

## PERBANDINGAN METODE EKSTRAKSI *RIBO NUCLEIC ACID* YANG BERBEDA PADA JARINGAN MANTEL KERANG BIRU (*Mytilus edulis*)

Anna Rejeki Simbolon

Pusat Riset Oseanografi, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jakarta

(Naskah diterima: 26 September 2023; Revisi final: 28 Desember 2023; Disetujui publikasi: 7 Februari 2024)

### ABSTRAK

Kerang biru (*Mytilus edulis*) merupakan salah satu sentinel spesies yang dapat bertahan hidup di berbagai kondisi lingkungan, bahkan di daerah dengan tekanan tinggi, namun kemampuan fisiologisnya masih belum banyak diketahui hingga saat ini. Regulasi fisiologis hewan dapat diketahui dengan mengetahui karakteristik genotip hewan melalui analisis genomik. Salah satu tahap yang diperlukan dalam analisis genomik adalah ekstraksi RNA. Perolehan kualitas dan kuantitas RNA yang baik merupakan langkah awal yang penting untuk analisis genomik selanjutnya. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan metode ekstraksi RNA yang berbeda pada jaringan mantel kerang biru agar dapat dihasilkan kualitas dan kuantitas RNA yang baik untuk analisis genomik. Dua metode ekstraksi RNA yaitu menggunakan RNAqueous Phenol-free total RNA Isolation dan TRIzol™ Reagent. Data berupa hasil deskriptif dan kuantitatif, RNA yang telah berhasil diekstraksi dinilai kualitas dan kuantitasnya dengan menggunakan alat Agilent 5300 Fragment Analyzer. Penggunaan RNAqueous Phenol-free total RNA Isolation dalam mengekstraksi jaringan mantel kerang biru tidak dapat dilakukan dengan baik. Penggunaan metode ekstraksi RNA dengan Kit TRIzol™ Reagent menghasilkan ekstrak RNA jaringan mantel kerang biru dengan nilai konsentrasi total RNA berkisar 48,91-392,38 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , nilai *RNA Quality Number* (RQN) berkisar 7,6-9,6 dan rasio 28S:18S berkisar 0-3,5. Metode TRIzol™ Reagent kit memiliki efektifitas lebih baik dalam menghasilkan ekstrak RNA pada jaringan mantel kerang biru dengan kualitas dan kuantitas RNA yang baik.

**KATA KUNCI:** 28S:18S; ekstraksi RNA; kerang Biru (*Mytilus edulis*); konsentrasi RNA; RQN

**ABSTRACT:** *Comparison of Different Extraction Methods of Mantle Tissue's Ribo Nucleic Acid of Blue Mussel (Mytilus edulis)*

*The blue mussel (Mytilus edulis) is a sentinel species that can survive in various environmental conditions, even in high pressure areas, but its physiological abilities has not been widely known. Marine physiological regulation can be known by knowing the characteristics of the biota genotype through genomic analysis. One of the steps required in genomic analysis is RNA extraction. Obtaining good quality and quantity of RNA is an important first step for further genomic analysis. This study aimed to compare different RNA extraction methods in blue mussel mantle tissue, so that it is expected to produce good RNA for genomic analysis. Two RNA extraction methods used were RNAqueous Phenol-free total RNA Isolation and*

---

#Korespondensi: Pusat Riset Oseanografi, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jakarta  
Email: [annarejekisimbolon@gmail.com](mailto:annarejekisimbolon@gmail.com)

*TRIzol™. Reagents. The data were in the form of descriptive and quantitative results, the quality and quantity of RNA that has been successfully extracted is assessed using the Agilent 5300 Fragment Analyzer. The use of RNAqueous Phenol-free total RNA Isolation in extracting mantle tissue of blue mussel cannot be carried out well. The use of the RNA extraction method with the TRIzol™ Reagent Kit produced RNA extract of blue mussel mantle tissue with total RNA concentration values ranging from 48,91-392,38 ng mL<sup>-1</sup>, RNA quality number (RQN) ranging from 7.6-9.6 and ratio of 28S:18S ranging from 0-3.5. The TRIzol™ Reagent kit method had better effectiveness in producing RNA extract from blue mussel mantle tissue with good quality and quantity of RNA.*

**KEYWORDS:** 28S:18S; blue mussel (*Mytilus edulis*); RNA concentration; RNA extraction; RQNs

## PENDAHULUAN

Ekstraksi *ribo nucleic acid* (RNA) merupakan salah satu langkah awal dalam penelitian bidang biologi molekuler. Tahap ini sangat penting dilakukan karena keberhasilan ekstraksi RNA akan menghasilkan kualitas dan kuantitas RNA yang baik sehingga tahap molekuler selanjutnya dapat dilakukan. Ekstraksi RNA umumnya digunakan pada penelitian ekspresi gen seperti menggunakan metode *quantitative real time* PCR (RT-qPCR), analisis *northern blot*, analisis transkriptomik dengan menggunakan alat *next generation sequencing* (NGS) dan analisis ekspresi gen lainnya (Fleige *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006; Kiewi *et al.*, 2009; Gayral *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2017). Analisis transkriptomik dapat digunakan untuk mengetahui hasil ekspresi gen dari organisme yang diteliti sehingga profil atau karakteristik gen pada organisme dapat diketahui secara menyeluruh.

Pada umumnya, ekstraksi RNA dengan metode konvensional menghasilkan kuantitas RNA yang banyak, namun dengan tingkat kontaminasi DNA yang tinggi dan waktu pengerjaan yang lama. Sementara itu, metode kit komersial menghasilkan kuantitas RNA yang cukup dengan kualitas yang baik dengan waktu singkat sehingga ekstraksi RNA dengan metode kit komersial lebih sering digunakan oleh para peneliti (Habib *et al.*, 2014). Metode ini berbasis pada fenol

atau kloroform dan spin kolom. Penggunaan fenol atau kloroform menghasilkan kuantitas RNA yang lebih banyak dibandingkan spin kolom, namun penggunaan spin kolom menghasilkan kualitas RNA yang lebih baik (Tesena *et al.*, 2017). Kuantitas RNA dapat dinilai dengan melihat konsentrasi total RNA yang diperoleh. Total RNA terdiri dari mRNA (*messenger* RNA), tRNA (*transfer* RNA) dan rRNA (*ribosomal* RNA) dan 80% dari total RNA terdiri dari rRNA. Mayoritas rRNA terdiri dari rRNA 25S dan 18S. rRNA-25S bersifat lebih labil dan mudah terdegradasi dibandingkan rRNA-18S. Apabila jumlah basa nukleotida 25S menurun karena terjadi degradasi, maka rasio 25S:18S akan menurun pula. Hal ini menyebabkan kualitas RNA dapat dinilai dengan melihat rasio 25S:18S. Semakin rendah rasio 25S:18S, semakin rendah kualitas RNA (Zulaeha *et al.*, 2019). Tingkat kontaminasi sampel dapat dinilai dengan melihat rasio absorbansi sampel pada panjang gelombang A260:A280, pada A260 menunjukkan kontaminasi asam nukleat dan A280 kontaminasi protein serta kontaminan lain. Rasio RNA  $\geq 1,8$  dinilai baik dan dapat dilanjutkan untuk tahap *sequencing* (Becker *et al.*, 2010).

Indonesia merupakan negara dengan tingkat biodiversitas flora dan fauna yang tinggi, namun penelitian transkriptomik di Indonesia belum banyak dilakukan. Zulaeha *et al.* (2019) melakukan uji ekstraksi RNA pada tanaman kelapa sawit dan menunjukkan kit Ribospin™ (Geneall)

menghasilkan kualitas RNA yang baik. Adiputra *et al.* (2013) merekomendasikan metode Wylie dan Randes dalam preparasi RNA dari benih tanaman caisin. Sebagai negara dengan biodiversitas laut yang tinggi, kajian genomik sangat diperlukan, misal transkriptomik dan ekspresi gen pada biota laut yang belum banyak dilakukan.

Kerang biru (*Mytilus edulis*) merupakan salah satu biota laut yang dapat dikonsumsi oleh manusia (bahan pangan). Biota ini memiliki kandungan gizi yang tinggi seperti vitamin B12, selenium (Se), mangan (Mn), zinc (Zn), dan zat besi (Fe). Budidaya kerang biru meningkat tiap tahunnya dikarenakan permintaan yang terus meningkat secara global (FAO, 2018). Budidaya kerang biru umumnya dilakukan di sekitar pantai menggunakan rakit, tiang pancang, dan sistem rawai (Gosling, 2022). Namun budidaya kerang ini terkendala karena perubahan iklim, perubahan lingkungan yang berfluktuasi hingga pencemaran lingkungan. Beberapa penelitian menunjukkan kemampuan adaptif kerang yang tinggi terkait dengan fitur metabolik dan genetik spesifik yang memberikan ketahanan yang lebih baik terhadap kondisi stres dan kerentanan yang lebih rendah terhadap kematian pada musim panas (Guillou *et al.*, 2020).

Sebagai salah satu moluska yang dapat hidup di berbagai wilayah perairan dunia (komersial), kerang biru diketahui hidup di sepanjang Samudera Indo Pasifik, hingga Atlantik. Sifatnya yang *filter feeder*, *benthic* (hidup di dasar substrat), menjadikan hewan ini sering digunakan sebagai sentinel spesies dalam mengetahui status pencemaran suatu perairan (Walker, 2013; Simbolon, 2018). Kemampuan moluska dalam bertahan hidup di berbagai kondisi lingkungan bahkan di daerah dengan tekanan tinggi masih belum jelas hingga saat ini (Zhang *et al.*, 2022). Kualitas dan kuantitas RNA yang baik merupakan tahap awal yang penting sehingga analisis genomik lebih lanjut dapat dilakukan untuk mengungkap fenomena kejadian ketahanan moluska untuk dapat hidup di daerah dengan cekaman lingkungan yang tinggi.

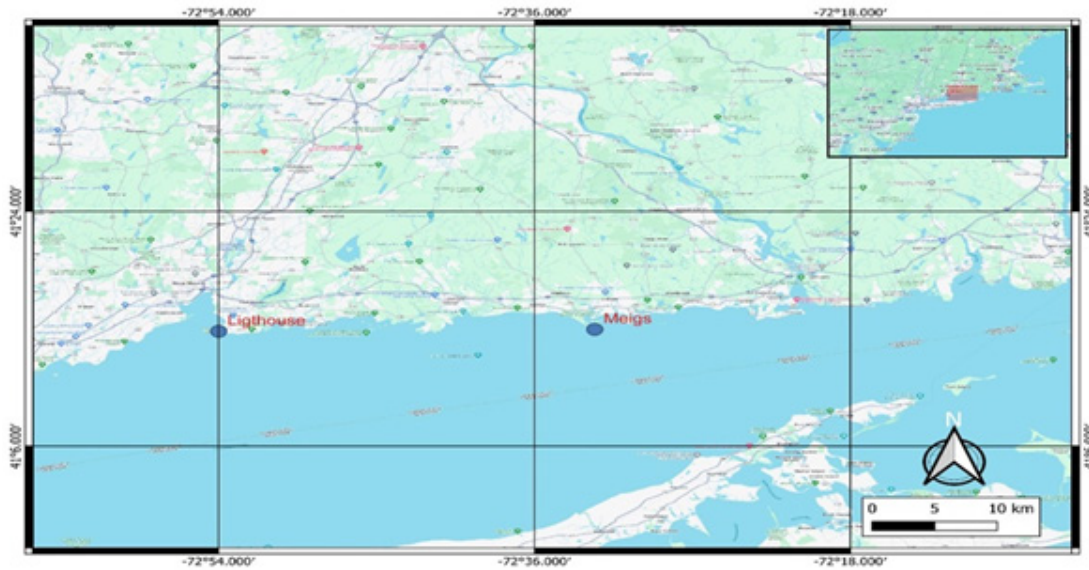
Diskusi mengenai metode yang tepat dalam mengekstraksi asam nukleat termasuk RNA pada moluska masih menjadi permasalahan yang hingga kini tetap terus diteliti (Adema, 2020). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode yang tepat dalam ekstraksi RNA pada mantel kerang biru. Prosedur ekstraksi RNA yang tepat akan menghasilkan kualitas dan kuantitas RNA yang baik, sehingga tahap lanjutan dari analisis genomik dapat dilakukan dengan baik.

## BAHAN DAN METODE

### Pengambilan Sampel

Kerang biru dikoleksi dari perairan Long Island Sound, New Haven, Connecticut USA (Gambar 1). Sebanyak empat individu kerang biru masing-masing dikoleksi dari dua lokasi yaitu Meigs Point (41°14' 57" N 72°32' 34" W) dan Lighthouse Point (41°14' 48" N 72°53' 60" W). Kerang biru dikoleksi pada saat pantai dalam keadaan surut di pagi hari (09.00 am), sehingga langsung mengambilnya pada celah batu dan bersembunyi pada rumput laut. Kerang biru dimasukkan dalam *cool box* berisi air laut bersih dengan suhu 4°C, kemudian segera dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pembedahan pada bagian mantel. Prosedur pembedahan dilakukan secara aseptik, ± 100 mg jaringan mantel kerang biru dimasukkan ke dalam *microtube* 2 mL dan dimasukkan ke *freezer* suhu -80°C untuk dilakukan ekstraksi RNA.

Delapan kerang biru (MST1a, MST1b, MST1c, MST1d, MST2a, MST2b, MST2c, dan MST2d) yang diperoleh selama penelitian, dibersihkan dengan air terdestilasi dan dilakukan pengukuran panjang dan diameter cangkang seperti disajikan pada Gambar 2. Kerang biru kemudian dibuka cangkangnya dan dilakukan pembedahan secara aseptik untuk pengambilan jaringan mantel seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Sampel MST1a, MST1b, MST2a, dan MST2b digunakan untuk ekstraksi RNA menggunakan metode RNAqueous kit, sementara itu sampel MST1c, MST1d, MST2c, dan MST2d digunakan untuk ekstraksi RNA menggunakan metode kit TRIzol™ Reagent.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel kerang biru di Perairan Long Island Sound, New Haven, Connecticut, Amerika Serikat

Figure 1. Sampling location for blue mussels in Long Island Sound, New Haven, Connecticut, United States



Gambar 2. Pengukuran panjang dan diameter cangkang kerang biru yang diperoleh saat penelitian  
Figure 2. Measurement of the length and diameter of blue mussel shells obtained during the research



Gambar 3. Anatomi bagian dalam kerang biru untuk dilakukan pembedahan pada jaringan mantel  
Figure 3. Internal anatomy of blue mussels for dissection in the mantle tissue

### Ekstraksi Ribo Nucleic Acid

Metode ekstraksi RNA pertama menggunakan RNAqueous Phenol-free total RNA Isolation (Invitrogen Thermo Fisher Scientific Cat. No. AM1931). Prosedur ekstraksi RNA kedua menggunakan TRIzol™ Reagent (Invitrogen Cat. No.15596026). Ekstraksi RNA dilakukan pada empat sampel jaringan mantel kerang biru sesuai dengan masing-masing prosedur dan dibandingkan hasilnya. Tahap utama ekstraksi RNA antara lain: Proses lisis jaringan untuk isolasi RNA (RNA lysis), pengikatan pada filter (*filter binding*), pencucian (*washing*), dan elusi RNA (RNA elution).

#### Isolasi Total Ribo Nucleic Acid dengan Kit RNAqueous Phenol-Free

Metode ekstraksi RNA pertama menggunakan RNAqueous Phenol-free total RNA Isolation dengan Catalog Number AM1931. Secara singkat prosedur ini menghomogenkan ± 100 mg sampel mantel kerang biru dengan larutan *lysis*, diikuti langkah sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm untuk memisahkan sisa serpihan mantel dan supernatan. Supernatan dimasukkan dalam spin kolom dan dicampur ethanol 64%, kemudian disentrifugasi kembali. Larutan dicuci dua kali dengan *washing solution* dan diakhiri dengan pemberian 40 µl *elution solution* dan disentrifugasi 1500 rpm selama 3 menit.

#### Isolasi Total Ribo Nucleic Acid dengan Kit TRIzol™ Reagent

Metode ekstraksi RNA kedua menggunakan TRIzol™ Reagent Invitrogen dengan Catalog Number 15596026. Kit ini berbasis pada penggunaan kloroform sehingga ekstraksi RNA harus dilakukan pada *fume hood*. Proses *lysis* dilakukan dengan menghomogenkan 100 mg sampel mantel kerang biru pada 1 mL TRIzol™ Reagent dan kloroform. Sampel diinkubasi selama 2-3 menit dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 15 menit, hasil sentrifugasi akan memisahkan dua bagian cairan *interphase* (bagian bawah) dan cairan bening (bagian

atas). Bagian atas dipindahkan ke *microtube* kemudian dimasukkan 500 µl isopropanol dan diinkubasi selama 10 menit serta disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit. RNA hasil presipitasi terlihat seperti *pellet* berwarna putih di bagian bawah *tube*. *Pellet* RNA dimasukkan RNase-free water 50 µl dan dihomogenkan dengan teknik *pipetting*.

### Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan kuantitatif antara lain gambar *gel* elektroforesis, *electrogram*, nilai RQN (RNA quality number), dan total konsentrasi RNA serta rasio 28S:18S dalam membandingkan prosedur yang berbeda dalam proses ekstraksi total RNA. RNA yang telah berhasil diekstraksi dilakukan analisis kualitas dan kuantitas RNA secara menyeluruh dengan menggunakan Agilent 5300 Fragment Analyzer.

### HASIL DAN BAHASAN

Kerang biru merupakan kelompok moluska dari kelas Bivalvia. Hewan ini memiliki kemampuan adaptasi baik bahkan di lingkungan dengan tekanan yang tinggi. Kemampuannya dalam bertahan hidup dipengaruhi oleh kondisi fisiologis dan perkembangan reproduksi yang berkorelasi pada fungsi genetik dan faktor lingkungan (Seed, 1976). Mantel merupakan bagian anatomi dengan sistem organ yang kompleks. Organ ini terdiri dari jaringan ikat, komponen syaraf, dan kelenjar yang sebagian besar terhubung dengan sekresi cangkang dan reproduksi (Anantharaman & Craft, 2012; Yarra *et al.*, 2016). Pendekatan genomik seperti transkriptomik telah digunakan untuk mengetahui proses fisiologi Bivalvia seperti karakteristik gen yang terlibat dalam proses adaptasi dan respons Bivalvia terhadap kondisi lingkungan yang sangat bervariasi (Lesser & Macmanes, 2016). Kualitas dan kuantitas RNA yang baik menjadi kunci dalam analisis genomik lebih lanjut, misal transkriptomik, ekspresi gen, dan sebagainya.

Metode ekstraksi RNA pertama menggunakan metode RNAqueos kit. Metode ini tidak dapat dilakukan hingga akhir. Pada proses *filter binding* (pengikatan pada *filter spin column*) terjadi penyumbatan pada *filter cartridge* (Gambar 4). Setelah dilakukan sentrifugasi ulang pada kecepatan 15.000 rpm selama 3 menit, penyumbatan tetap terjadi, sehingga prosedur selanjutnya tidak dapat dilakukan. Penggunaan Kit RNAqueous Phenol-free dalam mengekstraksi RNA pada kerang biru tidak dapat dilanjutkan dikarenakan terjadi penyumbatan (*clogged*) pada tahap *filter binding*. Penyumbatan pada proses ekstraksi RNA dapat terjadi karena proses homogenisasi yang kurang baik. Penggunaan strategi homegenisasi yang terintegrasi seperti peningkatan suhu inkubasi dan penggunaan *rotor-stator* dalam penggilingan jaringan dalam nitrogen cair pada tahap awal terbukti memaksimalkan konsentrasi RNA. Penggunaan RNAeasy kit pada jaringan otot tikus menghasilkan ekstrak RNA yang tidak konsisten dan jarang memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut (Kemfack *et al.*, 2022). Metode ekstraksi RNA yang tepat menjadi

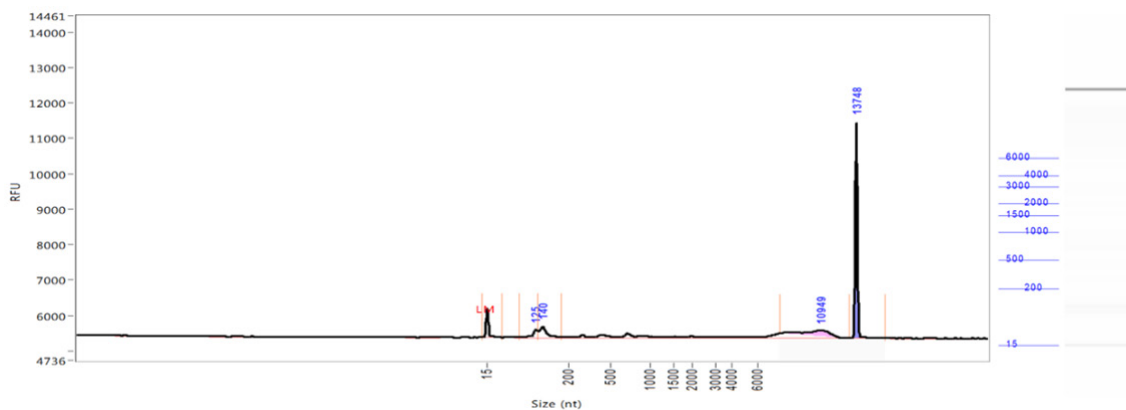
langkah awal dalam menghasilkan kualitas RNA yang berkualitas baik. Sementara itu, metode ekstraksi RNA dengan Kit TRIzol™ Reagent dapat dilakukan dengan baik. Hasil ekstraksi RNA dianalisis dengan Agilent 5300 Fragment Analyzer untuk menganalisis kualitas dan kuantitas RNA.

Hasil yang diperoleh berupa gambar gel elektroforesis, *electrogram*, nilai RQN, dan total konsentrasi RNA serta rasio 28S:18S. Nilai RQN setara dengan nilai RIN (RNA *integrity number*). Nilai RQN muncul jika menganalisis kualitas RNA dengan menggunakan Fragment Analyzer. RQN dihitung dengan menganalisis seluruh *electropherogram* selain rasio puncak ribosom. Nilai RQN didasarkan pada skala 1 sampai 10, dengan 1 mewakili RNA terdegradasi dan 10 mewakili RNA yang utuh. Dari keempat sampel, satu sampel RNA dinyatakan tidak layak untuk dilakukan analisis transkriptomik dikarenakan tingginya kontaminasi DNA. Gambaran *electrogram* dan elektroforesis pada tiap sampel dapat terlihat pada Gambar 5, 6, 7, dan 8. Konsentrasi total RNA, rasio 28S:18S serta nilai RQN pada setiap sampel disajikan pada Tabel 1.



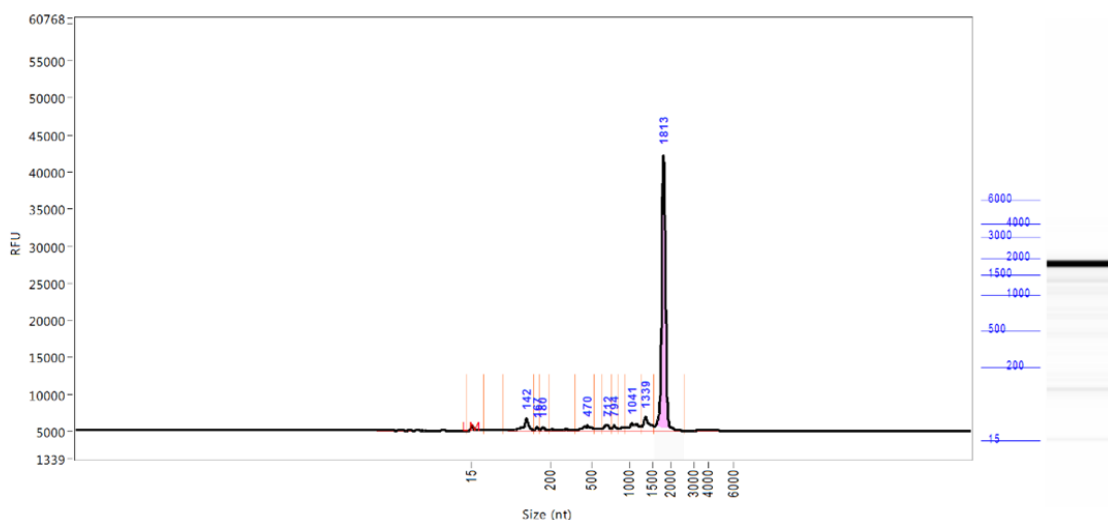
Gambar 4. Penyumbatan hasil dari proses *filter binding* pada *spin column* dengan kit RNAqueous Phenol-free

Figure 4. *Clogged results from the filter binding process on the spin column with the RNAqueous Phenol-free kit*



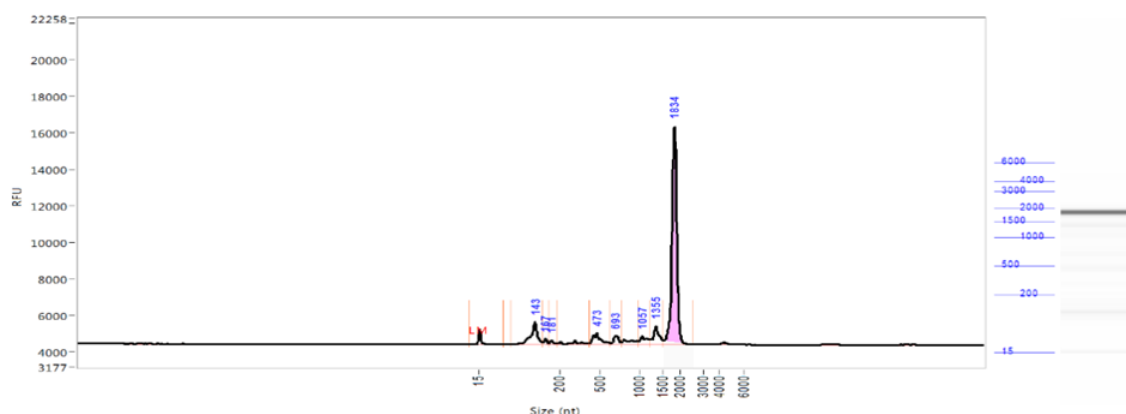
Gambar 5. *Electrogram dan gel elektroforesis yang dihasilkan pada pemeriksaan kualitas RNA pada sampel MST1c*

Figure 5. *Electrogram and electrophoresis gel produced from RNA quality checking on MST1c sample*



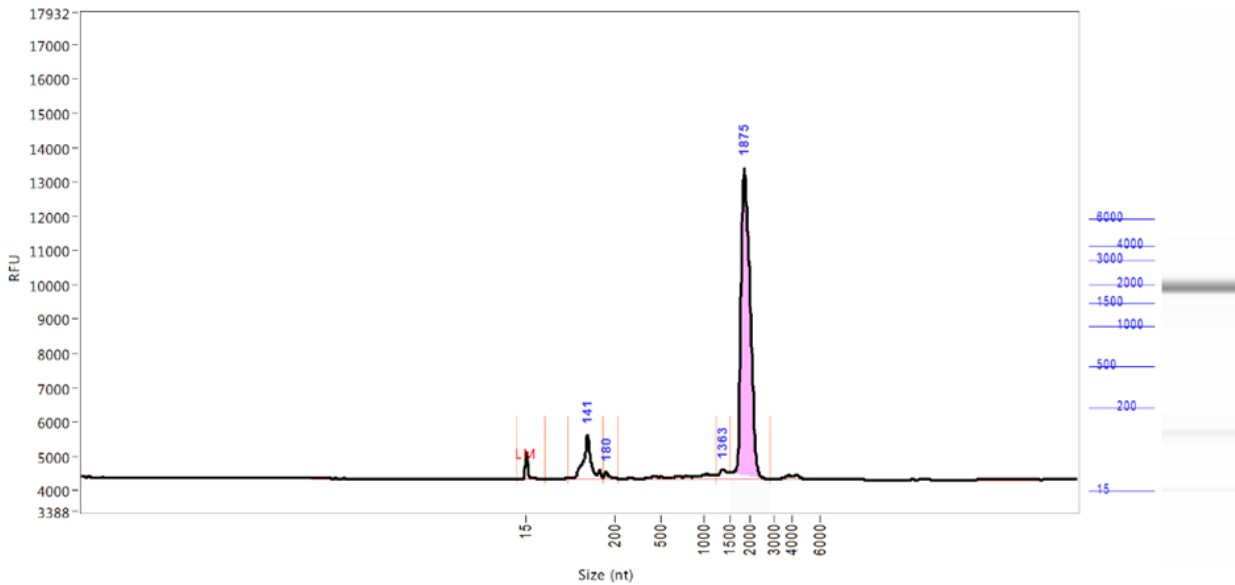
Gambar 6. *Electrogram dan gel elektroforesis yang dihasilkan pada pemeriksaan kualitas RNA pada sampel MST1d*

Figure 6. *Electrogram and electrophoresis gel produced from RNA quality checking on MST1d samples*



Gambar 7. *Electrogram dan gel elektroforesis yang dihasilkan pada pemeriksaan kualitas RNA pada sampel MST2c*

Figure 7. *Electrogram and electrophoresis gel produced from RNA quality checking on MST2c samples*



Gambar 8. *Electrogram* dan *gel* elektroforesis yang dihasilkan pada pemeriksaan kualitas RNA pada sampel MST2d

Figure 8. *Electrogram and electrophoresis gel produced from RNA quality checking on MST2d samples*

Pada Gambar 5, hasil elektroforesis sampel MST1c tidak menunjukkan adanya *band* pada gen target yaitu berkisar antara 1500-2000 bp. Ketidakmunculan *band* baik 28S maupun 18S pada elektroforesis menunjukkan tidak adanya rRNA yang diperoleh. Hal yang sama terlihat pada gambaran *electrogram* yang menampilkan tidak adanya *peak* rRNA pada sampel ini dan hanya menunjukkan *microRNA* serta *fragment* yang besar dengan ukuran lebih dari 6000 nt. Fragmen ini terbentuk kemungkinan dikarenakan terjadinya kontaminasi DNA pada sampel. Pada Gambar 6, 7, dan 8, terlihat munculnya *band* pada gambaran elektroforesis, namun yang terlihat hanya *band* 18S yang menunjukkan adanya rRNA pada sampel. Hal ini juga terlihat pada masing-masing *electrogram* dimana *peak* rRNA 18S terlihat pada ukuran 1500-2000 nt.

Salah satu penilaian tingginya kualitas dan kuantitas ekstrak RNA dapat diketahui dengan munculnya *band* 28S dan 18S pada gel elektroforesis, Dimana *band* 28S terlihat di bagian atas dan lebih menonjol dibandingkan 18S (Schroeder *et al.*, 2006). Becker *et al.* (2010) menyebutkan kualitas RNA yang baik apabila nilai rasio 28S dan 18S berkisar 2,0. Penelitian ini menunjukkan tidak munculnya *band* 28S

pada gambaran di *gel* elektroforesis maupun di *electrogram* pada sampel MST1d, MST2c dan MST2d, sehingga rasio 28S: 18S bernilai 0. Hal ini terjadi dikarenakan sifat sensitivitas 28S rRNA yang mudah terfragmentasi dengan adanya pemanasan dan faktor denaturasi. Tan & Conaco (2021) menyebutkan, hilangnya *band* dan *peak* pada 28S rRNA umumnya terjadi pada RNA moluska. Hal yang sama juga dilaporkan terjadi pada RNA serangga (Winnebeck *et al.*, 2010). Hilangnya *band* 28S rRNA disebabkan terjadinya fragmentasi 28S rRNA dengan dua ukuran yang sama menjadi 28S $\alpha$  dan 28S $\beta$ . Pada *electrogram* sampel MST1d, MST2c dan MST2d terlihat tingginya *peak* pada 18S. Meningkatnya intensitas *band* 18S rRNA dihasilkan sebagai kombinasi dari 18S rRNA, 28S $\alpha$  rRNA dan 28S $\beta$  rRNA. Tidak adanya *smear* pada daerah di sekitar 18S rRNA dan adanya penanda berat molekul yang rendah menandakan kualitas RNA yang baik dengan degradasi yang rendah (Tan & Conaco, 2021).

Seperti terlihat pada Tabel 1 konsentrasi total RNA yang diperoleh berkisar 48,91-392,38 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , nilai rasio 28S:18S berkisar 0-3,5 dimana sampel MST1c memiliki nilai rasio 28S:18S tertinggi yaitu 3,5. Nilai RQN sampel yang diteliti berkisar 7,6-9,6 dengan nilai RQN tertinggi terdapat pada sampel MST2d.



Tabel 1. Hasil pengukuran konsentrasi total RNA, rasio 28S:18S, dan nilai RQN dari masing-masing sampel kerang hijau

Table 1. Results of measurement of total RNA concentration, 28S:18S ratio, and RQN value of each blue mussel sample

Kode sampel Sample codes	Konsentrasi total RNA (ng $\mu\text{L}^{-1}$ ) Total RNA concentration (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	28S/18S	RQN
MST1c	48,9132	3,5	8,2
MST1d	392,3865	0,0	8,4
MST2c	163,0580	0,0	7,6
MST2d	173,4407	0,0	9,6

Nilai RQN pada seluruh sampel berkisar antara 7,6-9,6, dengan nilai RQN tertinggi pada sampel MTS2d. Secara umum nilai RQN seluruh sampel sudah baik. Nilai RQN menunjukkan metrik kualitas dari total RNA pada sampel. Nilai RQN dinilai dari 1 hingga 10, dimana angka 1 menunjukkan total RNA yang terdegradasi sempurna, sedangkan nilai RQN 10 menunjukkan total RNA yang utuh. Nilai RQN yang tinggi mengindikasikan kualitas RNA yang tinggi dengan degradasi minimal pada sampel (Pocernich & Steve, 2019). Nilai RQN setara dengan nilai RIN pada Bioanalyzer (Wong *et al.*, 2013).

Total konsentrasi RNA berkisar antara 48,91-392,38 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , dengan konsentrasi RNA terendah pada sampel MTS1c. RNA yang baik memiliki konsentrasi minimal 5-500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (Aranda *et al.*, 2009). Namun umumnya konsentrasi RNA minimum yaitu 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  yang dibutuhkan untuk analisis lebih lanjut (Zulaeha *et al.*, 2019). Oleh karena itu, sampel MTS1c tidak memenuhi untuk tahap analisis lanjutan.

Total konsentrasi RNA, nilai RQN, dan rasio ribosomal 28S:18S menjadi syarat dalam menilai dan mengevaluasi kualitas total RNA (Pocernich & Steve, 2019). Nilai RQN dan rasio 28S:18S mengukur aspek kualitas yang berbeda, namun saling melengkapi. Nilai RQN mengukur aspek *purity* (kemurnian) dari kontaminan dan yang kedua mengukur integritas (keutuhan). Tabel 1 menunjukkan

bahwa aspek kemurnian dan keutuhan tidak selalu sejalan. Integritas RNA (ditunjukkan dengan nilai RQN) cukup baik, sementara rasio 28S:18S yang rendah. Kondisi ideal yang diharapkan adalah mendapatkan ekstrak RNA dengan kemurnian yang tinggi (diindikasikan dengan nilai rasio 28S:18S sekitar 2,0 dan RQN mendekati 10). Namun pada beberapa spesies seperti moluska, rasio 28S:18S dapat bernilai 0 dikarenakan tidak munculnya *peak* 28S yang dikarenakan sifatnya yang mudah terfragmentasi karena pemanasan dan denaturasi (Tan & Connaco, 2021), sehingga indikator nilai RQN dan rasio 28S:18S tidak selalu sejalan. Contohnya pada moluska. Total konsentrasi RNA pada MST1d, MST2c dan MST2d<sup>3</sup> 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , sehingga meskipun dengan rasio 28S:18S bernilai 0, ketiga sampel tersebut menunjukkan kualitas total RNA yang baik untuk dilanjutkan ke tahap analisis genomik selanjutnya.

**KESIMPULAN**

Kualitas dan kuantitas RNA merupakan tahap awal dan langkah penting dalam analisis genomik lanjutan. Penggunaan metode ekstraksi RNA dengan Kit TRIZol™ Reagent memiliki efektivitas yang lebih baik dalam menghasilkan ekstrak RNA pada jaringan mantel kerang biru (*Mytilus edulis*) dengan kualitas dan kuantitas RNA yang baik dan diindikasikan dari konsentrasi total RNA dan nilai RQN.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Udhi Eko Hernawan selaku kepala Pusat Riset Oseanografi (PRO-BRIN) yang telah mengizinkan penulis untuk mengikuti kunjungan riset di Yale University. Terimakasih kepada Dr. Hagi Yulia Sugeha selaku kordinator kolaborasi riset antara PRO-BRIN dengan Yale University. Terimakasih juga disampaikan kepada Prof. Casey Dunn selaku Professor and Curator Yale Peabody Museum, Yale University yang telah memberikan kesempatan penulis dalam melakukan kunjungan riset di Yale University. Terimakasih kepada Dr. Samuel Church yang telah memberikan pendampingan selama kunjungan riset berlangsung. Penelitian ini dibiayai oleh Yale Institute for Biospheric Studies (YIBS) di bawah kerjasama PRO-BRIN dan Yale University.

## DAFTAR ACUAN

- Adiputra, J., Hidayat, S. H., & Damayanti, T. A. (2013). Evaluasi tiga metode preparasi RNA total untuk deteksi *Turnip mosaic potyvirus* dari benih *Brassica rappa* dengan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 8(2), 44-49. <https://doi.org/10.14692/jfi.8.2.44>
- Anantharaman, S., & Craft, J. A. (2012). Annual variation in the levels of transcripts of sex-specific genes in the mantle of the common mussel, *Mytilus edulis*. *PLOS ONE*, 7(11), e508161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050861>
- Aranda, R. IV., Dineen, S. M., Craig, R. L., Guerrieri, R. A., & Robertson, J. M. (2009). Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 10<sup>4</sup> concentration range. *Analytical Biochemistry*, 387(1), 122-127. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.003>
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., & Pfaffl, M. W. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50(4), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2010.01.010>
- Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J., & Pfaffl, M. W. (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 28, 1601-1613. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9127-2>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). *The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- 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. *Molecular Ecology Resources*, 11(4), 650-661. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03010.x>
- Gosling, E. (2022). *Marine mussels: Ecology, physiology, genetics and culture*. John Wiley & Sons Ltd.
- Guillou, E., Cyr, C., Laplante, J.-F., Bourque, E., Toupont, N., & Tremblay, R. (2020). Commercial performance of blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) stocks at a microgeographic scale. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(6), 382. <https://doi.org/10.3390/jmse8060382>
- Habib, S. H., Saud, H. M., & Kausar, H. (2014). Efficient oil palm total RNA extraction with a total RNA extraction kit. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 2359-2367. <https://doi.org/10.4238/2014.April.3.8>
- Kemfack, A. M., Hernandez-Morato, I., Moayed, Y., & Pitman, M. J. (2022). An optimized method for high-quality RNA extraction from distinctive intrinsic laryngeal muscles in the rat model. *Scientific Reports*, 12, 21665. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25643-y>
- Kiewe, P., Gueller, S., Komor, M., Stroux, A., Theil, E., & Hoffman, W. K. (2009). Prediction of qualitative outcome of oligonucleotide microarray hybridization by measurement of RNA integrity using the 2100 Bioanalyzer™ capillary electrophoresis system. *Annals of Hematology*, 88, 1177-1183. <https://doi.org/10.1007/s00277-009-0751-5>

- Lesser, M. P., & MacManes, M. (2016). Transcriptomic resources for the rocky intertidal blue mussel *Mytilus edulis* from the Gulf of Maine. *Journal of Shellfish Research*, 35(2), 435–465. <https://doi.org/10.2983/035.035.0218>
- Pereira, W. J., Bassinello, P. Z., Brondani, C., & Vianello, R. P. (2017). An improved method for RNA extraction from common bean seeds and validation of reference genes for qPCR. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 17, 150-158. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332017v17n2a22>
- Pocernich, C., & Steve, S. (2019). *Quality metrics for nucleic acids with the Agilent Fragment Analyzer and Femto Pulse Systems*. Agilent Technologies, Inc.
- Schroeder, A. S., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Ligthfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity value to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Seed, R. (1976). Ecology. In: B. L. Bayne (Ed.), *Marine mussels: Their ecology and physiology* (pp. 13–60). Cambridge University Press.
- Simbolon, A. R. (2018). Analisis risiko kesehatan pencemaran timbal (Pb) pada kerang hijau (*Perna viridis*) di Perairan Cilincing Pesisir DKI Jakarta. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, 3(3), 197-208. <https://doi.org/10.14203/oldi.2018.v3i3.207>
- Tan, K., & Conaco, C. (2021). Characterization of the hidden break in giant clam 28S ribosomal RNA. *Journal of Molluscan Studies*, 87(3), eyab029. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyab029>
- 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. *Journal of Equine Science*, 28(4), 135-141. <https://doi.org/10.1294/jes.28.135>
- Walker, T. R., Macaskill, D., & Weaver, P. (2013). Blue mussels (*Mytilus edulis*) as bioindicators of stable water quality in Sydney Harbour during remediation of the Sydney Tar Ponds, Nova Scotia, Canada. *Water Quality Research Journal*, 48(4), 358-371. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2013.014>
- Winnebeck, E. C., Millar, C. D., & Warman, G. R. (2010). Why does insect RNA look degraded?. *Journal of Insect Science*, 10(1), 159. <https://doi.org/10.1673/031.010.14119>
- Wong, K.-S., & Pang, H.-M. (2013). Simplifying HT RNA quality and quantity analysis: Automated CE system designed to improve rapid assessment. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 33(2), 17. <https://doi.org/10.1089/gen.33.2.09>
- Yarra, T., Gharbi, K., Blaxter, M., Peck, L. S., & Clark, M. S. (2016). Characterization of the mantle transcriptome in bivalves: *Pecten maximus*, *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*. *Marine Genomics*, 27, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.003>
- Zhang, H., Gaoyou, Yao., & Maoxian, He. (2022). Transcriptome analysis of gene expression profiling from the deep sea in situ to the laboratory for the cold seep mussel *Gigartidas haimaensis*. *BMC Genomics*, 23, 828. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-09064-9>
- Zulaeha, S., Purwoko, D., Cartealy, I., Tajuddin, T., Karyanti, Khairiyah, H. (2019). Perbandingan tiga kit ekstraksi RNA untuk analisis transkriptomika pada kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 6(1), 118-129. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v6i1.3372>