

Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera)

Total RNA isolation from the mesocarp of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) fruits

ULIMA DARMANIA AMANDA^{1,2,*}, IMAM CIVI CARTEALY³

¹Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Banten, Jl. Raya Ciptayasa KM. 01 Ciruas, Serang 42182 -Banten, Indonesia. Tel. +62-254-281055, *email: ulima.darmania@gmail.com

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok 16424, Jawa Barat, Indonesia.

³BP Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Gedung 630 Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang 15314, Banten, Indonesia.

Manuskrip diterima: 8 Desember 2014. Revisi disetujui: 29 Januari 2015.

Abstrak. Amanda UD, Cartealt IC. 2015. Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (2): 171-176*. Telah dilakukan studi awal isolasi RNA total dari jaringan daging buah (mesokarp) tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera). Isolat RNA total yang baik merupakan syarat untuk penelitian yang berkaitan dengan ekspresi gen. Penelitian bertujuan untuk memperoleh metode ekstraksi RNA total dengan kualitas dan kuantitas yang optimal. Sampel jaringan yang digunakan adalah daging buah muda dari kelapa sawit varietas Tenera dengan perlakuan penyimpanan beku (*frozen*) dan jaringan segar (*fresh*). Buffer denaturan yang digunakan dalam penelitian berasal dari kit ekstraksi RNA, yaitu buffer RLT (mengandung guanidin tiosianat/GITC) dan RLC (mengandung guanidin hidroklorida/GuHCL). Secara kualitatif, hasil ekstraksi RNA dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 1%. Isolat RNA total yang diperoleh dalam penelitian mempunyai kualitas yang optimal, ditunjukkan melalui fluoresensi pita 18S rRNA dan 28S rRNA dengan ketebalan (intensitas) dan ketajaman yang baik. Kuantifikasi isolat RNA total dilakukan dengan bantuan alat spektrofotometer melalui pengukuran absorbansi UV pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}). Konsentrasi RNA total tertinggi diperoleh pada sampel beku yang diekstraksi menggunakan buffer RLC (sampel D), yaitu sebesar 641,52 ng/ μ L. Keberadaan kontaminan juga diketahui melalui spektrofotometer, dengan mengukur besar perbandingan (rasio) A_{260} terhadap A_{280} dan rasio A_{260} terhadap A_{230} . Sampel D mempunyai kemurnian yang paling baik diantara semua sampel dengan nilai A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230} paling mendekati $2,0 \pm 0,1$.

Kata kunci: guanidin thiocyanat, guanidin hidroklorida, mesocarp tissue, palm oil, total RNA isolation

Singkatan: GITC, guanidin thiocyanat; GuHCl, guanidin hidroklorida; DEPC, dietilpirokarbonat; RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*

Abstrak. Amanda UD, Cartealt IC. 2015. Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (2): 171-176*. Telah dilakukan studi awal isolasi RNA total dari jaringan daging buah (mesokarp) tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera). Isolat RNA total yang baik merupakan syarat untuk penelitian yang berkaitan dengan ekspresi gen. Penelitian bertujuan untuk memperoleh metode ekstraksi RNA total dengan kualitas dan kuantitas yang optimal. Sampel jaringan yang digunakan adalah daging buah muda dari kelapa sawit varietas Tenera dengan perlakuan penyimpanan beku (*frozen*) dan jaringan segar (*fresh*). Buffer denaturan yang digunakan dalam penelitian berasal dari kit ekstraksi RNA, yaitu buffer RLT (mengandung guanidin tiosianat/GITC) dan RLC (mengandung guanidin hidroklorida/GuHCL). Secara kualitatif, hasil ekstraksi RNA dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 1%. Isolat RNA total yang diperoleh dalam penelitian mempunyai kualitas yang optimal, ditunjukkan melalui fluoresensi pita 18S rRNA dan 28S rRNA dengan ketebalan (intensitas) dan ketajaman yang baik. Kuantifikasi isolat RNA total dilakukan dengan bantuan alat spektrofotometer melalui pengukuran absorbansi UV pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}). Konsentrasi RNA total tertinggi diperoleh pada sampel beku yang diekstraksi menggunakan buffer RLC (sampel D), yaitu sebesar 641.52 ng/ μ L. Keberadaan kontaminan juga diketahui melalui spektrofotometer, dengan mengukur besar perbandingan (rasio) A_{260} terhadap A_{280} dan rasio A_{260} terhadap A_{230} . Sampel D mempunyai kemurnian yang paling baik diantara semua sampel dengan nilai A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230} paling mendekati 2.0 ± 0.1 .

Keywords: Thiocyanic guanidine, guanidine hydrochloride, mesocarp tissue, palm oil, total RNA isolation

PENDAHULUAN

Perkebunan dan industri kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan sektor unggulan Indonesia dengan andil yang cukup besar pada ekspor non-migas nasional (Tryfino

2006). Kelapa sawit menghasilkan minyak nabati dengan kuantitas per-unit lahan terbesar (3.622 kg/ha) di antara tanaman penghasil minyak nabati lain, seperti bunga matahari (550 kg/ha), kelapa (395 kg/ha), kedelai (332 kg/ha), dan kapas (173 kg/ha) (Fairhurst dan Mutert 1999).

Minyak yang diperoleh dari mesokarp disebut minyak sawit/ MS, sedangkan minyak yang diperoleh dari biji disebut minyak inti sawit/ MIS (Pasaribu 2004).

Tingginya kandungan polisakarida, pigmen, dan senyawa-senyawa lain dalam jaringan tanaman dapat menyulitkan dalam memperoleh isolat RNA yang utuh (Wang et al. 2004). Mesokarp kelapa sawit mempunyai kandungan polisakarida, polifenol, dan minyak yang cukup tinggi, sehingga tidak mudah untuk memperoleh RNA total yang berkualitas baik. Isolasi RNA total merupakan langkah penting pertama dalam studi molekuler, termasuk konstruksi pustaka cDNA dan ekspresi gen. Aktivitas gen yang tinggi pada jaringan atau sel disebabkan oleh banyaknya jumlah salinan sekuen gen berupa *messenger* RNA (mRNA). *Messenger* RNA dalam isolat RNA total dijadikan sebagai *template reverse transcription* untuk mengubah mRNA menjadi *complementary* DNA (cDNA). Sintesis cDNA melibatkan reaksi enzimatik yang kompleks, sehingga seringkali mempunyai efisiensi hasil rendah dan klonasi cDNA yang dihasilkan tidak lengkap, misalkan tidak mengandung ujung 5' (Yuwono 2006). Menurut Reece (2004), gen lengkap (*full-length gene*) mengandung ujung 5' yang mewakili awal sekuen gen (*downstream*) dan ujung 3' mewakili akhir sekuen gen (*upstream*). Daerah ujung 5' gen mengandung sekuen promotor, sedangkan daerah ujung 3' gen mengandung sekuen terminator dan poli(A). Jika gen lengkap dapat diperoleh, maka dapat dilakukan manipulasi terhadap gen tersebut (Mandal et al. 2000).

Yang et al. (2006) mencoba beberapa metode untuk isolasi RNA pada tanaman *Phaseolus radiatus*, yaitu *cetyltrimethylammonium bromide-borax* (CTAB-*borax*), *guanidine thiocyanate* (GITC), sodium dodesil sulfat (SDS), dan trizol (campuran GITC dan fenol). Metode CTAB, SDS, dan trizol menghasilkan isolat RNA yang terdegradasi. 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 RNAlant, Invitrogen TRIZOL. Metode MRIP yang menggunakan kombinasi reagen *ammonium thiocyanate*, GITC, dan *acidic phenol* menghasilkan RNA dengan integritas yang baik dan dapat digunakan untuk aplikasi Illumina RNA *sequencing* dan *quantitative real-time* RT-PCR. Omidvar et al. (2013) menggunakan total RNA dari buah, daun, dan akar kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) yang diekstraksi menggunakan RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) untuk aplikasi RT-PCR. Penelitian bertujuan untuk mencoba metode isolasi RNA total dengan menggunakan RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) agar diperoleh isolat RNA total dengan kualitas dan kuantitas yang baik untuk digunakan dalam penelitian ekspresi gen.

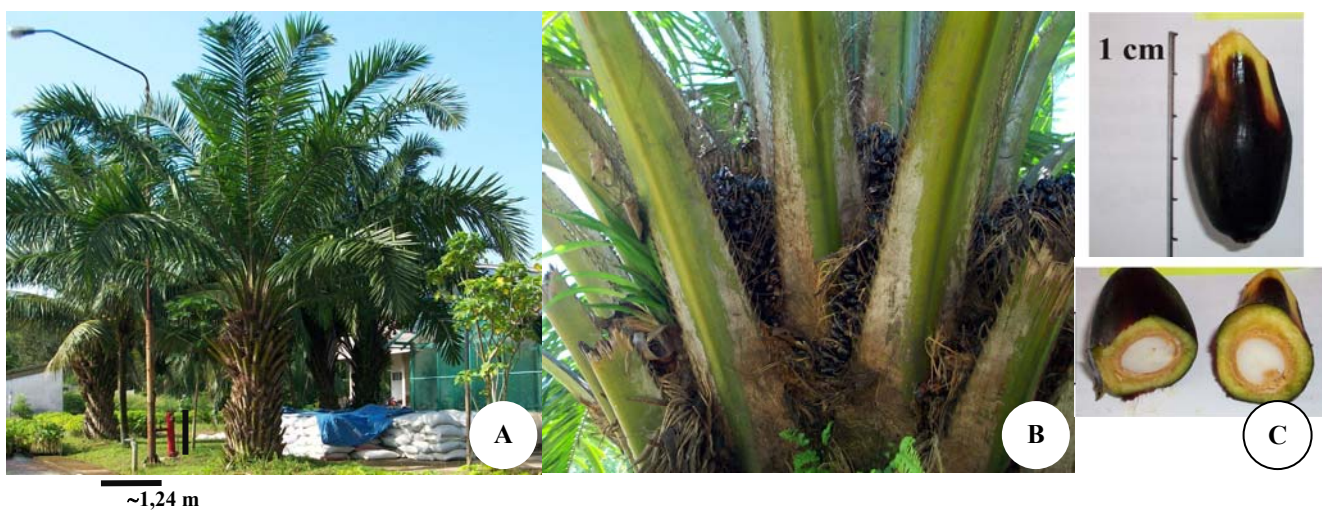
BAHAN DAN METODE

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Genetika, Badan Penelitian dan Pengkajian Teknologi (BPPT), Puspiptek, Serpong, Tangerang Selatan, Banten. Periode penelitian berlangsung selama \pm 1 bulan.

Sampel

Sampel diambil dari tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) yang ditanam di area BPPT-Puspiptek, Serpong (Gambar 1A-B). Kelapa sawit tersebut masih produktif menghasilkan buah dan diduga berumur 6-15 tahun. Sampel adalah buah muda dengan perkiraan umur 6-12 MSA (minggu setelah anthesis) dan memiliki kriteria warna kulit buah hitam dan mesokarp putih kehijauan (Gambar 1C).



Gambar 1. Kelapa sawit yang digunakan dalam penelitian. A. Tanaman kelapa sawit, B. Bagian pelepah daun dan tandan buah, C. Buah kelapa sawit

Cara kerja

Pengambilan sampel

Buah kelapa sawit dipisahkan dari tanaman induk dengan gunting, dimasukkan ke dalam plastik *ziplock*, dan disimpan dalam es. Setibanya di laboratorium, buah dibersihkan dengan disemprot DEPC-treated water dan alkohol 96%. Buah dipotong (2 cm × 3 cm) dan jaringan segera disiram nitrogen cair.

Isolasi RNA total

Ribonucleic acid diisolasi dari mesokarp (daging buah) dengan mengikuti protokol purifikasi RNA total dari *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen 2006). Suhu ruangan dan mesin sentrifugasi diatur 20-25°C. Sebanyak 50-100 mg (\pm 2 cm x 3 cm) mesokarp dipotong-potong kecil dan segera dipindahkan ke mortar yang sudah disiram dengan nitrogen cair. Potongan jaringan digerus dengan sekali-kali disiram nitrogen cair sampai menjadi bubuk halus. Sebanyak 450 μ L *buffer* lisis (RLT, RLC) dan 5 μ L β -merkaptoetanol ditambahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 mL bebas-RNase yang telah didinginkan dengan nitrogen cair. Bubuk sampel dimasukkan ke dalam tabung tersebut dan divorteks dengan kuat. Lisat dipindahkan ke dalam *spin-column* QIAshredder (warna ungu) yang sudah dipasang pada tabung koleksi 2 mL dan disentrifugasi (13.000 rpm; 25°C) selama 2 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 mL yang baru. Sebanyak 250 μ L EtOH absolut ditambahkan. Campuran dihomogenkan dengan *pipetting* (*up-down*). Tabung diinkubasi selama 1-2 menit pada 37°C.

Campuran dipindahkan ke dalam *spin-column* RNeasy (warna merah muda) yang sudah dipasang pada tabung koleksi 1,5 mL dan disentrifugasi (13.000 rpm; 25°C) selama 1 menit. Cairan yang berada di tabung koleksi dibuang. *Spin-column* dipasang kembali pada tabung koleksi. Sebanyak 700 μ L *buffer* RW1 ditambahkan ke dalam *spin-column* RNeasy dan campuran disentrifugasi (13.000 rpm; 25°C) selama 1 menit. Cairan yang berada di tabung koleksi dibuang dan *spin-column* dipasang kembali pada tabung koleksi. Sebanyak 500 μ L *buffer* RPE ditambahkan ke dalam membran *spin-column* RNeasy dan disentrifugasi (13.000 rpm; 25°C) selama 1 menit.

Cairan yang berada di tabung koleksi dibuang dan *spin-column* dipasang kembali pada tabung koleksi. Sebanyak 500 μ L *buffer* RPE ditambahkan ke dalam *spin-column* RNeasy dan campuran disentrifugasi (13.000 rpm; 25°C) selama 2 menit. Cairan yang berada di tabung koleksi dibuang dan *spin-column* dipasang ke dalam tabung koleksi 2 mL yang baru. Sebanyak 30-50 μ L air bebas RNase atau air yang sudah diberi DEPC ditambahkan ke filter membran *spin-column* dan disentrifugasi (13.000 rpm; 25°C) selama 1 menit. *Spin-column* RNeasy dibuang dan tabung koleksi disimpan pada suhu -80°C. Kualitas dan kuantitas hasil isolasi RNA diperkirakan melalui elektroforesis gel agarosa 1% dan pengukuran absorbansi.

Elektroforesis gel agarosa

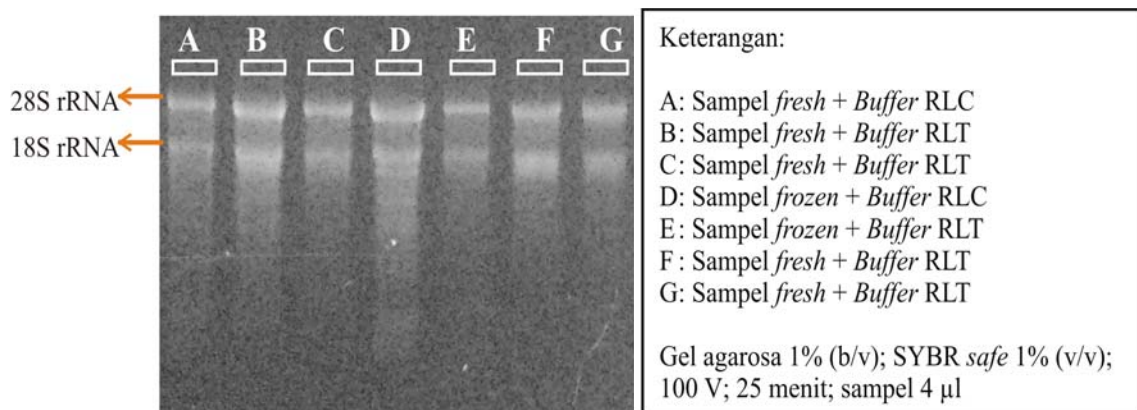
Elektroforesis gel agarosa disiapkan berdasarkan modifikasi Sambrook dan Russell (2001). Konsentrasi 1%

digunakan untuk memeriksa hasil isolasi RNA. Setelah larutan agarosa memadat menjadi gel, sisir dilepaskan dari cetakan dan dipasang pada bak elektroforesis. *Buffer* TAE 1× digunakan untuk merendam gel dalam bak elektroforesis. *Loading mixture* disiapkan dengan mencampurkan *loading dye* 6× dengan 4 μ L isolat RNA di atas kertas parafilm. *Loading mixture* dimasukkan ke dalam masing-masing petak sumur. Sebanyak 3 μ L *marker* DNA *ladder* (1 kb) juga dimasukkan ke dalam petak sumur. Bak elektroforesis ditutup dengan mengatur bagian kutub negatif pada kepala sumur. Mesin elektroforesis dinyalakan. Besar tegangan dan waktu operasi yang digunakan pada penelitian bervariasi antara 80-100 V selama 30-50 menit. Setelah selesai, mesin dimatikan dan gel dikeluarkan. Gel diamati di UV *transilluminator* dalam ruang gelap. Dokumentasi dilakukan dengan kamera yang dihubungkan dengan perangkat komputer. Sinar UV memendarkan pita DNA sehingga dapat ditangkap kamera dan dilihat melalui monitor komputer. Foto visualisasi gel disimpan dalam *hard-disk* komputer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat RNA total diperoleh dari mesokarp kelapa sawit varietas *Tenera-Nigrescens*. Varietas tersebut digunakan sebagai sampel karena diketahui sebagai varietas yang menghasilkan minyak dengan kandungan asam palmitat (asam lemak jenuh) yang tinggi, yaitu 44% dari total asam lemak (Shah et al. 2004). Jaringan daging buah muda digunakan karena belum banyak mengandung minyak. Kandungan minyak pada buah dihindari karena dapat menyulitkan proses isolasi RNA. Buah yang masih muda sedang aktif dalam tahap pembelahan sel yang melibatkan sintesis RNA yang intensif, sehingga diharapkan dapat diperoleh isolat RNA total dalam jumlah banyak. Menurut Farrell (2005), jumlah RNA total dalam sel berkisar $1-5 \times 10^{-5}$ μ g. Sebanyak 80-85% RNA total terdapat dalam bentuk rRNA, 10-15% dalam bentuk tRNA, dan 1-4% dalam bentuk mRNA. Penggunaan isolat RNA total sebagai materi awal mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan menggunakan mRNA, yaitu RNA total mempunyai jumlah per-sel lebih banyak dibandingkan mRNA. Proporsi rRNA yang besar (dalam RNA total) dapat berperan sebagai target RNase sehingga memperlambat digesti nonspesifik spesies mRNA (Invitrogen 2004).

Visualisasi hasil isolasi RNA total melalui elektroforesis gel agarosa menunjukkan dua buah pita (Gambar 3). Menurut Rapley dan Heptinstall (1998), dua pita tersebut kemungkinan menunjukkan RNA ribosomal (rRNA) jenis 18S rRNA dan 28S rRNA yang merupakan komponen terbanyak dalam RNA total. Ketebalan (intensitas) dan ketajaman fluoresensi pita tersebut dapat menunjukkan kualitas isolat RNA total yang baik. Isolat RNA total yang diperoleh dalam penelitian mempunyai kualitas yang cukup baik karena memperlihatkan fluoresensi pita 18S rRNA dan 28S rRNA yang jelas.



Gambar 3. Isolat RNA total dari jaringan mesokarp buah kelapa sawit.

Tabel 1. Hasil pengukuran spektrofotometer isolat RNA total.

Kode sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
A	211,48	2,12	0,79
B	655,27	2,21	1,25
C	240,51	2,12	1,61
D	641,52	2,13	2,12
E	155,59	2,07	1,09
F	190,78	2,10	1,51
G	122,04	2,17	1,34

Hasil elektroforesis menunjukkan perbedaan intensitas fluoresensi dari setiap lajur isolat RNA total yang diperoleh, seperti pada isolat lajur B terhadap lajur E pada Gambar 3. Hal tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan jumlah RNA total yang dimasukkan ke dalam gel. Konsentrasi isolat RNA total lajur B dan E masing-masing adalah 155 dan 655 ng/ μ L. Sebanyak 4 μ L dari masing-masing isolat RNA dimasukkan dalam gel. Dengan demikian, jumlah RNA total dalam gel masing-masing sampel adalah 620 dan 2.620 ng. Menurut Farrell (2005), jumlah RNA total yang dapat dimasukkan ke dalam gel adalah 15.000-20.000 ng. Akan tetapi, jumlah RNA total sebanyak 620-2.620 ng yang diperoleh dalam penelitian telah dapat memberikan visualisasi hasil yang jelas.

Kontaminasi protein pada isolat RNA dapat diketahui dari fluoresensi pada bagian awal gel yang dekat dengan sumur (Bryant dan Manning 1998). Hal tersebut tidak dijumpai pada isolat RNA dalam penelitian, karena isolasi RNA menggunakan *buffer* guanidin yang mempunyai kemampuan denaturasi protein. Menurut Farrell (2005), kemampuan denaturasi protein dapat merubah struktur tersier molekul RNase sehingga menghambat daya rusaknya terhadap RNA. Ada 2 macam *buffer* guanidin dalam RNeasy Plant Mini Kit, yaitu *buffer* RLT (mengandung guanidine tiosianat/GITC) dan *buffer* RLC (mengandung guanidine hidroklorida/GuHCL). Elektroforesis hasil isolasi RNA menggunakan *buffer* RLT (Gambar 3; lajur B, C, E, F dan G) tidak berbeda dengan hasil isolasi dengan *buffer* RLC (Gambar 3; lajur A dan D).

Menurut Qiagen (2006), perbedaan kedua jenis *buffer* tersebut terletak pada kemampuan denaturasi, yaitu *buffer* RLT mempunyai daya denaturasi dan homogenisasi sel yang tinggi dibandingkan *buffer* RLC. Guanidin tiosianat/GITC dapat menonaktifkan enzim RNase, sehingga menghasilkan isolat RNA yang utuh (tidak terdegradasi). Selain itu, GITC juga dapat menghancurkan dan melarutkan sel dengan cepat.

Guanidin tiosianat bekerja dengan melisis membran sel dan membuat RNA larut. Penambahan larutan fenol/kloroform pada larutan guanidin tiosianat dapat membuat pH larutan menjadi asam (pH 4). Pada kondisi asam, protein dan fragmen DNA (50 pb-10.000 pb) akan berada pada fase organik. Fragmen DNA yang lebih besar dan beberapa protein akan tetap berada pada fase interfase, sedangkan RNA berada pada fase cair (Ausubel et al. 2003). Molekul RNA yang terdapat pada fase cair akan terikat pada membran gel-silika yang terdapat pada *spin-column* untuk dilakukan pencucian dan elusi RNA. Prosedur RNeasy Plant Mini dapat mengisolasi semua molekul RNA yang berukuran lebih dari 200 nukleotida, dengan demikian secara langsung dapat meningkatkan diperolehnya isolat mRNA karena molekul RNA yang berukuran kurang dari 200 nukleotida secara selektif akan dibuang.

Smear tipis tampak pada isolat RNA total yang diperoleh dalam penelitian. Menurut Farrell (2005), *smear* dapat menunjukkan komponen RNA seperti mRNA dan tRNA. Komponen mRNA tampak sebagai *smear* karena sedikitnya jumlah mRNA (1-4% dari RNA total) 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 degradasi sampel akibat kontaminasi RNase selama proses isolasi (Bryant dan Manning 1998).

Selain pemeriksaan integritas (keutuhan) isolat RNA melalui elektroforesis gel agarosa, dilakukan juga pemeriksaan kuantitas dengan spektrofotometri. Konsentrasi RNA dapat diketahui dengan mengukur jumlah serapan cahaya (absorbansi) ultraviolet (UV)

sampel pada panjang gelombang (λ) 260 nm (A_{260}). Nilai A_{260} isolat RNA total berkisar 3,05-16,39. Nilai 1 pada A_{260} dari RNA untai-tunggal (*ss*-RNA) mewakili 40 $\mu\text{g/mL}$ RNA. Dengan demikian, konsentrasi isolat RNA total berkisar 122-655 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (Tabel 1).

Keberadaan kontaminan juga dapat diketahui melalui spektrofotometer. Menurut Rapley dan Heptinstall (1998), polisakarida menyerap cahaya UV terbanyak pada λ_{230} nm dan protein pada λ_{280} nm. Tingkat kemurnian RNA dapat diketahui dengan mengukur jumlah absorbansi sampel pada λ_{230} nm, λ_{260} nm, dan λ_{280} nm, kemudian mengukur besar perbandingan (rasio) A_{260} terhadap A_{280} dan rasio A_{260} terhadap A_{230} . Menurut Farrell (2005), isolat RNA murni mempunyai rasio A_{260}/A_{280} sebesar $2,0 \pm 0,1$. Rasio A_{260}/A_{280} yang rendah menunjukkan kontaminasi protein. Rasio A_{260}/A_{280} dari isolat RNA total pada penelitian berkisar 2,07-2,21 (Tabel 1). Isolat tersebut mempunyai kemurnian terhadap protein yang cukup baik.

Rasio A_{260}/A_{230} dari isolat RNA total yang diperoleh berkisar 0,79-2,12 (Tabel 1). Menurut Farrell (2005), isolat RNA murni mempunyai rasio A_{260}/A_{230} sebesar 2,0-2,4. Nilai rasio A_{260}/A_{230} di bawah atau melebihi kisaran 2,0-2,4 dapat disebabkan oleh sisa *buffer* guanidin atau β -merkaptotanol yang terbawa selama proses isolasi RNA. Rasio A_{260}/A_{230} yang rendah juga dapat menunjukkan kontaminasi polisakarida (Rapley dan Heptinstall 1998). Sampel D mempunyai nilai A_{260}/A_{230} yang berada dalam kisaran isolat RNA murni, yaitu 2,12 (Tabel 1). Isolat RNA total yang lain mempunyai nilai A_{260}/A_{230} di bawah kisaran isolat RNA murni, yaitu sampel A, B, C, E, F, dan G (Tabel 1). Menurut Wang dan Young (2003), kemurnian *template* RNA (bebas dari kontaminasi protein, polisakarida maupun DNA) dan integritas RNA (degradasi minimal) merupakan faktor yang sangat memengaruhi keberhasilan sintesis cDNA *full-length*.

Selain isolasi RNA total dari sampel buah segar (*fresh*), dalam penelitian dilakukan pula isolasi dari buah yang dibekukan (*frozen*). Perbandingan hasil elektroforesis isolat RNA total dari sampel *fresh* (Gambar 3 lajur D dan E) dan sampel yang disimpan beku selama 3 bulan (Gambar 3 lajur A, B dan C) tidak memperlihatkan perbedaan pita yang signifikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel *frozen* tidak mengalami perubahan selama proses penyimpanan. Sampel *frozen* dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan dalam *freezer* -80°C . Menurut Corley dan Tinker (2003), suhu nitrogen cair yang rendah (hingga -196°C) dapat menghentikan proses biokimia, seperti degradasi materi genetik oleh aktivitas enzim-enzim yang terdapat dalam sel. Oleh karena itu, materi genetik yang diinginkan (RNA) dapat diperoleh setelah masa penyimpanan.

Degradasi RNA oleh RNase merupakan salah satu masalah utama dalam isolasi RNA. Enzim RNase bersifat stabil karena tidak membutuhkan kofaktor untuk aktivitasnya. Aktivitas RNase yang tinggi dijumpai pada beberapa tipe jaringan dan sel. Enzim tersebut juga dapat berasal dari kontaminasi selama isolasi RNA. Kulit manusia merupakan sumber kontaminasi RNase, sehingga sarung tangan perlu dikenakan setiap menangani peralatan dan bahan yang digunakan. Ruang kerja juga perlu dijaga

sebersih mungkin. Tindakan pencegahan degradasi RNA oleh RNase diperlukan agar diperoleh RNA dengan hasil dan konsentrasi yang baik. Tindakan pencegahan tersebut diantaranya memanaskan peralatan gelas yang akan digunakan pada 250°C selama 4 jam. Pencegahan juga dapat dilakukan dengan merendam peralatan gelas dalam larutan dietilpirokarbonat (DEPC) 0,1% selama 12 jam pada 37°C , kemudian diautoklaf untuk menghilangkan DEPC. Selain DEPC, larutan lain yang dapat digunakan adalah hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% dan campuran NaOH 0,5 N dan SDS 0,5% (Farrell 2005). Pergerakan udara yang dapat mengantarkan debu pada sampel, peralatan, dan bahan kerja perlu dikurangi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Wahyu Purbowasito dan Retno Lestari atas perhatian, ilmu, dan bimbingan selama ini. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada seluruh staf Laboratorium Teknologi, staf Laboratorium *Recovery*, staf Mercian, atas waktu, diskusi, bantuan dan perhatian yang diberikan selama penulis melakukan penelitian. Penelitian ini bisa terselenggara karena proyek riset bersama (*Palm Oil Project*) antara Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Bakrie and Brothers, Co. dan Mitsubishi Chemical, Co.

DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 2003. Current Protocols in Molecular Biology. Volume 1. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Bryant S, Manning DL. 1998. Isolation of messenger RNA. *Methods Mol Biol* 86: 61-64.
- Fairhurst TH, Mutert E. 1999. Introduction to oil palm production. *Better Crops Intl* 13 (1): 3-6.
- Farrell RE. 2005. RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization. 3rd ed. Elsevier Academic Press, Burlington.
- Invitrogen. 2004. Instruction manual: 5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends. Version 2.0. Catalog no. 18374-058. Version E 50327. Invitrogen Corporation, Carlsbad.
- Mandal MNA, Santha IM, Lodha ML, Mehta SL. 2000. Cloning of *acyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase* gene from *Brassica juncea*. *Biochemical Society Transactions* 28 (6): 967-969.
- Omidvar V, Abdullah SNA, Chai LH, Mahmood M. 2013. Isolation and characterization of an ethylene-responsive element binding protein (EgEREBP) from oil palm (*Elaeis guineensis*). *Aust J Crop Sci AJCS* 7 (2): 219-226.
- Pasaribu N. 2004. Minyak Buah Kelapa Sawit. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Qiagen. 2006. RNeasy® mini handbook. 4th ed. Qiagen, Texas.
- Rapley R, Heptinstall J. 1998. UV spectrophotometric analysis of ribonucleic acids. In: Rapley R, Manning DL (eds.). 1998. *Methods in molecular biology*. Vol. 86. RNA: Isolation and characterization protocols. Humana Press Inc., Totowa.
- Reece RJ. 2004. Nucleic Acid Blotting. In: Analysis of Genes and Genomes. John Wiley and Sons Ltd., England.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Vol. 2. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Shah FH, Bhole SJ, Cha TS, Tan CL. 2004. Current status in genetic alteration of fatty acid composition in oil palm. Proceedings of 16th International Plant Lipid Symposiums, 1-4 June 2004, Budapest, Hungary: 84-87.
- Sukariawan A, Purwantoro A, Utomo C. 2006. Isolasi gen palmitoyl-ACP thioesterase pada kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Agrosains* 19 (2): 97-108.

- Tryfino. 2006. Potensi dan prospek industri kelapa sawit. *Econ Rev* 206: 1-7.
- Wahid MB, Abdullah SNA, Henson IE. 2005. Oil palm: Achievement and potential. *Oil Palm Bull* 50: 1-13.
- Wang D, Wang B, Li B, Duan C, Zhang J. 2004. Extraction of total RNA from *Chrysanthemum* containing high levels of phenolic and carbohydrates. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 36:111-114.
- Wang X, Young III WS. 2003. Rapid amplification of cDNA ends. *In: Bartlett, JMS, Stirling D. 2003. Methods in molecular biology. Vol. 226. PCR Protocols. 2nd ed. Humana Press Inc., Totowa.*
- 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 J* 5 (6): 584-589.
- Yang J, Zhang C, Wang Z. 2006. Comparison and improvement of different methods of RNA isolation from *Phaseolus radiatus* L. *Mol Pl Breed* 5: 731-734.
- Yuwono T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Andi Offset, Yogyakarta.