



Isolasi dan Karakterikasi Agarosa dari Makroalga Merah *Euchema Cottoni* untuk Pemisahaan Fragmen DNA

Isolation and Characterization of Agarose from Red Macroalgae of *Euchema Cottoni* for DNA Fragments separation

Wery Aslinda^{1*}, Ahyar Ahmad²

¹Jurusan Gizi, Politeknik Kesehatan Palu

²Laboratorium Biokimia, Jurusan kimia, Fak. MIPA, Universitas Hasanuddin

ABSTRACT

Agarose has been isolated from red macroalgae *Euchema Cottoni* in Takalar marine area. These agarose was characterized in its percent of rendamen, physical characteristics and it ware analyzed using IR spectrophotometer. These carscteristics then ware compered to commercial products of agarose of Takara, Japan. The result of agarose isolated from *E. Cottoni* showed a relatively similar to commercial agarose. Agarose isolatied from macroalgae containing 0.26% sulfates, a melting point of 96 °C, and a viscosity of 14 cps. This agarose was then applied for DNA fragmens separation and the result showed that quality of separation and sharpness of bands were less favorable compared to commercial agarose one.

Key words: Agarose, *Euchema Cottoni*, DNA fragmen separation.

ABSTRAK

Agarosa telah diisolasi dari makroalga merah *Euchema Cottoni* yang terdapat di perairan Takalar. Agarosa ini dikarakterisasi berdasarkan persen rendamen, sifat-sifat fisiknya dan dianalisa dengan spektrofotometer IR. Sifat-sifat ini dibandingkan dengan produk agarosa komersial Takara, Japan dan ditemukan bahwa agarosa yang diisolasi dari *E. Cottoni* menunjukkan hasil yang relatif sama dengan agarosa komersial. Berdasarkan hasil isolasi agarosa dari makroalga, kandungan sulfatnya sebesar 0,26%, titik leleh sebesar 96 °C, dan viskositas sebesar 14 cps. Agarosa ini kemudian diaplikasikan untuk pemisahan fragmen DNA dengan hasil menunjukkan kualitas pemisahan dan ketajaman pita yang kurang baik jika dibandingkan dengan agarosa komersil.

Kata kunci: Agarosa, *Euchema cottoni*, Pemisahan Fragmen DNA

LATAR BELAKANG

Salah satu makhluk hidup yang tumbuh dan berkembang di laut adalah alga (Evan, 2006). Makroalga banyak ditemukan di perairan Indonesia karena memiliki iklim tropis yang baik untuk pertumbuhan makroalga khususnya di daerah Indonesia timur seperti Sulawesi Selatan. Jenis-jenis makroalga yang terdapat di Sulawesi Selatan antara lain *E. Cottoni*. (Dinas perikanan, 2005; Kadi, 2006). Makroalga jenis ini biasanya dimanfaatkan untuk pembuatan agar, karaginan, dan agarosa.

Agarosa atau galaktosa polimer merupakan senyawa polisakarida yang diisolasi dari makroalga. Agarosa telah banyak diisolasi dari makroalga seperti *Gracilaria fisheri*, *Gracilaria edulis*, *Gracilaria* sp. (Praiboon, 2006), *Gracilaria curtissiae*, *Gracilaria cylindrical* (Hadiyanto, 1999), *Gracilaria changii* (Chan, 2004), dan *Atteromonas agarzyticus* (Potin, 1993).

Sifat agarosa yang tidak bermuatan, membuat agarosa banyak diaplikasikan dalam bidang bioteknologi, baik sebagai media kultur ataupun media elektroforesis. Dalam elektroforesis, agarosa digunakan untuk mendeteksi kompleks-kompleks antigen-antibodi, dan untuk analisis molekul DNA, RNA dan molekul protein.

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi dalam analisis molekul

DNA cukup pesat. Salah satu contohnya adalah analisis molekul DNA, RNA dan molekul protein dengan metode PCR. Metode PCR digunakan untuk melipat gandakan suatu molekul DNA secara cepat dan mudah (Yuwono, 2006). Analisis molekul DNA dengan PCR ini, akan dilanjutkan dengan pemisahan fragmen DNA menggunakan gel elektroforesis untuk memisahkan molekul DNA, RNA dan molekul protein menggunakan arus listrik di permukaan gel matriks (agarosa) (Crom, 2005). Gel matriks yang digunakan dalam analisis gel elektroforesis adalah agarosa yang telah dipatenkan dan memiliki harga yang cukup mahal.

Sejauh ini belum banyak data penelitian mengenai isolasi agarosa dari jenis makroalga lokal sebagai bahan baku gel elektroforesis untuk analisis molekul DNA, RNA dan molekul protein. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengarakterisasi senyawa agarosa dari beberapa jenis makroalga di Sulawesi Selatan. Agarosa yang diperoleh dibandingkan dengan agarosa yang telah dipatenkan atau dikomersialkan. Dari hasil penelitian ini, diharapkan agarosa tersebut dapat digunakan sebagai gel alternatif yang digunakan sebagai bahan baku pada analisis secara elektroforesis untuk memisahkan molekul DNA, RNA dan molekul protein dalam berbagai ukuran.

BAHAN DAN METODE

1. Pengumpulan tumbuhan

Makroalga merah *E. Cottoni* diambil di daerah Punaga Kabupaten Takalar pada bulan Februari 2008. Sampel makroalga yang telah dibersihkan, dikeringkan selama 3 hari dengan panas terik matahari.

2. Ekstraksi agarosa (Siddhanta *et al.*, 2007)

Sebanyak 100 g sampel makroalga *E. Cottoni* yang sudah kering direndam dengan air selama 1 malam pada suhu kamar dan diperlakukan dengan basa menggunakan NaOH cair 10% pada suhu 85 °C selama 2 jam. Basa yang berlebihan dilepaskan sampai air cucian mempunyai pH 7. Kemudian diautoklaf pada suhu 120 °C selama 1,5 jam untuk memperoleh hasil ekstraksi. Menambahkan hasil ekstraksi dengan karbon aktif dan celite 545 yang disaring panas dengan tekanan 60 - 80 psi. Kemudian membekukan filtrat dan mencairkan kembali untuk memperoleh agarosa, yang selanjutnya dikeringkan dan dihaluskan selama 30 menit. Agarosa kering ditimbang dan dihitung persentase rendamennya.

3. Identifikasi agarosa.

Agarosa yang diperoleh dikarakterisasi berdasarkan sifat-sifat fisik dengan mengukur kandungan sulfat, titik leleh, dan viskositas. Penetapan gugus

fungsi senyawa dilakukan dengan alat spektrofotometer IR.

a. Pengukuran kandungan sulfat (SNI 06-6989.20-2004)

Sampel agarosa ditimbang dan dimasukkan kedalam gelas kimia, ditambahkan aquades panas dan disaring. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 mL larutan standar dan Barium klorida, kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis Auto pada panjang gelombang 426 nm.

b. Pengukuran titik leleh (Metode Fuse dan Goto, 1971)

Sebanyak 1,5 % agarosa dimasukkan dalam tes tube dan dibiarkan membentuk gel selama 1 jam pada suhu 20 °C. Tube diletakkan dalam penangas air pada suhu 60 °C dengan menaikkan temperatur penangas 1 °C per menit.

c. Pengukuran viskositas agarosa (Metode FCC, 1978).

Sampel agarosa ditimbang dan ditambahkan aquades kemudian dikocok selama 20 menit. Campuran dipanaskan diatas penangas air sampai suhu campuran 80 °C, kemudian didinginkan sampai 75 °C dan diukur dengan viskosimeter 30 rpm dengan spindel 1 dan vektor 1.

d. Pengukuran Spektrum IR agarosa

Sebanyak 2 mg agarosa dalam 600 mg KBr yang kemudian dimasukkan dalam spektroskopi IR. Dibandingkan spektrum IR agarosa yang diisolasi dari makroalga dengan spektrum IR dari agarosa komersil (Takara, Japan).

4. Analisis DNA dengan PCR dan elektroforesis gel agarosa

a. Penyiapan DNA Ladder dari bakteri

Biakan bakteri dari media padat diambil dan disuspensikan ke dalam larutan buffer lisis 10 X, enzim proteinase K 20 mg/mL dan dH₂O steril, yang dilanjutkan dengan proses inkubasi pada suhu 37°C dan 50°C. Kemudian dipanaskan dan dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm. Lalu dilanjutkan dengan proses penyimpanan supernatan (DNA template) yang didekantasi dalam tabung eppendorf di dalam lemari es.

b. Amplifikasi DNA bakteri

Disiapkan master mix yang mengandung buffer PCR (MgCl₂) 1 kali, dNTP mix 0,2 mM, primer bakteri 30 pmol serta enzim DNA polimerase 0,625 unit untuk keperluan 2 kali PCR (satu tabung untuk bakteri uji dan tabung kedua sebagai control negative) pada volume reaksi 25 µL. Dilakukan proses PCR pada

dua tabung tersebut dengan suhu denaturasi 94 °C, suhu annealing 50 °C dan suhu perpanjangan 72 °C selama 1 menit sebanyak 30 siklus, serta penyempurnaan waktu perpanjangan (delay-time) selama 4 menit. Produk DNA yang diperoleh, kontrol negatif, DNA ladder hasil PCR dianalisis secara elektroforesis pada gel agarosa yang diisolasi dari makroalga dan agarosa komersil (Takara, Japan).

c. Analisis kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa dari makroalga *E. Cottoni*.

Sebanyak 0,5 gram agarosa yang diisolasi dari makroalga ditambahkan buffer TAE 1 X yang mengandung EDTA 0,5 M pH 8,0 dengan volume akhir 50 mL (1 % b/v). Dilanjutkan dengan proses pemanasan dan dibiarkan pada suhu kamar dan selanjutnya gel agarosa tersebut dicetak pada landasan gel (gel-tray) yang sesuai dengan sel elektroforesis mini SubTM DNA cell (biorad) dan dilengkapi dengan sisir sehingga terbentuk sumur-sumur gel pada sekitar 1 cm dari bagian ujung yang berdekatan dengan kutub negatif. Setelah gel agarosa memadat, dicabut sisirnya dan dimasukkan ke dalam sel elektroforesis yang mengandung sejumlah buffer TAE 1X sampai gel agarosa terendam dalam larutan buffer. Dipipet setiap fragmen DNA hasil PCR

sebanyak 10 μ L dan dicampurkan dengan 2 μ L buffer pemuat (loading buffer; 0,25% bromofenol biru, 0,25% xylenecyanol FF, 15% ficoll dalam air suling). Kemudian campuran tersebut dimasukkan kedalam sumur-sumur gel yang telah tercetak. Elektroforesis yang dilakukan pada beda potensial 60 volt selama 1 jam. Selanjutnya gel agarosa direndam dalam bak yang mengandung 0,5 μ L/mL larutan etidium bromide dalam air suling selama 30 - 45 menit kemudian hasil elektroforesis dilihat dengan sinar UV pada panjang gelombang 312 nm.

Kemudian kandungan agarosa yang diisolasi dari makroalga *E. cottoni* dibandingkan dengan dengan agarosa komersil (Takara, Japan).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Makroalga *E. cottoni* dikeringkan selama 3 hari dalam kondisi panas matahari yang baik. Kadar air pada makroalga *E. cottoni* harus dicapai dengan hingga 31 – 35 %, hal ini tercapai dalam waktu 2-3 hari dengan kondisi panas matahari yang baik (Anggadiredja, 2008).

Ekstraksi dan analisis agarosa dari beberapa spesies makroalga

1. Ekstraksi

Berdasarkan hasil rendamen dari makroalga *E. Cottoni* yang diekstraksi dari 100 gram sampel menghasilkan 0,65%

rendamen seperti diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendamen agarosa dari beberapa spesies makroalga.

Makroalga	Berat (gram)	Rendamen (%)
<i>E. cottoni</i>	0,65	0,65

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Siddhanta dengan menggunakan metode efektif biaya seperti dalam penelitian ini menunjukkan bahwa rendamen hasil ekstraksi agarosa dari makroalga *Gelidium* dan *Gelidiella* sebesar 20 - 23 % (Siddhanta, 2005) sedangkan yang dilakukan oleh Meena dengan menggunakan makroalga *Gracilaria dura* menghasilkan redamen sebesar 23 % (Meena *et al.*, 2007).

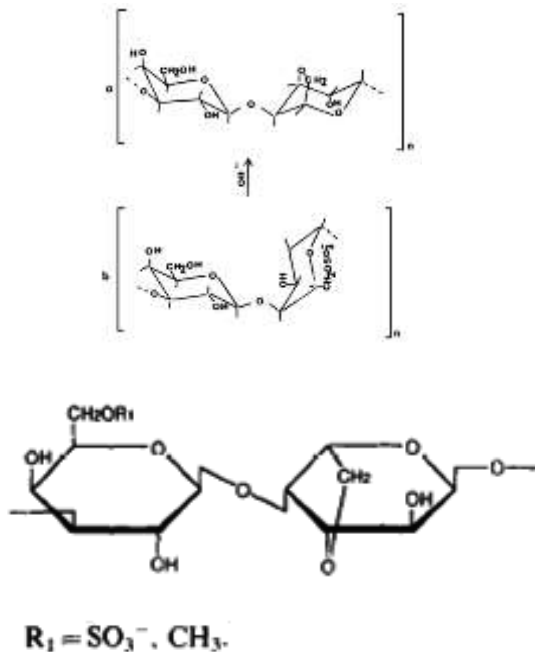
2. Identifikasi agarosa

Untuk mengetahui kualitas agarosa, dilakukan identifikasi sifat-sifat fisiko-kimianya dengan mengukur kandungan sulfat, viskositas, dan titik lelehnya berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Meena *et al.* (2007).

2.1. Kandungan sulfat

Agarosa merupakan molekul agar yang memiliki kekuatan gel yang tinggi. Kekuatan gel yang tinggi terbentuk bila terjadi penurunan kandungan sulfat dan peningkatan 3,6 anhidro-a.-L- galaktosa (Yaphe, 1984 dalam Santos, 1991). Dengan konsentrasi optimum basa menyebabkan produk agarosa memiliki

kekuatan gel yang tinggi (Siddhanta *et al*, 2005), sehingga menyebabkan terjadinya pengurangan kandungan sulfat, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1 (Santos, 1991).



Gambar 1 Struktur a. agarosa. b. 6-galaktan sulfat (Santos, 1991)

Gambar 15. Struktur agarosa sulfat (Takano, 1997)

Tabel 2. Perbandingan kandungan sulfat agarosa dari makroalga *E. Cottoni* dengan agarosa produk komersil

No	Makroalga	Kandungan sulfat (ppm)	Kandungan sulfat (%)
1	<i>E. cottoni</i>	72,25	0,26
2	Takara	28,42	0,14
3	<i>G. Dura</i> *	-	0,50

No	Makroalga	Vis (cps)	Ket
1	<i>E. Cottoni</i>	14	
2	Takara	10,8	
3	<i>G. Dura</i>	44	Meena <i>et al</i> , 2007
4	Sigma (A9918)**	-	<0,25

Sumber : * Meena *et al*, 2007.

** Catalog Sigma, 2008.

Kadar sulfat yang ditolerir tidak lebih dari 0,7 % (Renn, 1984). Kandungan sulfat agarosa berdasarkan katalog Sigma tahun 2004 – 2005 berkisar 0,1 - 0,3 % (Meena *et al*, 2007). Kandungan sulfat yang biasa digunakan dalam elektroforesis analisis DNA adalah 0,12 % (katalog A0576) dan 0,25 % (katalog A9918) (Catalog Sigma, 2008).

2.2 Penentuan titik leleh agarosa

Menurut Siddhanta, titik leleh suatu agarosa yang memiliki kualitas yang baik antara 95-100 °C.

Data secara lengkap titik leleh agarosa yang diisolasi dari makroalga diperlihatkan pada Tabel 3 dibawah ini.

Tabel. 3 Hasil Pengukuran titik leleh agarosa yang diisolasi dari beberapa spesies makroalga

No	Makroalga	Titik leleh (° C)	Ket
1	<i>E. Cottoni</i>	96	
2	Takara	98	
3	<i>G. Dura</i>	98	Meena <i>et al</i> , 2007

2.3 Pengukuran viskositas agarosa.

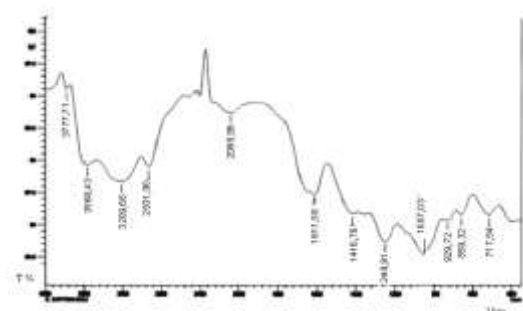
Menurut Murano (1990), semakin kecil kandungan sulfat maka semakin kecil pula viskositasnya.

Tabel. 4 Hasil pengukuran viskositas agarosa yang diisolasi dari beberapa spesies makroalga

3. Analisis spektrum IR agarosa

Pengukuran spektrum IR agarosa dilakukan untuk mengetahui dugaan gugus fungsi agarosa dari beberapa spesies makroalga yang ditunjukkan pada Gambar 2 yang dibandingkan dengan agarosa komersi Takara dan Sigma dibawah ini.

Spektrum IR senyawa agarosa dari makroalga *E. cottoni* Gambar 2 dan data serapannya ditabulasikan pada Tabel 5.



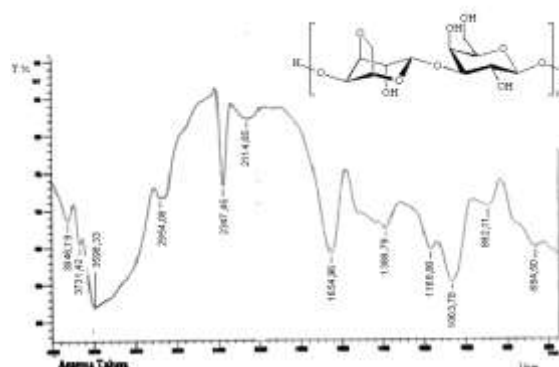
Gambar 2. Spektrum IR agarosa yang diisoalsi dari makroalga *E. cottoni*

Tabel 5. Tabulasi data spektrum IR agarosa dari makroalga *E. cottoni*

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Bentuk pita	Dugaan gugus fungsi
3777	Tajam	Gugus O-H bebas
3568	Tajam	Gugus O-H bebas
3209	Lebar	Ulur gugus O-H dengan ikatan hidrogen
2931	Lebar	Gugus CH ₂ asimetri
1611	Lebar	Gugus C=C terkonyugasi
1249	Lebar	Gugus ester sulfat
1057	Lebar	C-O fenol dan eter
929	Lebar	=CH ₂ alkena dan aromatik
859	Lebar	Gugus C-O-S

		(C ₄ -sulfat)
717	Lebar	=C-H alkena dan aromatik

Spektrum IR senyawa agarosa dari beberapa makroalga diatas dibandingkan dengan spektrum agarosa komersil yaitu Takara dan Sigma seperti ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4 dibawah ini.



Gambar 3. Spektrum IR agarosa komersil (Takara, Japan)

Tabel 6. Tabulasi data spektrum IR agarosa dari Takara

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Bentuk pita	Dugaan gugs fungsi
3846	Tajam	Gugus O-H bebas
3731	Tajam	Gugus O-H bebas
3598	Lebar	Ulur O-H dengan ikatan hidrogen
2954	Lebar	Renggang ulur Gugus C-H alifatik
2347	Tajam	Gugus C≡C alkuna
1654	Lebar	Gugus C=O karboksilat
1388	Lebar	Tekukan gugus C-H alifatik dari CH ₂
1168	Lebar	C-O-C eter

1063	Lebar	C-O fenol dan eter
892	Lebar	=CH ₂ alkena dan aromatik
664	Lebar	=C-H alkena dan aromatik

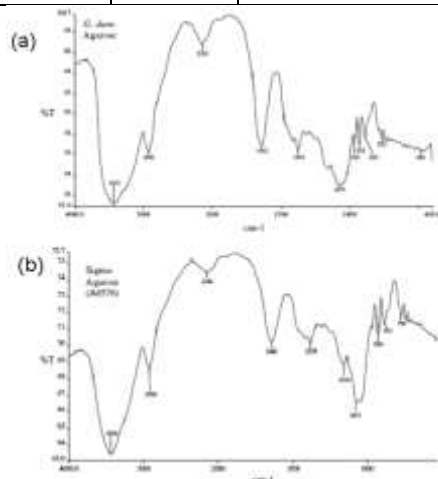


Fig. 1. FT-IR spectra of the *Gracilaria dura* and Sigma (A0576) agarose.

Gambar 4. Spektrum IR agarosa yang diisoalsi dari makroalga (a) *Gracilaria dura* dan (b) Sigma (Meena *et al*, 2007)

Pita serapan pada analisis spektrum IR agarosa yang menunjukkan adanya sulfat sangatlah penting untuk mengetahui kualitas agarosa. Data analisis yang menunjukkan adanya sulfat seperti yang ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Serapan yang menunjukkan adanya gugus sulfat (Balkan *et al*, 2005)

Bil. Gel (cm ⁻¹)	Dugaan gugus fungsi	Sumber rujukan
1960	Ester sulfat	Cross, 1964
1370	Sulfat	Anderson <i>et al</i> , 1986
1240-1252	Ester Sulfat	Anderson <i>et al</i> , 1986
870-840	sulfat pada C2 of 3,6 anhydro galaktosa.	Anderson <i>et al</i> , 1986

	C ₄ -sulfat dalam gugus galaktopyranosa	Melo, 2002
845	galaktosa -4-sulfat	Anderson <i>et al</i> , 1986
830	galaktosa -2-sulfat	Anderson <i>et al</i> , 1986
820	galaktosa -6-sulfat	Anderson <i>et al</i> , 1986
805	3,6 anhydro galaktosea- 2-sulfat	Anderson <i>et al</i> , 1986
705	sulfat pada C4 galaktosa	Rohas <i>et al</i> , 1986.

Dalam penelitian ini, dari semua analisis spektrum IR makroalga *E. Cottoni* menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang ν_{maks} 1240 - 1252 cm⁻¹ hal ini mengindikasikan adanya ester sulfat sesuai dengan rujukan data pada Tabel 7.

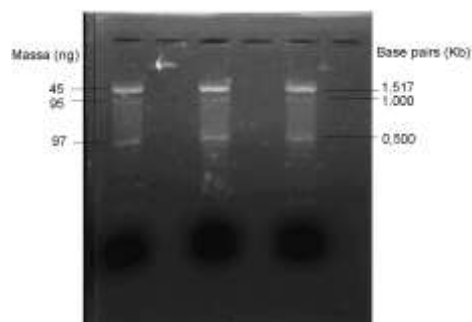
Berdasarkan hasil analisis data spektrum IR pada agarosa dari beberapa makroalga menunjukkan bahwa agarosa dari makroalga *E. Cottoni* memperlihatkan pita serapan (ν_{maks}) yang tidak terlalu mirip dengan agarosa komersil (Takara) sesuai dengan Gambar 3. Hasil analisis spektrum IR ini juga tidak terlalu mirip dengan agarosa dari Sigma (A0576) dan *G. dura* (Gambar 4) (Meena *et al*, 2007).

Analisis DNA menggunakan gel agarosa dari makroalga.

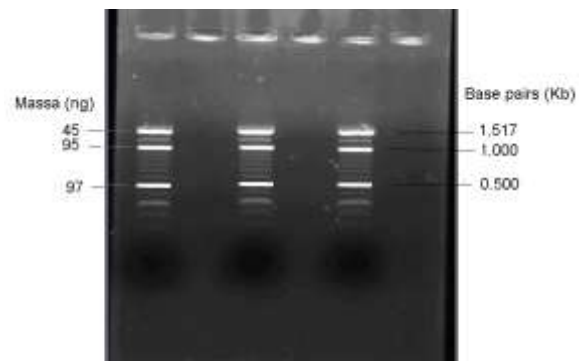
Analisis DNA menggunakan sampel DNA Ladder bakteri yang dielektroforesis dengan agarosa yang diisolasi dari makroalga *E. Cottoni* dan agarosa komersil (Takara, Japan) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.

DNA Ladder hasil PCR yang memberikan pita yang tajam pada fragmen 1, 3, dan 8 dengan masing-masing memiliki massa 45, 95, dan 97 ng.

Berdasarkan hasil elektroforesis sampel DNA Ladder dengan menggunakan agarosa yang diisolasi dari makroalga *E. Cottoni* menunjukkan hasil elektroforesis yang tidak terlalu jelas pemisahan setiap pita DNA sehingga sulit dalam pembacaan pita DNA itu sendiri seperti ditunjukkan pada Gambar 5 dibawah ini.



Gambar 5. Hasil analisis DNA pada agarosa makroalga *E. Cottoni*



Gambar 6. Hasil analisis DNA pada agarosa Takara

Berdasarkan hasil perbandingan analisis DNA pada elektroforesis menggunakan agarosa makroalga *E. Cottoni* dengan agarosa komersil (Takara, Japan), menunjukkan hasil kualitas pemisahan dan ketajaman pita yang kurang baik pada makroalga *E. Cottoni* jika dibandingkan dengan agarosa komersil (Takara, Japan) sehingga belum dapat diaplikasikan langsung dalam analisis dan pemisahan pita-pita DNA.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggadiredja. 2008. *Rumput Laut*. Penebar Swadaya, Jakarta
- Badan Standarisasi Nasional, Air dan air limbah - Bagian 20: Cara uji sulfat (SO₄²⁻) secara turbidimetri, SNI 06-6989.20-2004, Jakarta
- Balkan, G., Coban, B and Güven, KC. 2005. Fractionation of Agarose and *Gracilaria verrucosa* Agar and Comparison of Their IR Spectra with Different Agar. *Acta Pharmaceutica Turcica*. **47**: 93-106
- Catalog Sigma, 2008, Catalog Sigma-Alderic. <http://www.>

[sigmaaldrih.com/catalog/search/
ProductDetail/SIAL/A0576](http://sigmaaldrih.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/A0576)

- Chan, Cheong-Xin , Chai-Ling Ho, Othman, RY., Siew-Moi Phang. 2004. *Total RNA Extraction for the Red Seaweed Gracilaria changii*(Gracilariales,Rhodophyta): Malaysia
- Crom, R. 2005. *Basic Molecular Biological Techniques*. Erasmus University Medical Center. Rotterdam, The Netherlands
- Dinas Perikanan. 2005. Faktor Pengelolaan Yang Berpengaruh Terhadap Produksi Rumput Laut (Gracilaria Verrucosa) Di Tambak Tanah Sulfat Masam. *Jurnal Penelitian P. Indoensia* **11**.
- Evan, S,. 2006. *Alga Laut sebagai Biotarget Industri*. FMIPA Universitas: Lampung.
- Hadiyanto, Sasmito, PI, Sumardi, J.A. 1999. Studi Pengembangan Sistem Agribisnis Dan Industri Komoditas Rumput Laut Di Desa Pantai Jawa Timur
- Kadi, A. 2006. *Beberapa catatan kehadiran marga Sargassum di Perairan Indonesia*. LIPI. Jakarta
- Meena, R., Siddhanya, A.K, Prasad, K., Ramavat, K. Eswaran, S. Thirupathi, M. Ganesan. 2007. Preparation, characterization and benchmarking of agarose from Gracilaria dura of Indian water. *Carbohydrate Polymer*. **69**: 179-188.
- Murano, 1990 Characterization of an agar fraction extracted from Gracilaria Dura. *Hydrobiologia*, 567-571
- Potin, P., Richard, C., Rochas., and Kloareg, B. 1993. Purification and characterization of the α -agarase from Alteromonas agarlyticus (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B, *European Journal of Biochemistry* **214**. **2**: 599–607.
- Praiboon, J., Anong Chirapart, Yoshihiko Akakabe, Orapin Bhumbhamond and Tadahiko Kajiwara. 2006. Physical and Chemical Characterization of Agar Polysaccharides Extracted from the Thai and Japanese Species of Gracilaria. *ScienceAsia*. **1**:11-17
- Renn, D.W. 1984. Agar dan Agarose: indispenseble partners in biotechnology. *I and EC Product Research and Development*, **23**, 17-21
- Santos, Gertrudes A. 1991. A Manual For The Processing Of Agar From Gracilaria. *FAO corporate document repository*.
- Sastrohamidjojo, Hardjono 1992. *Spektroskopi Inframerah*. Liberty, Yogyakarta
- Siddhanta, A.K., 2005. Cost-effective process for preparing agarose from Gracilaria spp. US Patent Publication No. US 2005/0267296 A1; December 1, 2005.
- Sunarto. 2003. *Potensi Nutrisi Rumput Laut (Eucheuma cottonii) Sebagai Sumber Bahan Pakan*. Skripsi Program Studi Nutrisi dan Makanan Ternak. Departemen Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

- Takano, R. 1997. Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* post. et ruprecht (cryptonemiales, rhodophyta). *Charbohydrat Polymer*. **35**: 81-87
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*, C.V. Andi: Yokyakarta.