan kuantitas hasil isolasi RNA kelapa sawit yang diukur dengan Bioanalyzer

Kit	Sampel	260/280	Rasio rRNA	RIN	Konsentrasi (ng· μL^{-1})	Volume (μL)	Jumlah total (μg)
Ribospin	Kalus	2,15±0,03	1,7	8,6	226	22	4,97
	Embrio	2,18±0,01	2,4	9,5	352	16	5,63
	Daun	2,09±0,08	1,4	7,7	61	110	6,71
Purelink	Kalus	1,46±0,22	1,2	6,8	19	280	5,32
	Embrio	2,05±0,37	1,7	7,4	13	150	1,95
	Daun	2,08±0,04	0,8	8,4	174	25	4,35
Genezol	Kalus	1,96±0,34	0,9	6,5	73	60	4,38
	Embrio	1,59±0,03	1,1	7,4	25	33	0,83
	Daun	1,53±0,15	0,3	2,2	209	12	2,51

embrio dan daun sedangkan Genezol hanya untuk sampel kalus (Tabel 4). Hal ini menunjukkan perbedaan kemampuan setiap kit dalam menghapus kontaminan dari RNA.

Kemampuan setiap kit dalam memperoleh RNA utuh yang diukur melalui nilai RIN berbeda. Ribospin dan Purelink mampu menghasilkan RNA utuh (RIN \geq 7) untuk setiap sampel namun tidak dengan Genezol (Tabel 4). RNA yang diisolasi dari sampel kalus (RIN=6,5) dan daun (RIN=2,2) dengan Genezol mengalami degradasi tetapi tidak untuk sampel embrio. Jika dilihat pada Gambar 5 maka kemampuan kit dalam memperoleh RNA utuh untuk semua sampel dapat diurutkan mulai dari Ribospin, Purelink lalu Genezol. Hasil ini menunjukkan perbedaan kemampuan masing-masing kit dalam memperoleh RNA utuh tanpa terdegradasi sehingga bisa menjadi pertimbangan dalam menentukan kit untuk tujuan aplikasi hilir yang dibutuhkan.

KESIMPULAN

Isolasi RNA pada sampel daun, kalus dan embrio somatik kelapa sawit berhasil dilakukan dengan menggunakan tiga kit ekstraksi RNA yaitu Plant RNA PureLink (Ambion), Genezol RNA *Extraction* (Geneaid) dan Ribospin™ Plant (Geneall). Hasil menunjukkan bahwa isolasi RNA daun, kalus dan embrio somatik kelapa sawit menggunakan Ribospin™ lebih baik dibandingkan menggunakan Plant RNA PureLink (Ambion), Genezol RNA *Extraction* (Geneaid) dilihat dari konsentrasi RNA total lebih dari 4 μ g dan nilai RIN lebih dari 7. Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolasi RNA berbagai sampel kelapa sawit menggunakan Ribospin™ Plant (Geneall) dapat digunakan untuk sekuensing RNA dengan tujuan analisis transkriptomika.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas dukungan penelitian ini melalui Program Insentif Sistem Inovasi Nasional (Insinas), untuk pendanaan tahun 2016-2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal AA (2011) Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Funct Ecol* 25:420-432. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01796.x
- Ambion (2012) PureLink® RNA Mini Kit handbook. Carlsbad, CA USA. https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFSAsets/LSG/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf&title=UHVyZUxpbmkgS2I0. Diakses 22 Februari 2019
- Aranda R, Dineen SM, Craig RL, Guerrieri RA, Robertson JM (2009) Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 10⁴ concentration range. *Anal Biochem* 387:122-127. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.003
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW (2010) mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 50:237-243. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.010
- Berenbaum MR, Zangerl AR (2008) Facing the future of plant-insect interaction research: le retour a la "Raison d'Être". *Plant Physiol* 146:804-811. doi: 10.1104/pp.107.113472
- Bilgin DD, DeLucia EH, Clough SJ (2009) A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 4:333-340. doi: 10.1038/nprot.2008.249
- Briones C, Nuñez JJ, Pérez M, Espinoza-Rojas D, Molina-Quiroz C, Guíñez R (2018) De novo male gonad transcriptome draft for the marine mussel *Perumytilus purpuratus* with a focus on its reproductive-related proteins. *J Genomics* 6:127-132. doi: 10.7150/jgen.27864
- Bryant S, Manning DL (1998) Isolation of messenger RNA. *Methods Mol Biol* 86:61-64. doi: 10.1385/0-89603-494-1:61
- Daohong W, Bochu W, Biao L, Chuanren D, Jin Z (2004) Extraction of total RNA from *Chrysanthemum* containing high levels of phenolic and carbohydrates. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*

- 36:111-114. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2004.05.014
- Farrell RE (2010) RNA Methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization. 4th Edition. Academic Press, London. doi: 10.1016/C2009-0-01850-9
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28:1601-163. doi: 10.1007/s10529-006-9127-2
- Gallego Romero I, Pai AA, Tung J, Gilad Y (2014) RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biology* 12:42 doi: 10.1186/1741-7007-12-42
- Gayral P, Weinert L, Chiari Y, Tsagkogeorga G, Ballenghien M, Galtier N (2011) Next-generation sequencing of transcriptomes: A guide to RNA isolation in nonmodel animals *Mol Ecol Res* 11:650-661. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03010.x
- Geneaid (2015) GENEzol™ Reagent handbook, Taiwan. <http://www.geneaid.com/sites/default/files/GZR8.pdf>. Diakses 22 Februari 2019
- GeneAll (2012) GeneAll® Ribospin™ Plant. Plant total RNA purification Handbook. Brief protocol. <http://www.tribioscience.com/files/307-150.pdf>. Diakses 22 Februari 2019
- Habib SH, Saud HM, Kausar H (2014) Efficient oil palm total RNA extraction with a total RNA extraction kit. *Genet Mol Res* 13:2359-2367 doi: 10.4238/201
- Jeffries MKS, Kiss AJ, Smith AW, Oris JT (2014) A comparison of commercially-available automated and manual extraction kits for the isolation of total RNA from small tissue samples. *BMC Biotechnol* 14:94. doi: 10.1186/s12896-014-0094-8
- Kiewe P, Gueller S, Komor M, Stroux A, Theil E, Hoffman WK (2009) Prediction of qualitative outcome of oligonucleotide microarray hybridization by measurement of RNA integrity using the 2100 Bioanalyzer capillary electrophoresis system *Ann Hematol* 88:1177-1183. doi: 10.1007/s00277-009-0751-5
- Macel M, van Dam NM, Keurentjes JJB (2010) Metabolomics: The chemistry between ecology and genetics. *Mol Ecol Resour* 10:583-593. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02854.x
- Mueller O, Lighthfoot S, Schroeder A (2016) RNA Integrity Number (RIN): Standardization of RNA quality control application. Agilent application note publication 1:1-8 <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf>. Diakses 22 Februari 2019
- Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, Jung K, Jo P, Emons G, Ghadimi BM, Beißbarth T, Gaedcke J (2010) Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genomics* 3:36. doi: 10.1186/1755-8794-3-36
- Pereira WJ, Bassinello PZ, Brondani C, Vianello RP (2017) An improved method for RNA extraction from common bean seeds and validation of reference genes for qPCR. *Crop Breed Appl Biotechnol* 17:150-158. doi: 10.1590/1984-70332017v17n2a22
- Qadri R, Iqbal A, Wu Y, Li J, Nisar N, Azam M, Yang Y (2019) A modified protocol for total RNA isolation from different oil palm (*Elaeis guineensis*) tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Curr Sci* 116:479-482 doi: 10.18520/cs/v116/i3/479-482
- Qiao G, Liu M, Song K, Li H, Yang H, Yin Y, Zhuo R (2017) Phenotypic and comparative transcriptome analysis of different ploidy plants in *Dendrocalamus latiflorus* Munro. *Front Plant Sci* 8:1371 doi: 10.3389/fpls.2017.01371
- Reiman M, Laan M, Rull K, Söber S (2017) Effects of RNA integrity on transcript quantification by total RNA sequencing of clinically collected human placental samples *FASEB J* 31:3298-3308. doi: 10.1096/fj.201601031RR
- Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lighthfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity value to RNA

- measurements. *BMC Mol Biol* 7:3. doi: 10.1186/1471-2199-7-3
- Tesena P, Korchunjit W, Taylor J, Wongtawan T (2017) Comparison of commercial RNA extraction kits and qPCR master mixes for studying gene expression in small biopsy tissue samples from the equine gastric epithelium. *J Equine Sci* 28:135-141. doi: 10.1294/jes.28.135.
- Walter J, Hein R, Auge H, Beierkuhnlein C, Loeffler S (2012) How do extreme drought and plant community composition affect host plant metabolites and herbivore performance? *Arthropod-Plant Interact* 6:15-25. doi: 10.1007/s11829-011-9157-0
- Xiao Y, Yang Y, Cao H, Fan H, Ma Z, Lei X, Mason AS, Xia Z, Huang X (2012) Efficient isolation of high quality RNA from tropical palms for RNA-seq analysis. *Plant Omics* 5:584-589