



## ANALISIS KUALITAS DAN KUANTITAS RNA TOTAL VARIETAS KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata* L. Walp) ASAL KABUPATEN MALUKU BARAT DAYA

Ritha Lusian Karuwal

Program Studi Pendidikan Biologi

\*Corresponding author: Ritha Lusian Karuwal; email: karuwalritha8@gmail.com

### Abstract

**Background:** A preliminary study of total RNA isolation from young cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) plant has been carried out. The results of total RNA isolation both qualitatively and quantitatively are a prerequisite for research related to gene expression. This study aims to analyze the quality and quantity of total RNA of cowpea leaves from Southwest Maluku district.

**Methods:** The leaf samples used in this study were from eight varieties of cowpea plants at the age of four weeks after planting. Furthermore, RNA isolation used the Accuzol kit while the quality and quantity analysis was carried out by electrophoresis and spectrophotometry.

**Results:** The results showed that the leaves from the sample collection for 4 weeks had good growth and were followed by total RNA isolation. Qualitatively, the results of the total RNA isolates electrophoresis had 1-3 bands in each variety, while quantitatively the total RNA isolates had absorbance values ranging from 1.50 to 2.03 and total RNA concentrations ranging from 1398.2 to 9884.1 ng /  $\mu$ l.

**Conclusion:** The quality and quantity of total RNA is very important in gene expression analysis.

**Keywords:** total RNA, cowpea, Southwest Maluku

### Abstrak

**Pendahuluan:** Telah dilakukan penelitian studi awal isolasi RNA total dari jaringan daun muda tanaman kacang tunggak (*Vigna unguiculata* L. Walp). Hasil isolasi RNA total yang baik secara kualitatif dan kuantitatif merupakan syarat untuk penelitian yang berkaitan dengan ekspresi gen. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kualitas dan kuantitas RNA total daun kacang tunggak asal kabupaten Maluku Barat Daya.

**Metode:** Sampel daun yang digunakan dalam penelitian ini adalah berasal dari delapan varietas tanaman kacang tunggak pada umur empat minggu setelah ditanam. Selanjutnya isolasi RNA menggunakan kit Accuzol sedangkan analisis kualitas dan kuantitas secara elektroforesis dan spektrofotometri.

**Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun hasil koleksi sampel selama 4 minggu memiliki pertumbuhan yang baik dan dilanjutkan dengan isolasi RNA total. Secara kualitatif, hasil elektroforesis isolat RNA total memiliki 1-3 pita pada tiap varietas sedangkan secara kuantitatif isolat RNA total memiliki nilai absorbansi berkisar 1,50 - 2,03 dan konsentrasi RNA total berkisar 1398,2-9884,1 ng/ $\mu$ l.

**Kesimpulan:** Kualitas dan kuantitas RNA total sangat penting dalam analisis ekspresi gen.

**Kata kunci:** RNA total, Kacang Tunggak, Maluku



## PENDAHULUAN

Setiap makhluk hidup memiliki materi genetik dengan komposisi yang sama yaitu mengandung empat basa yang saling komplemen atau berpasangan dan menimbulkan adanya sifat-sifat yang berbeda baik pada tingkat individu maupun spesies. Hal ini disebabkan adanya suatu mekanisme penting di dalam sel hidup yaitu sintesis protein. Proses ini menghasilkan protein yang bersifat fungsional dan berperan dalam aktivitas kehidupan yakni enzim maupun protein struktural sebagai penyusun struktur tubuh dari makhluk hidup. Dogma sentral kehidupan menjelaskan bahwa DNA ditranskripsikan menjadi RNA dan selanjutnya ditranslasikan menjadi protein. Proses ini juga disebut dengan ekspresi gen yakni proses DNA yang mengarahkan sintesis protein (Campbell *et al.* 2008).

Ekspresi gen tidak diterjemahkan secara langsung dalam bentuk protein tetapi melalui perantara mRNA sebagai pembawa informasi genetik. mRNA merupakan molekul yang diproduksi sebagai bentuk ekspresi dari suatu gen dan mengandung informasi yang akan ditranslasikan untuk membentuk suatu protein (Campbell *et al.* 2008). Setiap tipe sel mampu mengatur ekspresi gen sesuai dengan kebutuhannya (Griffith *et al.* 1996). Enzim yang dihasilkan dari ekspresi gen digunakan untuk proses metabolisme dalam sel. Untuk menganalisis ekspresi gen tersebut diperlukan tahapan teknik isolasi RNA, uji kualitas dan kuantitas RNA hasil isolasi, dan sintesis DNA komplemen (cDNA), serta uji kualitas dan kuantitas cDNA melalui elektroforesis dan spektrofotometri. Apabila hasil uji kualitas dan kuantitas RNA maupun cDNA memenuhi standar 1,8-2 (Darmono *et al.* 2007) maka dapat dilanjutkan dengan reaksi PCR (*Polymeration Chain Reaction*) untuk melihat ekspresi gen yang diinginkan baik *housekeeping gene* maupun *regulatory gene*. Langkah yang

digunakan dalam isolasi RNA adalah membuka jaringan dari bahan yang akan diisolasi. Bahan yang digunakan adalah bahan segar yang tidak terkontaminasi dengan RNA eksogen. Bahan segar yang dapat digunakan adalah daun tanaman yang masih muda diantaranya daun tanaman kacang tunggak (*Vigna unguiculata* L. Walp) yang bersifat menguntungkan baik dari segi fisiologi maupun etnobotani.

Kacang tunggak adalah salah satu jenis tanaman kacang-kacangan lokal yang sudah lama dibudidayakan di Indonesia (Maesen dan Sadikin, 1993). Tanaman ini mempunyai beberapa kelebihan yaitu toleran terhadap kekeringan, hama dan penyakit relatif sedikit, mudah dibudidayakan serta dapat menghasilkan polong sekalipun pada tanah yang berbatu-batu dan rendah unsur hara (Rukmana dan Yuniarsih, 2000). Kacang ini dapat digunakan sebagai bahan pangan, pakan, dan bahan baku industri. Dalam bentuk segar, daun dan polong muda dapat dikonsumsi sebagai sayuran sedangkan biji dikonsumsi sebagai makanan kecil maupun lauk (Bernhardt, 1976 dalam Setyowati dan Sutiri, 2010).

Di kabupaten MBD, kacang tunggak terdiri dari 10 varietas berdasarkan perbedaan warna biji (Polnaya, 2008) dan dibudidayakan oleh masyarakat maupun tumbuh liar serta dimanfaatkan sebagai bahan pangan pelengkap karbohidrat. Keragaman varietas kacang tunggak diekspresikan oleh gen tertentu demikian juga dengan sifat-sifat biologis lainnya seperti toleran terhadap kekeringan maupun karakter unggul dalam hal produksi dan mutu hasil. Dengan demikian, untuk menganalisis ekspresi gen-gen tersebut perlu dilakukan isolasi, uji kualitas dan kuantitas RNA sebagai langkah awal. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menguji kualitas dan kuantitas RNA total daun kacang tunggak.

## **MATERI DAN METODE**

Penelitian dilakukan pada 7 April-Juni 2016 pada Laboratorium BIORIN Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) IPB. Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel daun kacang tunggak, nitrogen cair, kit Accuzol, kloroform, EtOH 80%, DEPC water, agarosa, MOPS, formaldehyde, larutan TAE 1x, etidium bromida, buffer DNase, DNase, EDTA, Iscript mix, Iscript RT, nuclease free water, dH<sub>2</sub>O.

### **Koleksi sampel daun**

Untuk tahapan koleksi sampel, dilakukan penanaman 8 varietas biji kacang tunggak dalam polybag berukuran 30x30 cm (masing-masing varietas ditanam 2 biji). Sampel biji 10 varietas kacang tunggak (KM1, KM3, KM4, KM6, KM7, KM8, KM9, KM10) diseleksi dari para petani di Pulau Seramatang Kabupaten Maluku Barat Daya. Daun muda dari tanaman kacang tunggak yang berumur 4 minggu diambil untuk diisolasi dengan cara digunting menggunakan gunting yang telah disterilkan dengan alkohol, dimasukkan di dalam kantong plastik klip dan disimpan dalam *cool box*.

### **Isolasi RNA total**

Isolasi RNA mengikuti prosedur kit Accuzol. Sampel daun kacang tunggak digerus dalam mortar dengan menggunakan pestel sambil ditambahkan nitrogen cair sehingga menjadi serbuk dan dimasukkan dalam tabung eppendorf 1.5 ml yang telah diberi label per varietas. Kemudian ditambahkan 1 ml Accuzol dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Campuran ditambahkan dengan 200 µl kloroform dan dihomogenkan dengan cara dibolak-balik kemudian diinkubasi dalam es selama 3 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm pada 4 °C selama 15 menit. Supernatan dari hasil sentrifugasi diambil dan dimasukkan dalam tabung eppendorf yang baru dan ditambahkan

isopropanol (1x volume supernatan) kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi lagi dengan kecepatan 12000 rpm pada 4 °C selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang sedangkan peletnya ditambahkan dengan 1 ml EtOH 80 % dan dibolak-balik kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm pada 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dalam *vaccum dryer* selama 20 menit kemudian ditambahkan 30 µl DEPC water 0.1 %. Selanjutnya hasil isolasi disimpan dalam freezer.

### **Kualitas dan kuantitas RNA total**

Untuk mengecek kualitas dan kuantitas RNA total dilakukan elektroforesis pada gel agarosa 1 % dan spektrofotometer nanodrop pada panjang gelombang 260/280 nm dengan faktor pengenceran 40 kali. Elektroforesis gel agarosa dilakukan dengan cara membuat gel dengan menggunakan agarosa 0.25 mg dan MOPS 1.25 µl dan DEPC 0.1 % 22.5 µl dan dimasak dalam microwave selama 2 menit. Setelah itu, campuran yang telah dimasak dimasukkan ke dalam cetakan menggunakan sumuran yang besar dan ditambahkan formaldehyde 1.35 µl. Selanjutnya gel yang terbentuk dimasukkan dalam bak elektroforator yang telah berisi larutan MOPS 1x dengan terlebih dulu memindahkan sumuran dari cetakan. RNA hasil isolasi tiap sampel dimasukkan dalam gel sebanyak 3 µl ditambahkan 4.5 µl (2.5 µl 20x MOPS, 8.75 µl formaldehyde, 25 µl formamide, 13.75 µl DEPC 0.1 %) dan dirunning selama 28 menit. Hasil running direndam dalam EtBr selama 15 menit untuk pewarnaan dan divisualisasi di bawah UV transiluminator GelDoc (Labquip) dan difoto. Nanodrop RNA dilakukan dengan cara 2 µl diukur pada spektrometer.

### Sintesis cDNA total

Sebelum dilakukan sintesis cDNA, RNA total diencerkan berdasarkan hasil konsentrasi dari nanodrop dengan menambahkan DEPC water sesuai hasil perhitungan pengenceran. Selanjutnya dilakukan perlakuan DNase. Untuk perlakuan DNase dilakukan dengan cara memasukkan 2.5  $\mu$ l DEPC water dalam 7.5  $\mu$ l RNA yang telah diencerkan sebelumnya dalam tabung eppendorf 0.2  $\mu$ l kemudian dihomogenkan dengan cara dispin. Selanjutnya ditambahkan mix 1.1  $\mu$ l buffer DNase dengan 0.2  $\mu$ l DNase kemudian diinkubasi pada suhu 25 °C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 1  $\mu$ l EDTA kemudian diinkubasi pada heat shock suhu 65 °C selama 10 menit dan selanjutnya diinkubasi lagi di es selama 3 menit. Hasil perlakuan tersebut dispin dan disimpan untuk digunakan dalam sintesis cDNA. Sintesis cDNA dilakukan dengan komposisi mix terlebih dahulu 2  $\mu$ l 5x Iscript mix, 0.5  $\mu$ l Iscript RT, dan 2.5  $\mu$ l nuclease free water. Selanjutnya campuran dihomogenkan dan ditambahkan 5  $\mu$ l RNA template sehingga volume menjadi 10  $\mu$ l. Setelah itu, dilakukan reaksi reverse transkripsi menggunakan mesin PCR dengan reaksi 25 °C (5 menit), 42 °C (30 detik), 85 °C (5 menit), 4 °C (optional).

### Kualitas dan kuantitas cDNA total

Kualitas dan kuantitas cDNA dilakukan menggunakan nanodrop pada panjang gelombang 260/280 nm dengan faktor pengenceran 50 kali. Prinsipnya sama dengan RNA.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Koleksi sampel

Dalam penelitian ini sebelum dilakukan isolasi RNA, telah dilakukan koleksi sampel daun yang diperoleh dengan menanam biji kacang tunggak selama 4 minggu. Setelah dilakukan penanaman, pada minggu keempat

pengamatan, pertumbuhan tanaman sangat baik (Gambar 1).



**Gambar 2. Hasil pengamatan pertumbuhan tanaman kacang tunggak**

### Isolasi RNA

RNA sebagai materi genetik merupakan hasil transkripsi DNA dan ditranslasikan menjadi protein untuk proses metabolisme yang berlangsung di dalam sel. Protein dapat berupa protein fungsional yaitu enzim, dan juga protein struktural yaitu protein yang menyusun struktur tubuh makhluk hidup (Campbell *et al.* 2008). Untuk mempelajari sintesis protein yang merupakan produk dari ekspresi gen, maka materi genetik harus diisolasi. Isolasi materi genetik adalah proses mengekstrak atau memisahkan dari sel yang mengandung berbagai komponen seperti plasma sel, organel sel, membran sel, dan dinding sel. Tahapan dalam isolasi RNA terdiri atas pemecahan sel, isolasi dan pemurnian RNA, dan presipitasi RNA.

Dalam penelitian ini, RNA diisolasi menggunakan metode Accuzol yang disesuaikan dengan prosedur dari perusahaan. Sampel daun dihaluskan dengan penambahan nitrogen cair untuk membentuk serbuk. Nitrogen cair digunakan untuk membekukan jaringan sehingga mudah untuk dihancurkan dan pada suhu dingin agar menjaga RNase dalam kondisi tidak aktif. Accuzol sebagai buffer pelisis supaya RNA dapat diisolasi. Untuk menghilangkan RNA dari kontaminan lain seperti protein dan DNA, digunakan kloroform. Isopropanol digunakan untuk visualisasi RNA sedangkan etanol digunakan untuk presipitasi RNA. Inkubasi dalam suhu ruang dilakukan

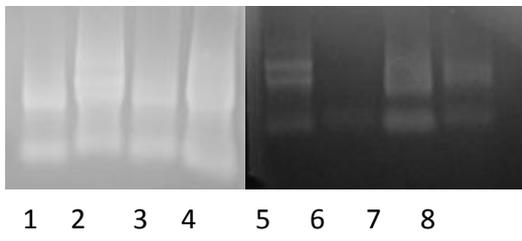
untuk mengaktifkan enzim yang melisiskan bagian sel atau untuk optimalisasi kerja buffer sedangkan pendinginan untuk menghentikan kerja enzim secara optimal. Sentrifugasi dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan RNA dari kontaminan berdasarkan kecepatan rotasi pada waktu tertentu untuk memperoleh supernatan dan pelet yang merupakan RNA total. Adapun hasil isolasi RNA total pada Gambar 2.

Dari Gambar 2, dapat dilihat bahwa RNA yang dihasilkan berwarna putih pada kedelapan varietas yang diisolasi. Hal ini menunjukkan kemurnian DNA yang bebas dari kontaminan protein dan DNA.



**Gambar 2. Hasil isolasi RNA total**

Selanjutnya kualitas dan kuantitas DNA dicek dengan menggunakan elektroforesis dan spektrofotometer. Elektroforesis pada gel agarosa yang dapat memisahkan RNA. Pewarnaan dengan etidium bromida menyebabkan pemendaran di bawah sinar ultraviolet dan memperlihatkan pita. Hasil elektroforesis RNA delapan sampel daun kacang tunggak pada Gambar 3.



**Gambar 3. Hasil elektroforesis RNA total sampel daun kacang tunggak**  
Keterangan: 1-8 = Nomor sampel daun berdasarkan varietas

Dari Gambar 3, terlihat bahwa RNA dari sampel daun kacang tunggak

berhasil diisolasi. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pita pada tiap varietas dengan integritas yang baik. Farrel (1993) menyatakan bahwa pita yang terbentuk dalam gel agarosa merupakan rRNA yang berukuran 28S dan 18S. Dengan demikian, hasil isolasi RNA dikatakan baik apabila ada 2 pita yang dihasilkan yang merupakan rRNA utama dalam sitoplasma tanaman dan memiliki ukuran yang besar dan pada saat dimigrasikan akan tampak jelas. Pada umumnya semua sampel menghasilkan 2 pita kecuali pada sampel no 5 yang menghasilkan 3 pita dan sampel no 6 yang menghasilkan 1 pita.

Hasil pengukuran dengan spektrofotometer seperti pada Tabel 1. Konsentrasi RNA yang diperoleh berkisar antara 1398,2-9884,1 ng/μl. Menurut Sambrook *et al.* (1989), nilai konsentrasi tersebut diperoleh dari perkalian nilai absorban dengan faktor pengenceran dan 40 μg/ml. Untuk kemurnian RNA, diperoleh nilai dengan kisaran 1,50-2,03. Hasil RNA yang murni adalah jika memiliki nilai A260/280 1,8-2,0 (Sambrook *et al.* 1989). Nilai rasio 260/280 menunjukkan bahwa RNA tersebut bebas dari kontaminan protein dan dapat digunakan untuk percobaan berikutnya. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa umumnya RNA sampel yang diisolasi memiliki nilai rasio A260/280 antara 1,8-2,0 kecuali pada sampel no 2 dan 6 yaitu sebesar 1,69 dan 1,50. Hal ini dapat disebabkan hasil isolasi masih terkontaminasi dengan senyawa yang lain.

**Tabel 1. Hasil pengukuran RNA dengan spektrofotometer**

Ko	Konsen	A260	A280	260/280	260/230
de	trasi				
	(ng/μl)				
R1	5578,4	139,459	69,757	2,00	0,66

R2	2523,0	63,075	37,429	1,69
R3	2235,5	55,888	29,775	1,88
R4	9884,1	247,103	124,849	1,98
R5	4165,7	104,143	51,310	2,03
R6	3161,8	79,045	52,671	1,50
R7	2976,5	74,414	37,553	1,98
R8	1398,2	34,954	18,558	1,88

**SIMPULAN**

Tahapan dalam ekspresi gen adalah isolasi RNA, sintesis cDNA, dan optimasi PCR. Konsentrasi RNA, cDNA, dan suhu anealing primer sangat menentukan dalam keberhasilan reaksi PCR untuk dilanjutkan dengan analisis ekspresi gen.

**DAFTAR PUSTAKA**

Campbell N, Reece JB, Mitchell LG. 2008 Biologi jilid I. Erlangga. Jakarta

Dalle JW. 1994. Molecular Genetic of Bacteria. John Wiley and Sons. England.

Farrel RE. 1993. RNA Metodologies. A laboratory guide for characterization. Academic Press. USA

Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL. 2007. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. Hum. Reprod. Update. 13:25-238.

Griffith AJS, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RJ, Gelbart WM. 1996. An Introduction to Genetic Analysis Ed ke-6. W.H. Freeman and Company. New York.

Hall AE, Cisse N, Thiaw S, Elawad HOA, Ehlers JD, Ismail A, Ferry R, Roberts P, Kitch LW, Murdock LL, Boukar O, Phillips RD, McWatters KH. 2003. Development of cowpea cultivars and germplasm by the bean/cowpea CRSP. Field Crops Res. 82:103-134.

Maesen VD, Sadikin. 1993. Proses kacang-kacangan Asia Tenggara I. Jakarta. Gramedia.

Mcintosh SR, Henry RJ. 2008. Genes of folate biosynthesis in wheat. J. Cereal Sci. 48:632-638.

Polnaya F. 2008. Eksplorasi dan karakterisasi plasma nutfah kacang tunggak (*Vigna unguiculata*, L. Walp.) di pulau

**Sintesis cDNA**

cDNA merupakan DNA yang berkomplemen dengan mRNA (Dale, 1994). cDNA disintesis untuk digunakan sebagai cetakan dalam amplifikasi reaksi PCR. Sintesis cDNA dilakukan melalui proses reverse transkripsi menggunakan kit Iscript. Dalam penelitian ini, hanya dilakukan sintesis cDNA pada dua sampel yaitu R7 dengan konsentrasi RNA total 2976.5 ng/µl dan kemurnian 1,98 dan R8 dengan konsentrasi 1398,2 ng/µl dan kemurnian 1,88. Hasil pengukuran kuantitatif menggunakan spektrofotometer pada cDNA adalah Tabel 2. Dari hasil cDNA selanjutnya dapat digunakan untuk optimasi PCR.

**Tabel 2. Hasil pengukuran cDNA dengan spektrofotometer**

Kode	Konsentrasi (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
R7	1641,3	32,827	18,041	1,82	1,81
R7	1641,8	32,835	18,145	1,81	1,80
R8	1690,8	33,816	18,858	1,79	1,28
R8	1698,6	33,971	18,873	1,80	1,28

- Lakor. Jurnal Budidaya Pertanian  
4(2):115-121.
- Rukmana R, Yuniarsih. 2000. Kacang  
Tunggak Budidaya dan Prospek  
Usaha Tani. Yogyakarta.  
Kanisius.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.  
1989. Molecular Cloning a  
Laboratory Manual (2nd ed). Cold  
spring harbor lab press. USA.
- Sen Gupta D, Thavarajah D,  
Thavarajah P, McGee R, Coyne  
CJ, Kumar S. 2013. Lentils (*Lens  
culinaris* L.), a rich source of  
folates. *J. Agric. Food Chem.* 61:  
7794-7799.
- Setyowati M, Sutoro, 2010. Evaluasi  
plasma nutfah kacang tunggak  
(*Vigna unguiculata* L.) di lahan  
masam. *Buletin Plasma Nutfah.*  
16(1):44-48.