



Isolasi dan Karakterisasi Agarosa dari Rumput Laut.pdf

Oct 1, 2021

3882 words / 21605 characters

Isolasi dan Karakterisasi Agarosa dari Rumput Laut.pdf

Sources Overview

3%

OVERALL SIMILARITY

1	Mitsunori Yanagisawa, Shigeyuki Kawai, Kousaku Murata. "Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds", Bioengineered, ... CROSSREF	<1%
2	GARY W. SAUNDERS. "Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species <i>Gracilaria vermiculophylla</i> in British ... CROSSREF	<1%
3	State Islamic University of Alauddin Makassar on 2020-11-08 SUBMITTED WORKS	<1%
4	Yu Zhang, Xiaoting Fu, Delin Duan, Jiachao Xu, Xin Gao. "Preparation and characterization of agar, agarose, and agaropectin from the red alga <i>Ahnfeltia plicat</i> ... CROSSREF	<1%
5	Developments in Sustainable Chemical and Bioprocess Technology, 2013. CROSSREF	<1%

Excluded search repositories:

- Internet

Excluded from Similarity Report:

- Small Matches (less than 25 words).

Excluded sources:

- None

Isolasi dan Karakterisasi Agarosa dari Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*

(Isolation and Characterization of Agarose from *Gracilaria verrucosa* Seaweeds)

ZAINAL ABIDIN^{1*}, MARCELLINO RUDYANTO², SUDJARWO²

¹Faculty of Pharmacy, Muslim Indonesia University

²Pharmaceutical Chemistry Departement, Faculty of Pharmacy, Airlangga University

Diterima 11 Februari 2014, Disetujui 11 Februari 2015

Abstrak: Agar adalah polisakarida kompleks yang dapat diisolasi dari rumput laut golongan Rhodophyta, seperti *Gracilaria verrucosa*. Agar terdiri dari dua komponen yaitu agarosa dan agaropektin. Penggunaan NaOH pada penelitian ini dimaksudkan untuk menghidrolisis agar, sehingga terbentuk 3,6-anhidro-L-galaktosa, sedangkan propilen glikol untuk memisahkan agarosa dari agaropektin. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi agarosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* menggunakan NaOH 4%, 6%, 8% dan 10% serta propilen glikol 30, 50 dan 70 mL. Agarosa yang didapat memberikan pita serapan yang spesifik pada panjang gelombang spektra IR sekitar 930 cm⁻¹ dan 890 cm⁻¹, dan terdapat pita serapan sekitar 860 cm⁻¹ dan 830 cm⁻¹, yang menunjukkan masih mengandung sulfat. Peningkatan konsentrasi NaOH dan volume propilen glikol menyebabkan penurunan kadar sulfat dan kadar abu, suhu lebur dan pembentukan gel tetap serta peningkatan kekuatan gel. Agarosa hasil isolasi yang paling baik adalah yang menggunakan NaOH 10% dan propilen glikol 70 mL dengan kadar abu 2,0035±0,0429% (b/b), kadar sulfat 0,3236±0,0131% (b/b), suhu lebur 34 °C, suhu pembentukan gel 90 °C, kekuatan gel 432,195±26,172 g/cm² dan derajat elektroendosis 0,20±0,005.

Kata kunci: Agar, agarosa, NaOH, propilen glikol, *Gracilaria verrucosa*.

Abstract: Agar is complex polysaccharide which could be isolated from group Rhodophyta of seaweeds, such as *Gracilaria verrucosa*. Agar consists of two components, namely agarose and agaropectin. Agarose is neutral polysaccharide, while agaropectin is polysaccharide that contain sulphate, so agarose could be used for gel electrophoresis. The use of NaOH solution was aimed to hydrolyze the agar to form 3,6-anhydro-L-galactose, whereas the use of propylene glycol was to separate agarose from agaropectin. This research was aimed to isolate agarosa from *Gracilaria verrucosa* using NaOH solution with the concentrations of 4%, 6%, 8%, 10% and propylene glycol of 30, 50 and 70 mL. The agarose obtained was giving specific absorption band in IR spectrum with wavenumber in the region of 930 and 890 cm⁻¹, and there were absorption band in the region of 860 and 830 cm⁻¹, indicated that the agarose still contained sulphate. The increase of NaOH concentration and propylene glycol volume caused drawback sulphate and ash content, constant melted temperature and gel temperature but increase gel strength. The best amount of agarose was obtained with the use of NaOH 10% and 70 mL of propylene glycol, with the characteristics were: ash content of 2.0035±0.0429% (w/w), sulphate content of 0.3236±0.0131% (w/w), melted temperature of 34 °C, gel temperature of 90 °C, gel strength of 432.195±26.172 g/cm² and degree of electroendosis of 0.20±0.005.

Keywords: Agar, agarose, NaOH, propylene glycol, *Gracilaria verrucosa*.

* Penulis korespondensi, Hp. 082338805287

Agarose is neutral polysaccharide, while agarpectin is polysaccharide that contain sulphate, so agarose could be used for gel electrophoresis. The use of NaOH solution was aimed to hydrolyzes the agar to form 3,6-anhydro-L-galactose, whereas the use of propylene glycol was to separates agarose from agarpectin. This research was aimed to isolate agarosa from *Gracilaria verrucosa* using NaOH solution with the concentrations of 4%, 6%, 8%, 10% and propylene glycol of 30, 50 and 70 mL. The agarose obtained was giving specific absorbtion band in IR spectrum with wavenumber in the region of 930 and 890 cm^{-1} , and there were absorbtion band in the region of 860 and 830 cm^{-1} , indicated that the agarose still contained sulphate. The increase of NaOH concentration and propylene glycol volume caused drawback sulphate and ash content, constant melted temperature and gel temperature but increase gel strength. The best amount of agarose was obtained with the use of NaOH 10% and 70 mL of propylene glycol, with the characteristics were: ash content of $2.0035 \pm 0.0429\%$ (w/w), sulphate content of $0.3236 \pm 0.0131\%$ (w/w), melted temperature of 34 °C, gel temperature of 90 °C, gel strength of $432.195 \pm 26.172 \text{ g/cm}^2$ and degree of electroendosmosis of 0.20 ± 0.005 .

Keywords: Agar, agarose, NaOH, propylene glycol, *Gracilaria verrucosa*.

* Penulis korespondensi, Hp. 082338805287
e-mail: zainal243@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

AGAROSA dapat diperoleh dengan cara mengisolasi dari rumput laut, salah satunya dari rumput laut *Gracilaria* sp., seperti: *Gracilaria verrucosa*. Rumput laut jenis alga menghasilkan berbagai senyawa, seperti karotenoid, terpenoid, xanthofil, klorofil, vitamin, asam lemak jenuh dan tak jenuh, asam amino, asetogenin, senyawa halogen, antioksidan seperti polifenol, alkaloid, dan polisakarida, seperti agar, karagenin, protogikan, alginat, laminaran, rhamnan sulfat, galaktosil gliserol dan fukoidan⁽¹⁾. Rumput laut *Gracilaria* sp. adalah jenis makroalga yang mengandung fitokoloid, sebagai sumber utama dari agar dengan sedikit ester pada dinding sel⁽¹⁾.

Dilihat dari struktur molekulnya, agar merupakan senyawa polisakarida dengan rantai panjang yang disusun oleh ulangan dari pasangan dua unit molekul polimer agarosa dan agaropektin⁽²⁾. Rasio kedua jenis polimer tersebut bervariasi. Persentase agarosa dalam agar berkisar antara 50-90% b/b, tergantung pada jenis spesiesnya⁽³⁾.

Agarosa merupakan salah satu bahan kimia yang banyak digunakan di berbagai bidang, termasuk obat, kosmetik, teknik jaringan, sel enkapsulasi, imunologi dan kultur mikroorganisme. Selain itu, agarosa juga digunakan di bidang bioteknologi, seperti pada elektroforesis serta sebagai fase diam agarosa pada kromatografi^(2,4). Penggunaan agarosa di bidang bioteknologi, berhubungan dengan kemampuan agarosa untuk membentuk gel yang kuat dan muatan listrik mendekati netral⁽²⁾. Karakteristik kualitas agarosa yang baik untuk bidang bioteknologi meliputi kadar abu 0,06-0,20% (b/b)⁽⁵⁾, suhu lebur 80-90 °C, suhu pembentukan gel 35-39 °C⁽³⁾, kadar sulfat 0-0,15% (b/b), kekuatan gel minimal 1000 g/cm²⁽⁴⁾ dan derajat elektroendosmosis dari agarosa 1 % adalah 0,10 atau kurang⁽⁶⁾.

Berbagai penelitian telah dilakukan dalam upaya mengisolasi agarosa, diantaranya adalah penelitian yang telah dilakukan oleh Jacqueline Rebello et al. (1997)⁽⁷⁾ menggunakan NaOH dan penelitian yang dilakukan oleh Heri Purwoto et al. (2000)⁽⁸⁾ menggunakan propilen glikol.

Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi agarosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* menggunakan NaOH 4%, 6%, 8% dan 10% serta propilen glikol 30, 50 dan 70 mL. Penggunaan NaOH pada penelitian ini dimaksudkan untuk menghidrolisis agar, yaitu untuk memutuskan ikatan antara agarosa dan agaropektin, di mana perlakuan alkali terhadap molekul agar dapat menghilangkan sulfat yang tidak stabil pada C-6 dari unit L-galaktosa ketika gugus hidroksil pada C-3

kestabilan dengan membentuk 3,6-anhidro galaktosa⁽⁷⁾. Penggunaan propilen glikol ditujukan untuk memisahkan agarosa dari agaropektin. Tingginya konsentrasi gugus 3,6-anhidro-L-galaktosa pada agarosa meningkatkan sifat hidrofobik dari molekul tersebut, sehingga agarosa dapat larut dalam propilen glikol panas, pada suhu di atas 80 °C, mengendap saat didinginkan. Agaropektin dengan gugus bermuatan atau kandungan 3,6-anhidro galaktosa yang rendah, dapat larut dalam propilen glikol panas maupun dingin^(9,10). Agarosa yang diperoleh juga dianalisis karakteristiknya yang meliputi kadar abu, kadar sulfat, suhu lebur, suhu pembentukan gel, kekuatan gel serta derajat elektroendosmosis.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Agarosa (*p.a.*, Sigma), *human albumin* (*p.a.*, Sigma), HCl (*p.a.*, Sigma), H₂SO₄ (*p.a.*, Mallinckrodt), BaCl₂ (*p.a.*, Merck), *blue dextran* (Sigma), etanol (*p.a.*, Merck), isopropanol (*p.a.*, Merck), KBr (*p.a.*, Merck), kalsium hipoklorit (teh Tjiwi Kimia), Tris HCl (*p.a.*, Merck), etilendiamin tetraasetat (*p.a.*, Merck), asam borat (*p.a.*, Merck), NaOH (*p.a.*, Sigma), pewarna protein *comassie brilliant blue* (*p.a.*, Merck), propilen glikol (*p.a.*, Amresco), rumput laut *Gracilaria verrucosa*, air suling.

Alat. Elektroforesis (Mupid 2plus), *Spectrum FT-IR* Spektrofotometri (Perkin Elmer), gelas ukur (Pyrex), instrumen tekstur analisis (TAXT Plus), oven (Venticell), tanur (Thermolyne 48010-33), termometer (Safety), timbangan analitik (Sartorius), penangas air (Thermostart HH-6).

METODE. Pengambilan dan Pengolahan Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*. Sampel rumput laut *Gracilaria verrucosa* diambil di salah satu tambak di Du Taipa, Desa Soreang, Kecamatan Mappakasung Kabupaten Takalar pada bulan Februari 2013. Sampel telah dideterminasi oleh LIPI pada tanggal 26 Maret 2013. Proses pemucatan dengan kaporit 1% sesuai dengan metode Anggadiredja et al, 2010⁽²⁾.

Penentuan Kadar Air *Gracilaria verrucosa*. Penentuan kadar air rumput laut *Gracilaria verrucosa* dengan menggunakan metode Horwitz, 2000⁽¹¹⁾.

Isolasi Agar dari Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*. Rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebanyak 10 g direndam dalam air tawar selama 1 jam pada suhu kamar, selanjutnya dididihkan selama 3 jam dalam 700 mL air suling, kemudian disaring dalam keadaan panas dengan tekanan (dalam keadaan vakum). Filtrat dibekukan pada suhu -20 °C, kemudian dicairkan. Gel agar dipisahkan dari cairannya, dikeringkan dalam oven pada suhu 50

0-0,15% (b/b), kekuatan gel minimal 1000 g/cm²(⁴) dan derajat elektroendosmosis dari agarosa 1 % adalah 0,10 atau kurang(⁶).

Berbagai penelitian telah dilakukan dalam upaya mengisolasi agarosa, diantaranya adalah penelitian yang telah dilakukan oleh Jacqueline Rebello et al. (1997)(⁷) menggunakan NaOH dan penelitian yang dilakukan oleh Heri Purwoto et al. (2000)(⁸) menggunakan propilen glikol.

Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi agarosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* menggunakan NaOH 4%, 6%, 8% dan 10% serta propilen glikol 30, 50 dan 70 mL. Penggunaan NaOH pada penelitian ini dimaksudkan untuk menghidrolisis agar, yaitu untuk memutuskan ikatan antara agarosa dan agaropektin, di mana perlakuan alkali terhadap molekul agar dapat menghilangkan sulfat yang tidak stabil pada C-6 dari unit L-galaktosa ketika gugus hidroksil pada C-3 telah terionkan. Hal ini memberikan peningkatan

verrucosa diambil di salah satu tambak di Du Taipa, Desa Soreang, Kecamatan Mappakasung Kabupaten Takalar pada bulan Februari 2013. Sampel telah dideterminasi oleh LIPI pada tanggal 26 m 2013. Proses pemucatan dengan kaporit 1% sesuai dengan metode Anggadiredja et al, 2010(²).

Penentuan Kadar Air *Gracilaria verrucosa*
Penentuan kadar air rumput laut *Gracilaria verrucosa* dengan menggunakan metode Horwitz, 2000(¹¹).

Isolasi Agar dari Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*
Rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebanyak 10 g direndam dalam air tawar selama 1 jam pada suhu kamar, selanjutnya dididihkan selama 3 jam dalam 700 mL air suling, kemudian disaring dalam keadaan panas dengan tekanan (dalam keadaan vakum). Filtrat dibekukan pada suhu -20 °C, kemudian dicairkan. Gel agar dipisahkan dari cairannya, dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C dan diperoleh agar(^{7,12}).

Optimasi NaOH untuk Isolasi Agarosa dari Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*. Rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebanyak 10 g direndam dalam air tawar selama 1 jam pada suhu kamar, selanjutnya dipanaskan dalam larutan NaOH 4%, 6%, 8%, dan 10% pada suhu 85 °C selama 2 jam, lalu dibebaskan dalam larutan H₂SO₄ 0,025% selama 1 jam dan dibilas dengan air tawar hingga netral. Rumput laut tersebut dididihkan selama 3 jam dalam 700 mL air suling, selanjutnya disaring dalam keadaan panas dengan tekanan (dalam keadaan vakum). Filtrat dibekukan pada suhu -20 °C dan setelah itu dicairkan. Setelah itu, isolat gel agarosa dari cairannya. Gel agarosa yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi NaOH ditambahkan propilen glikol 50 mL, dipanaskan sampai suhu 100 °C, kemudian didinginkan hingga suhu 70 °C dan ditambahkan 75 mL isopropanol sambil diaduk sampai larutan homogen. Larutan didinginkan pada suhu kamar selama semalaman agar terjadi pengendapan sempurna. Endapan disaring dan direndam dengan 25 mL isopropanol selama 1 jam. Hal ini dilakukan sebanyak dua kali, kemudian disaring dan diperas. Endapan yang diperoleh dikeringkan dalam oven suhu 50 °C sehingga diperoleh isolat agarosa^(7,8,12).

Optimasi Propilen glikol untuk Isolasi Agarosa dari Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*. Rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebanyak 10 g direndam dalam air tawar selama 1 jam pada suhu kamar, selanjutnya dipanaskan dalam larutan NaOH (kadar NaOH hasil optimasi) pada suhu 85 °C selama 2 jam, kemudian dibebaskan dalam larutan H₂SO₄ 0,025% selama 1 jam dan dibilas dengan air tawar hingga netral. Rumput laut tersebut dididihkan selama 3 jam dalam 700 mL air suling, selanjutnya disaring dalam keadaan panas dengan tekanan (dalam keadaan vakum). Filtrat dibekukan pada suhu -20 °C dan setelah itu dicairkan. Isolat gel agarosa dipisahkan dari cairannya. Gel agarosa yang dihasilkan ditambahkan propilen glikol 30, 50 dan 70 mL, dipanaskan sampai suhu 100 °C, kemudian didinginkan hingga suhu 70 °C, ditambahkan isopropanol masing-masing sebanyak 1,5 kali dari propilen glikol sambil diaduk sampai larutan homogen. Setelah itu, larutan didinginkan pada suhu kamar selama semalaman agar terjadi pengendapan sempurna. Endapan disaring dan direndam dengan 25 mL isopropanol selama 1 jam. Proses ini dilakukan sebanyak dua kali, kemudian disaring dan diperas. Endapan yang diperoleh dikeringkan dalam oven suhu 50 °C sehingga diperoleh isolat agarosa^(7,8,12).

Penentuan Karakteristik Agar dan Agarosa. Penentuan karakteristik dari agar dan agarosa hasil isolasi meliputi analisis spektrum IR, penentuan kadar

lebur dan suhu pembentukan gel^(14,15,16) serta penentuan derajat elektroforesis⁽⁶⁾.

Pengolahan dan Analisis Data. Data penelitian ini dianalisis menggunakan Uji *Anova One Way* dengan tingkat signifikansi (p) lebih kecil dari 0,05 pada *Origin Software*, IBM SPSS Amos 19.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar air rumput laut *Gracilaria verrucosa* adalah 16,2927±0,2094% (b/b) sama dengan pada penelitian lain yang menggunakan rumput laut *Gracilaria* 15-20% (b/b)⁽¹⁷⁾. Spektrum IR agar dan agarosa hasil isolasi digunakan untuk menentukan keidentifikasian dengan agarosa standard (Gambar 1 dan 2). Pada masing-masing spektrum IR terbentuk pita serapan sebagai berikut: pada daerah gugus fungsi 4000-1500 cm⁻¹ terdapat pita serapan sekitar 3400 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus hidroksil yang membentuk ikatan hidrogen; pita serapan sekitar 2900 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus alkana (CH₃ atau C-H)⁽¹⁸⁾ dan pita serapan sekitar 1600 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi gugus aldehida (-CHO pada senyawa galaktosa)⁽¹⁹⁾. Pada daerah sidik jari (1500-400 cm⁻¹), terdapat pita serapan pada sekitar 1370 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus ester sulfat, pita serapan sekitar 1100 cm⁻¹, menunjukkan adanya gugus sulfat (C-O-C), pita serapan sekitar 1070 cm⁻¹, menunjukkan adanya kerangka struktur senyawa galaktosa, pita serapan sekitar 930 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya vibrasi spesifik dari 3,6-anhidro-L-galaktosa, pita serapan sekitar 890 cm⁻¹, merupakan pita serapan yang spesifik dari 1,3-β-D-galaktosa, yang membedakan spektrum IR agar dan agarosa terhadap karagenan, pita serapan sekitar 860 cm⁻¹, menunjukkan adanya gugus L-galaktosa-6-sulfat, pita serapan sekitar 830 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus D-galaktosa-2-sulfat, pita serapan sekitar 740 cm⁻¹, menunjukkan adanya ikatan glikosida^(20,21,22,23).

Spektrum IR agar dan agarosa hasil isolasi terdapat pita serapan sekitar 860 dan 830 cm⁻¹, yang menunjukkan adanya kandungan sulfat. Pita serapan tersebut pada spektrum IR agarosa standard sangat kecil, karena kandungan sulfat pada agarosa standard juga sangat kecil, sedangkan pita serapan tersebut pada spektrum agar dan agarosa hasil isolasi tampak jelas yang menunjukkan bahwa kandungan sulfat pada agar dan agarosa hasil isolasi masih cukup tinggi.

Untuk spektrum IR agarosa hasil isolasi dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* menggunakan NaOH 10% secara berulang sebanyak 3 kali dengan propilen glikol 70 mL (gambar 2 F), tetap terdapat pita serapan pada bilangan gelombang sekitar 860 dan 830 cm⁻¹.

dalam keadaan panas dengan tekanan (dalam keadaan vakum). Filtrat dibekukan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan setelah itu dicairkan. Isolat gel agarosa dipisahkan dari cairannya. Gel agarosa yang dihasilkan ditambahkan propilen glikol 30, 50 dan 70 mL, dipanaskan sampai suhu $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, kemudian didinginkan hingga suhu $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ditambahkan isopropanol masing-masing sebanyak 1,5 kali dari propilen glikol sambil diaduk sampai larutan homogen. Setelah itu, larutan didinginkan pada suhu kamar selama semalaman agar terjadi pengendapan sempurna. Endapan disaring dan direndam dengan 25 mL isopropanol selama 1 jam. Proses ini dilakukan sebanyak dua kali, kemudian disaring dan diperas. Endapan yang diperoleh dikeringkan dalam oven suhu $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehingga diperoleh isolat agarosa^(7,8,12).

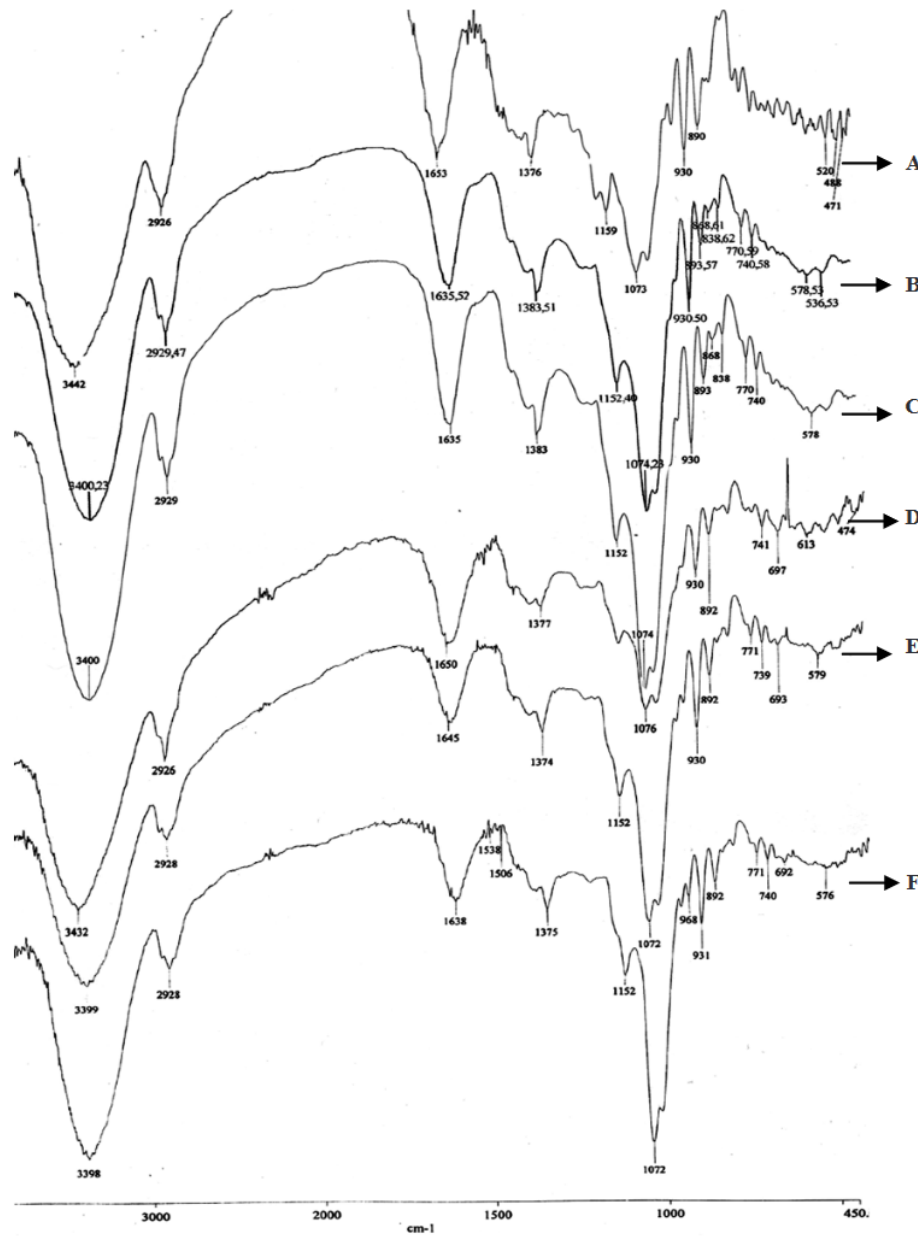
Penentuan Karakteristik Agar dan Agarosa.

Penentuan karakteristik dari agar dan agarosa hasil isolasi meliputi analisis spektrum IR, penentuan kadar abu⁽¹³⁾, penentuan kadar sulfat⁽¹¹⁾, penentuan suhu

L-galaktosa-6-sulfat, pita serapan sekitar 830 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus D-galaktosa-2-sulfat, serapan sekitar 740 cm^{-1} , menunjukkan adanya ikatan glikosida^(20,21,22,23).

Spektrum IR agar dan agarosa hasil isolasi terdapat pita serapan sekitar 860 dan 830 cm^{-1} , yang menunjukkan adanya kandungan sulfat. Pita serapan tersebut pada spektrum IR agarosa standard sangat kecil, karena kandungan sulfat pada agarosa standar juga sangat kecil, sedangkan pita serapan tersebut pada spektrum agar dan agarosa hasil isolasi tampak jelas yang menunjukkan bahwa kandungan sulfat pada agar dan agarosa hasil isolasi masih cukup tinggi.

Untuk spektrum IR agarosa hasil isolasi dari rumput laut *Glacillaria verrucosa* menggunakan NaOH 10% secara berulang sebanyak 3 kali dengan propilen glikol 70 mL (gambar 2 F), tetap terdapat pita serapan pada bilangan gelombang sekitar 860 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus D-galaktosa-2-sulfat.



Gambar 1. Spektra IR agarosa standard yang digunakan (A), agar hasil isolasi (B), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 4% dan propilen glikol 50 mL (C), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 6% dan propilen glikol 50 mL (D), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 8% dan propilen glikol 50 mL (E), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 10% dan propilen glikol 50 mL (F).

Tabel 1. Rendemen dan karakter agar dan agarosa dari *Gracilaria verrucosa* menggunakan NaOH (4%, 6%, 8% dan 10%) serta propilen glikol 50 mL (nilai rata-rata $\pm$ SD).

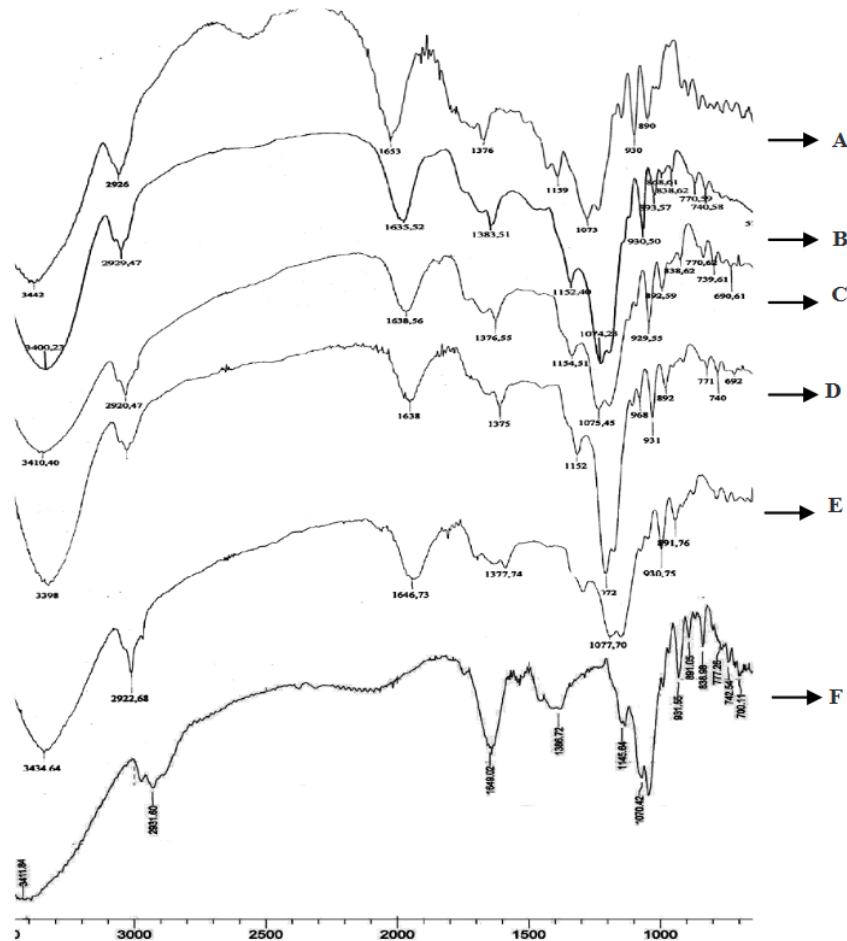
Bahan uji	Rendemen	Kadar abu (%)	Kadar sulfat (%)	Titik lebur (°C)	Titik beku (°C)	Kekuatan g (g/cm ²)
Agar	9,6511 $\pm$ 0,5333	5,8579 $\pm$ 0,0979	2,1066 $\pm$ 0,0436	31 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	10,937 $\pm$ 2,491
Agarosa (NaOH 4%)	9,8239 $\pm$ 0,2939	4,4043 $\pm$ 0,0358	0,9491 $\pm$ 0,0126	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	127,099 $\pm$ 12,4
Agarosa (NaOH 6%)	10,2119 $\pm$ 0,1561	4,2797 $\pm$ 0,0202	0,8926 $\pm$ 0,0115	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	155,223 $\pm$ 2,0
Agarosa (NaOH 8%)	10,3383 $\pm$ 0,5194	3,5872 $\pm$ 0,0177	0,6259 $\pm$ 0,0261	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	168,564 $\pm$ 6,29
Agarosa (NaOH 10%)	10,1069 $\pm$ 0,5466	2,5723 $\pm$ 0,0362	0,4129 $\pm$ 0,0167	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	190,961 $\pm$ 1,4

3000 2000 1500 1000 450
cm⁻¹

Gambar 1. Spektra IR agarosa standard yang digunakan (A), agar hasil isolasi (B), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 4% dan propilen glikol 50 mL (C), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 6% dan propilen glikol 50 mL (D), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 8% dan propilen glikol 50 mL (E), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 10% dan propilen glikol 50 mL (F).

Tabel 1. Rendemen dan karakter agar dan agarosa dari *Gracilaria verrucosa* menggunakan NaOH (4%, 6%, 8% dan 10% serta propilen glikol 50 mL (nilai rata-rata $\pm$ SD).

Bahan uji	Rendemen	Kadar abu (%)	Kadar sulfat (%)	Titik lebur (°C)	Titik beku (°C)	Kekuatan g (g/cm ²)
Agar	9,6511 $\pm$ 0,5333	5,8579 $\pm$ 0,0979	2,1066 $\pm$ 0,0436	31 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0	10,937 $\pm$ 2,491
Agarosa (NaOH 4%)	9,8239 $\pm$ 0,2939	4,4043 $\pm$ 0,0358	0,9491 $\pm$ 0,0126	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	127,099 $\pm$ 12,4
Agarosa (NaOH 6%)	10,2119 $\pm$ 0,1561	4,2797 $\pm$ 0,0202	0,8926 $\pm$ 0,0115	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	155,223 $\pm$ 2,0
Agarosa (NaOH 8%)	10,3383 $\pm$ 0,5194	3,5872 $\pm$ 0,0177	0,6259 $\pm$ 0,0261	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	168,564 $\pm$ 6,29
Agarosa (NaOH 10%)	10,1069 $\pm$ 0,5466	2,5723 $\pm$ 0,0362	0,4129 $\pm$ 0,0167	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	190,961 $\pm$ 1,4
Agarosa standard	-	0,3261 $\pm$ 0,0057	0,3	36	93 $\pm$ 0	1363



Gambar 2. Spektra IR agarosa standar yang digunakan (A), agar hasil isolasi (B), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 10% dan propilen glikol 30 mL (C), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 10% dan propilen glikol 50 mL (D), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 10% dan propilen glikol 70 mL (E), agarosa hasil isolasi menggunakan NaOH 10% secara berulang sebanyak tiga kali dan propilen glikol 70 mL (F).

Tabel 2. Rendemen dan karakter agarosa dari *Gracilaria verrucosa* menggunakan NaOH 10% dengan propilen glikol (30, 50 dan 70 mL) (nilai rata-rata $\pm$ SD).

Bahan uji	Rendemen	Kadar abu (%)	Kadar sulfat (%)	Titik lebur (°C)	Titik beku (°C)	Kekuatan g (g/cm ²)
Agarosa (propilen glikol 30 mL)	10,2959 $\pm$ 0,4885	3,1096 $\pm$ 0,1142	0,4651 $\pm$ 0,0143	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	174,139 $\pm$ 4,36
Agarosa (propilen glikol 50 mL)	10,1069 $\pm$ 0,5466	2,5723 $\pm$ 0,0362	0,4129 $\pm$ 0,0167	34 $\pm$ 0	89 $\pm$ 0	190,961 $\pm$ 1,42
Agarosa (propilen glikol 70 mL)	9,2039 $\pm$ 0,1719	2,0035 $\pm$ 0,0429	0,3236 $\pm$ 0,0131	34 $\pm$ 0	90 $\pm$ 0	432,195 $\pm$ 26,1
Agarosa standard	-	0,3261 $\pm$ 0,0057	0,3	36	93 $\pm$ 0	1363

2-sulfat pada agarosa hasil isolasi tersebut. Hal ini membuktikan bahwa meskipun dengan perlakuan penggunaan NaOH konsentrasi tinggi (10%) secara berulang tetap tidak dapat menghilangkan atau menghidrolisis gugus sulfat pada D-galaktosa (*D-galactose-2-sulphate*), yang menyebabkan kadar sulfat pada agarosa hasil penelitian ini masih tinggi.

Berdasarkan perhitungan statistik dari data

menggunakan NaOH 10% dan propilen glikol 70 sebagai agarosa hasil isolasi dengan karakteristik yang signifikan lebih baik dibandingkan dengan perlakuan larutan NaOH dan propilen glikol lainnya. Hasil organoleptik isolat agarosa yang diperoleh adalah berupa gumpalan warna kuning, tidak berbau tidak berasa.

Rendemen agarosa hasil isolasi ada

Bahan uji	Rendemen	Kadar abu (%)	Kadar sulfat (%)	Titik lebur (°C)	Titik beku (°C)	Kekuatan g (g/cm ³)
Agarosa (propilen glikol 30 mL)	10,2959±0,4885	3,1096±0,1142	0,4651±0,0143	34±0	89±0	174,139±4,36
Agarosa (propilen glikol 50 mL)	10,1069±0,5466	2,5723±0,0362	0,4129±0,0167	34±0	89±0	190,961±1,42
Agarosa (propilen glikol 70 mL)	9,2039±0,1719	2,0035±0,0429	0,3236±0,0131	34±0	90±0	432,195±26,1
Agarosa standard	-	0,3261±0,0057	0,3	36	93±0	1363

2-sulfat pada agarosa hasil isolasi tersebut. Hal ini membuktikan bahwa meskipun dengan perlakuan penggunaan NaOH konsentrasi tinggi (10%) secara berulang tetap tidak dapat menghilangkan atau menghidrolisis gugus sulfat pada D-galaktosa (*D-galactose-2-sulphate*), yang menyebabkan kadar sulfat pada agarosa hasil penelitian ini masih tinggi.

Berdasarkan perhitungan statistik dari data pada Tabel 1 dan 2, didapatkan bahwa hasil isolasi

menggunakan NaOH 10% dan propilen glikol 70 sebagai agarosa hasil isolasi dengan karakteristik yang signifikan lebih baik dibandingkan dengan perlakuan larutan NaOH dan propilen glikol lainnya. Hasil organoleptik isolat agarosa yang diperoleh adalah berupa gumpalan warna kuning, tidak berbau tidak berasa.

Rendemen agarosa hasil isolasi adalah 9,2039±0,1719% (b/b), lebih kecil jika dibanding

dengan penelitian lain yang hanya menggunakan NaOH 10 %, $15,7 \pm 2,8\%$ (b/b) dari rumput laut *Gracilaria tenuistipitata*⁽²⁴⁾. Ada beberapa hal yang dapat menyebabkan perbedaan hasil rendemen agarosa yang diperoleh yaitu: waktu panen, tempat tumbuh dan jenis rumput laut yang digunakan^(25,26).

Kadar abu agarosa hasil isolasi adalah $2,0035 \pm 0,0429\%$ (b/b). Persyaratan kadar abu untuk agarosa adalah 0,06 – 0,20% (b/b)⁽⁵⁾. Jika dibandingkan dengan penelitian lain yang menggunakan NaOH 5 %, agarosa yang diperoleh hasil isolat dari *Gracilaria cornea* memiliki kadar abu 2,69% (b/b)⁽¹⁴⁾, dan penelitian lain yang menggunakan propilen glikol adalah 1,81% (b/b)⁽⁸⁾.

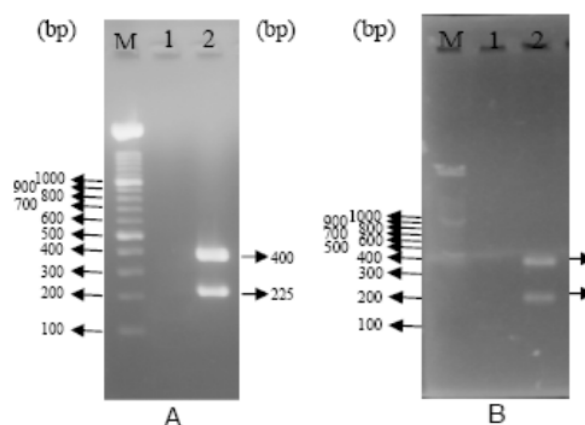
Kadar sulfat agarosa hasil isolasi adalah $0,3236 \pm 0,0131\%$ (b/b). Persyaratan kadar sulfat untuk agarosa adalah 0-0,15% (b/b)⁽⁴⁾. Dibandingkan dengan penelitian lain yang menggunakan NaOH 10%, isolat agarosa dari rumput laut *Gracilaria tenuistipitata* memiliki kadar sulfat $3,34 \pm 0,08\%$ (b/b)⁽²⁴⁾, 1,4% (b/b) dari rumput laut *Gracilaria gracilis*⁽⁷⁾, serta penelitian lain yang hanya menggunakan propilen glikol adalah 0,76% (b/b)⁽⁸⁾.

Suhu lebur dan suhu pembentukan gel agarosa 1,5% hasil isolasi adalah 90 °C, dan 34 °C. Persyaratan suhu lebur untuk agarosa adalah 80-90 °C dan 35-39 °C⁽³⁾. Dibandingkan dengan penelitian lain, yang menggunakan NaOH 10 %, suhu lebur $86,7 \pm 0,8$ °C dan suhu pembentukan gel $42,3 \pm 0,8$ °C dari rumput laut *Gracilaria tenuistipitata*⁽²⁴⁾.

Kekuatan gel agarosa 1% hasil isolasi adalah $432,195 \pm 26,172$ g/cm². Persyaratan minimal kekuatan gel agarosa adalah 1000 g/cm²⁽⁴⁾. Dibandingkan dengan penelitian lain, yang menggunakan NaOH 10% adalah 606 ± 42 g/cm² dari rumput laut *Gracilaria tenuistipitata*⁽²⁴⁾, dan penelitian lain yang menggunakan propilen glikol adalah 977 g/cm²⁽⁸⁾. Perbedaan kekuatan gel agarosa D-galaktosa-2-hidroksil yang lebih stabil dan lebih kuat dibandingkan D-galaktosa-2-sulfat, karena adanya pembentukan ikatan hidrogen⁽²⁴⁾.

Hasil pengukuran derajat elektroendosmosis dari gel agarosa 1% hasil isolasi adalah $0,2 \pm 0,005$, sementara persyaratannya adalah 0,10 atau kurang⁽⁶⁾. Besarnya nilai derajat elektroendosmosis dari agarosa hasil isolasi tersebut dikarenakan kadar abu dan kadar sulfat yang masih tinggi. Besarnya kadar abu dan kadar sulfat menyebabkan aliran cairan elektroforesis menuju katoda, yang ditunjukkan oleh dekstran biru yang bermuatan netral dapat bergerak menuju katoda, di mana aliran tersebut berlawanan arah terhadap perpindahan dari molekul asam nukleat yang menuju anoda selama proses elektroforesis sehingga dapat mengganggu pemisahan asam nukleat⁽²⁷⁾. Hasil

bp dan kontrol positif DNA Rotavirus menggunakan gel agarosa 2% hasil isolasi, yang dibandingkan dengan medium gel agarosa standar 2% dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil elektroforesis dari (A) agarosa standar 2% dan (B) agarosa 2% hasil isolasi (agarosa sampel dengan larutan penampak bercak asam nukleat Redsa cat no. 21141 (Intron).

Keterangan: M= DNA molecular weight marker XIV : 11721933001 (Roche) dengan 6x loading dye solution XB (Invitrogen) (8 µl), 1 = kontrol negatif {DNase/RNase free, demineral water} (Intron) (8 µl), 2 = kontrol positif {DNA Rota virus VP4 (225 bp) / VP7 (400 bp)} (Intron) (8 µl).

Pemisahan pita yang masih rapat dari marker DNA 100 bp pada gel agarosa 2 % hasil isolasi disebabkan karena besarnya derajat elektroendosmosis dari gel agarosa tersebut. Intensitas pendaran pita yang kurang jelas disebabkan oleh kejernihan dari gel agarosa⁽²⁾.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa isolasi agarosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* yang paling baik adalah menggunakan NaOH 10% propilen glikol 70 mL, dengan karakteristik sebagai berikut: kadar abu $2,0035 \pm 0,0429\%$ (b/b), kadar sulfat $0,3236 \pm 0,0131\%$ (b/b), suhu lebur 34 °C, suhu pembentukan gel 90 °C, kekuatan gel $432,195 \pm 26,172$ g/cm², dan derajat elektroendosmosis $0,20 \pm 0,005$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Almeida CLF, Falcao HS, Lima GRM, Montenegro Lira NS, Athayde-Filho PF, et al. Bioactivities of marine algae of the genus *Gracilaria*. International Journal of Molecular Sciences. 2011. (12): 4550-4560.
2. Anggadiredja JT, Zatinika A, Purwoto H, Istiqlal Rumpun Laut. Jakarta: Penebar Swadaya; 2010.
3. Fransiska D, Murdinah, Prasnek, produksi agarosa

⁽²⁴⁾, dan penelitian lain yang menggunakan propilen glikol adalah $977 \text{ g/cm}^{2(8)}$. Perbedaan kekuatan gel agarosa D-galaktosa-2-hidroksil yang lebih stabil dan lebih kuat dibandingkan D-galaktosa-2-sulfat, karena adanya pembentukan ikatan hidrogen⁽²⁴⁾.

Hasil pengukuran derajat elektroendosmosis dari gel agarosa 1% hasil isolasi adalah $0,2 \pm 0,005$, sementara persyaratannya adalah 0,10 atau kurang⁽⁶⁾. Besarnya nilai derajat elektroendosmosis dari agarosa hasil isolasi tersebut dikarenakan kadar abu dan kadar sulfat yang masih tinggi. Besarnya kadar abu dan kadar sulfat menyebabkan aliran cairan elektroforesis menuju katoda, yang ditunjukkan oleh dekstran biru yang bermuatan netral dapat bergerak menuju katoda, di mana aliran tersebut berlawanan arah terhadap perpindahan dari molekul asam nukleat yang menuju anoda selama proses elektroforesis sehingga dapat mengganggu pemisahan asam nukleat⁽²⁷⁾. Hasil *running* elektroforesis dari *marker (ladder)* DNA 100

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa isolasi agarosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* yang paling baik adalah menggunakan NaOH 10% propilen glikol 70 mL, dengan karakteristik sebagai berikut: kadar abu $2,0035 \pm 0,0429\%$ (b/b), kadar sulfat $0,3236 \pm 0,0131\%$ (b/b), suhu lebur 34°C , suhu pembentukan gel 90°C , kekuatan gel $432,195 \pm 26, \text{ g/cm}^2$, dan derajat elektroendosmosis $0,20 \pm 0,005$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Almeida CLF, Falcao HS, Lima GRM, Montenegro Lira NS, Athayde-Filho PF, *et al.* Bioactivities of marine algae of the genus *Gracilaria*. International Journal of Molecular Sciences. 2011. (12): 4550-4560.
2. Anggadiredja JT, Zalnika A, Purwoto H, Istikomah R. Rumput Laut. Jakarta: Penebar Swadaya; 2010.
3. Fransiska D, Murdinah. Prospek produksi agarosa dari rumput laut.

- dan agar mikrobiologi di Indonesia. Jurnal Squalen. 2007. 2(2): 65-72.
4. Wang TP, Chang LL, Chang SN, Wang EC, Hwang LC, Chen YH, *et al.* Successful preparation and characterization of biotechnological grade agarose from indigenous *Gelidium amansii* of Taiwan. Process Biochemistry. 2012. 47.
 5. Chapman V J. Seaweeds and Their Uses. Second Edition. The Camelot Press. London and Southampton. 1970. p. 187, 188.
 6. Cook RB, Witt HJ. Agarose composition, aqueous gel and method of making same. United States Patent. 1981. No. Patent 4,290,911.
 7. Rebello J, Ohno M, Ukeda H, Kusumose H, Sawamura M. 3,6 anhydrogalactose, sulphate and methoxyl contents of commercial Agarophytes from different geographical origins. Journal of Applied Phycology. 1997. (9): 367-70.
 8. Purwoto H, Gustini S, Istini S. Pemurnian agarosa dari agar-agar dengan menggunakan propilen glikol. Dasar-dasar Teknik Kimia. Peningkatan Daya Saing Nasional Melalui Pemanfaatan Sumber Daya Alam untuk Pengembangan Produk dan Energi Alternatif. 2000. 1- 5.
 9. Lahaye M, Rochas C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. Hydrobiologia 221. International Workshop on Gelidium. 1991. p. 137-48.
 10. Provonchee RB. Agarose purification method using glycol. United States Patent. 1991. No. 4,990,611.
 11. Horwitz W. Official methods of analysis of AOAC International. 17th Edition. Volume II. Agricultural Chemical. Contaminants, Drugs, Baking Powder and Baking Chemicals. 2000. 5.
 12. Kumar V, Fotedar R. Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii*. Carbohydrate Polymers. 2009. (78): 813-9.
 13. Depkes RI. Farmakope Indonesia. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1995.
 14. Pelegrin YF, Robledo D. Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan, Mexico. Journal of Applied Phycology. 1997. (9): 533-9.
 15. Kalesh NS. Phycocemical distinctiveness of selected marine Macrophytes of Kerala Coast [thesis]. Cochin University of Science and Technology. Departement of Chemical Oceanography. 2003. 28, 332.
 16. Distantina S, Anggraeni DR, Fitri LE. Pengaruh konsentrasi dan jenis larutan perendaman terhadap kecepatan ekstraksi dan sifat gel agar-agar dari rumput laut *Gracilaria verrucosa*. Jurnal Rekayasa Proses. 2008. 2(1): 11-6.
 17. Pelegrin YF, Murano E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatan Peninsula. Journal Bioresource Technology 2005. 95: 295-302.
 18. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan Introduction to spectroscopy. 4th Ed. USA: Brooks/Cole Cengage Learning; 2001. 16-7.
 19. Nazaruddin MF, Shamsuri AA, Shamsudin M. Physicochemical characterization of chitosan/agar blend gel beads prepared via the interphase method with different drying techniques. Int J Pure Appl Technol. 2011. 3(1): 35-43.
 20. Mollet JC, Rahaoui A, Lemoine Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloid: *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria cf. vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). Journal of Applied Phycology. 1998. 10: 59-66.
 21. Pereira L, Sousa A, Coelho H, Amado AM, Claro PJ. Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. Biomolecular Engineering. 2003. 20: 223-8.
 22. Balkan G, Coban B, Guven KC. Fractionation and characterization of agarose and *Gracilaria verrucosa* agar: a comparison of their IR spectra with different agarose standards. Pharmaceutica. 2005.
 23. Praiboon J, Chirapart A, Akakobe Y, Bhumibhanda O, Kajiwarat T. Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the Thai and Japanese species of *Gracilaria*. Science Asia Supplement. 2006. (1): 11-7.
 24. Montano NE, Villanueva RD, Jumelita B. Chemical characteristics and gelling properties of agar from Philippine *Gracilaria* spp. (Gracilariales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology. 1999. (11): 27-34.
 25. Masak PRP, Rosmiati. Performansi pertumbuhan dan kandungan agar rumput laut *Gracilaria verrucosa* dengan sumber bibit dari lokasi berbeda di Sulawesi Selatan. Prosiding Seminar Nasional Kelautan Universitas Hang Tuah Surabaya. 2009: 280-4.
 26. Sahabuddin, Sahrijannah A. Kualitas agar rumput laut *Gracilaria verrucosa* pada tambak polikultur dengan waktu kultur berbeda. Prosiding Seminar Nasional Kelautan VI. Universitas Hang Tuah Surabaya. 2010: 271-6.
 27. Anonim. Agarose N. Amersham Biosciences. Data Submarine System. 2008.
 28. Laurienzo P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An Overview. Marine Drugs. 2010. 2: 2435-65.
 29. Warren KA. Comparative study of the electrophoretic efficiencies of the Invitrogen E-Gel® Pre-cast Agarose Electrophoresis System, the Cambrex FlashGel System, and the GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain. The Biology Department of Saint Martin's University. 2007.

14. Pelegrin YF, Murano E. Influence of agaran treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan, Mexico. *Journal of Applied Phycology*. 1997. (9): 533-9.
15. Kalesh NS. Phycocemical distinctiveness of selected marine Macrophytes of Kerala Coast [thesis]. Cochin University of Science and Technology. Departement of Chemical Oceanography. 2003. 28, 332.
16. Distantina S, Anggraeni DR, Fitri LE. Pengaruh konsentrasi dan jenis larutan perendaman terhadap kecepatan ekstraksi dan sifat gel agar-agar dari rumput laut *Gracilaria verrucosa*. *Jurnal Rekayasa Proses*. 2008. 2(1): 11-6.
17. Pelegrin YF, Murano E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatan Peninsula. *Journal Bioresource Technology* 2005. 95: 295-302.
18. Warku Kuntal Setiawan. *Prosesing Semolina Nasi Kelautan VI*. Universitas Hang Tuah Surabaya. 2020. 271-6.
27. Anonim. Agarose N. Amersham Biosciences. Data Submarine System. 2008.
28. Laurienzo P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An Overview. *Marine Drugs*. 2010. 2435-65.
29. Warren KA. Comparative study of the electrophoretic efficiencies of the Invitrogen E-Gel® Pre-cast Agarose Electrophoresis System, the Cambrex FlashGel System, and the GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain. The Biology Departement of Saint Martin's University. 2007.