

Isolasi DNA dan Amplifikasi Gen *rbcL* (*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit*) Makroalga *Caulerpa* sp., *Gracilaria* sp., dan *Sargassum* sp.

(DNA Isolation And Amplification of the *rbcL* (*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit*) gene of *Caulerpa* sp., *Gracilaria* sp., And *Sargassum* sp.)

Biondi Tampanguma^{1*}, Grevo S. Gerung², Veibe Warouw², Billy Th. Wagey², Stenly Wullur², Deiske A. Sumilat², Hens Onibala²

¹Program Studi Magister Ilmu Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado - Sulawesi Utara, Indonesia.

²Staf Pengajar Pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado - Sulawesi Utara, Indonesia.

* Corresponding Author: biondi.tampanguma@gmail.com

Abstract

DNA isolation and gene amplification of algae are significantly influenced by various factors such as characteristics and components of the algae cell wall. Therefore techniques and methods of DNA isolation in certain algae, sometimes only succeed in one particular species and can not be applied to another algae species. Based on that issue, this study was conducted with the aims to determine the succeed of DNA isolation and amplify the *rbcL* gene as a target gene for identification. Algae DNA was isolated by using *innuPrep Plant DNA* commercial kit, and the second one with a modified conventional *Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide* (CTAB) method, for the amplification process was using *rbcL* gene (*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit*) with two pairs of primers : *rbcL* 7F-753R and *rbcL* 577F-*rbcSR*. The results showed that the DNA of *Gracilaria* sp was succeed isolated by using CTAB method and it was denoted by the presence of DNA bands in agarose gel. Meanwhile DNA amplification for *Gracilaria* sp., and *Sargassum* sp., were succeed amplified with the appearance of DNA bands. But in algae *Caulerpa* sp., was only succeed on 1 pair of primary *rbcL* 7F and 7.

Keywords : DNA, gene *rbcL*, algae *Caulerpa* sp., *Sargassum* sp., *Gracilaria* sp;

Abstrak

Isolasi DNA dan amplifikasi gen pada alga sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti karakter dan komponen pada dinding sel alga. Oleh karena itu proses isolasi DNA terkadang bisa berhasil pada satu jenis alga, namun tidak berhasil pada jenis alga lainnya. Oleh karena alasan tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk menentukan keberhasilan Isolasi DNA dan mengamplifikasi gen *rbcL* sebagai gen target identifikasi. Penelitian ini dilakukan dengan tahapan awal Isolasi DNA yang menggunakan kit komersil *innuPrep Plant DNA Kit*, dan metode konvensional *Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide* (CTAB) yang telah dimodifikasi. Sedangkan untuk proses amplifikasi, menggunakan gen *rbcL* (*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit*) digunakan dua pasang primer yaitu *rbcL* 7F-753R dan *rbcL* 577F-*rbcSR*. Hasil isolasi DNA dari alga *Gracilaria* sp berhasil diisolasi menggunakan metode CTAB yang ditandai dengan adanya pita DNA pada gel agarose. Amplifikasi DNA pada alga *Gracilaria* sp., dan *Sargassum* sp., berhasil diamplifikasi dengan munculnya pita DNA. Namun pada alga *Caulerpa* sp. hanya berhasil pada 1 pasang primer *rbcL* 7F dan 753R.

Kata kunci : DNA, gen *rbcL*, alga *Caulerpa* sp., *Sargassum* sp., *Gracilaria* sp.

PENDAHULUAN

Alga merupakan salah satu dari berbagai sumberdaya perairan tropis yang merupakan bagian yang terbesar dari

tumbuhan laut. Menurut (Gerung, 2004) Alga di Indonesia merupakan salah satu sumber daya hayati perairan yang melimpah. Di Indonesia alga yang banyak dijumpai adalah *Gracilaria* sp., *Euclima*

sp., *Hypnea* sp., *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., dan *Gelidium* sp., (Sahri dan Suparmi, 2009). Secara umum, alga tumbuh di perairan pantai dangkal, dan sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan termasuk penyinaran (sinar matahari), suhu, nutrisi, dan pergerakan gelombang (Terada & Watanebe, 2016). Tumbuhan alga bernilai ekonomis sangat penting dan memiliki tingkat kegunaan yang tinggi karena komoditas alga laut dapat bermanfaat bagi manusia dan lingkungan perairan sekitarnya (Gerung, 2006). *Sargassum* sp. mengandung bahan alginat dan iodin yang digunakan pada industri makanan, farmasi, kosmetik dan tekstil (Kadi, 2005), *Gracilaria* sp. menghasilkan hidrokaloid (agar-agar, karagenan, dan alginat) yang dapat digunakan untuk memproduksi agar (Teddy, 2009), *Caulerpa* sp. mempunyai manfaat ekonomis yaitu dapat dikonsumsi sebagai sayuran yang dimakan matang dan mentah, dan sumber bahan obat-obatan. (Trono & Ganzon-Fortes, 1988; Nontji, 1993).

Pada penelitian sebelumnya dalam analisis molekuler telah dilakukan oleh Kumari (2013), Shivji *et al.*, (1992), dan Lyra *et al.*, 2015. Akan tetapi, ekstraksi DNA dan amplifikasi gen *rbcL* dari jenis-jenis alga ini seringkali sulit didapat dalam jumlah dan kualitas yang ideal untuk analisis molekuler selanjutnya (Turney & Sukatar, 2001). Pada ekstraksi sebagai langkah paling awal yang dilakukan untuk analisis molekuler, seringkali mendapatkan hasil berbeda untuk masing-masing jenis alga, pada tahapan ini dimana prosedur yang berhasil digunakan pada satu jenis alga dapat gagal digunakan untuk jenis alga lain (Doyle & Doyle, 1987). Faktor-faktor pembatas untuk mendapatkan DNA yang berkualitas dari alga adalah karakter dinding sel, komponen polisakarida kompleks, kandungan polifenol dan metabolit sekunder yang dihasilkan setiap jenis alga (Doyle & Doyle, 1990; Phillips *et al.*, 2001).

Saat ini identifikasi dengan teknik morfologi sering kurang maksimal digunakan, bahkan sering didapatkan kekeliruan dalam identifikasi. Identifikasi

pada jenis alga ini membutuhkan teknik penulsaan spesies yang lebih jauh lagi, yaitu dengan menggunakan pendekatan molekuler. Pada saat ini masih terkendala pada sulitnya mendapatkan ekstrak DNA dari beberapa jenis alga ini, sehingga tahap amplifikasi gen sebagai salah satu kunci identifikasi spesies tidak dapat dilakukan. Sejauh ini, prosedur isolasi DNA alga dengan menggunakan metode kit telah dilakukan (Yang *et al.*, 2013; Geraldino *et al.*, 2009; Ruenes, 2010) maupun dengan menggunakan metode konvensional (Phillips *et al.*, 2001; Wattier *et al.*, 2000). Metode konvensional isolasi DNA alga seringkali melalui beberapa bentuk modifikasi prosedur yang disesuaikan kondisi masing-masing jenis alga yang telah diteliti, sedangkan penggunaan metode kit dapat menghasilkan DNA dengan kualitas dan jumlah yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan keberhasilan isolasi DNA dengan menggunakan metode InnuPrep Plant Kit dan Metode Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) dan mengamplifikasi gen *rbcL* pada alga *Sargassum* sp., *Gracilaria* sp., dan *Caulerpa* sp.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Maret 2020. Lokasi pengambilan sampel berada di perairan Desa Mokupa, selanjutnya sampel akan di ekstraksi DNA dan dilanjutkan analisis molekuler di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi Manado.

Isolasi DNA Alga *Caulerpa* sp., *Gracilaria* sp., dan *Sargassum* sp.

Isolasi DNA alga dilakukan dengan menggunakan Protokol *InnuPrep Plant DNA Kit* dilakukan berdasarkan prosedur manual dari *InnuPrep Plant DNA Kit*. Sampel alga yang telah diambil lalu ditimbang sebanyak 0,5g, kemudian di rendam nitrogen cair (N₂), digerus menggunakan mortal dan pestel steril. Sampel yang telah di gerus lalu akan

ditambahkan 400 µl *lysis solution* dan proteinase K sebanyak 25 µl, dan di vortex lalu diinkubasi selama 3 jam pada suhu 50°C menggunakan *thermoblock*. Selanjutnya sampel dipindahkan kedalam *prefilter* dan masukan dalam tabung *receiver* 2,0 ml dan selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Lalu sampel akan ditambahkan *binding solution* SBS sebanyak 200 µl ke dalam sampel, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan mikro pipet dan dimasukkan ke dalam *spin filter* dan di tempatkan ke dalam tabung *receiver* 2,0 ml lalu disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Setelah itu *spin filter* di tempatkan ke dalam tabung *receiver* 2,0 ml yang baru dan ditambahkan *Washing solution HS* sebanyak 500 µl dalam *spin filter* dan disentrifuge selama 2 menit pada kecepatan 12.000 rpm, setelah itu *spin filter* di tempatkan ke dalam tabung 2,0 ml yang baru dengan menambahkan *Washing solution MS* sebanyak 750 µl lalu sampel disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm. Selanjutnya sampel dipindahkan pada tabung *receiver* 2,0 ml yang baru kemudian disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu tabung *receiver* dikeluarkan, *spin filter* diletakan ke dalam *elution tube* 1,5 ml dan ditambahkan *elution buffer* sebanyak 100 µl. Inkubasi dilakukan selama 5 menit pada suhu ruangan, lalu disentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit.

Isolasi DNA alga dengan menggunakan metode CTAB yang telah dimodifikasi oleh Doyle and Doyle (1987), dan Allen *et al.*, (2006), diawali dengan merendam 0,15 g sampel alga dalam nitrogen cair (N₂) lalu digerus menggunakan mortal dan pestel. Setelah digerus sampel kemudian pindahkan pada tube dan akan ditambahkan *extraction buffer* sebanyak 1,2 ml lalu di vortex. Setelah itu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C dengan interval 10 menit skali divortex. Lalu selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 13.5000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya lapisan supernatant pada bagian atas tube akan dipisahkan pada tabung *ependorf* yang baru dan

ditambahkan fenol-kloroform-isoamil alkohol sebanyak 800 µl, lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruangan dan divortex pada kecepatan rendah, selanjutnya disentrifuge selama 10 menit pada kecepatan 13.500 rpm. Selanjutnya setelah terbentuk 3 lapisan pada tube, lapisan supernatant pada bagian atas tube selanjutnya dipisahkan pada sebuah tabung *ependorf* yang baru dan ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 800 µl dan campurkan dengan menginvert tube. Lalu sampel diinkubasi selama 10 menit, kemudian supernatant dibuang. Lalu TE buffer sebanyak 250 µl ditambahkan ke tube *ependorf*, kemudian diinkubasi kembali di *thermo-block* selama 30 menit pada suhu 37°C dan 3 M NaAc sebanyak 25 µl ditambahkan ke tube *ependorf* kemudian dicampurkan dengan menginvert tube.

Selanjutnya ditambahkan etanol dingin 70 % sebanyak 600 µl ke dalam tube dan invert sebanyak satu kali. Tube lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu -11°C lalu disentrifuge pada kecepatan 13.500 rpm selama 10 menit kemudian supernatant dibuang. Kemudian presipitan atau pelet yang telah berisi DNA dikeringkan di *Laminar Air Flow* selama 2 jam. Setelah itu ditambahkan TE buffer sebanyak 25 µl ke dalam tube dan sampel dapat disimpan dalam kulkas sebelum digunakan untuk pada proses selanjutnya.

Elektroforesis Gel

Gel agarose 1% dibuat dengan melarutkan 0,5 g bubuk agarose ke dalam 50 ml 1 X TAE lalu panaskan hingga mendidih dan diamkan selama 10 menit, setelah itu tambahkan 1 µl MaestroSafe Prestained lalu akan dituangkan kedalam cetakan gel tray dan di biarkan selama ± 30 menit hingga menjadi gel. Pada proses elektroforesis dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 4 µl DNA hasil isolasi dicampurkan dengan 1 µl 10x sampel Loading Buffer di atas parafilm. Kemudian sebanyak 2 µl 100bp ladder DNA marker dimasukkan kedalam sumur sebagai penanda berat molekul. Proses elektroforesis menggunakan 1x TBE buffer pada 80 volts selama 30 menit. Setelah

proses elektroforesis selesai, kemudian gel diangkat dan letakan di atas *UV-transilluminator* untuk diamati keberadaan pita DNANYa dengan menggunakan kacamata pelindung saat melakukan ekspos gel pada sinar UV.

Amplifikasi gen *rbcL*

Proses amplifikasi gen *rbcL* dilakukan menggunakan mesin Polymerase Chain Reaction (PCR), Biometra. DNA genom yang berhasil diekstraksi digunakan sebagai DNA *template* pada proses amplifikasi. Pasangan primer yang digunakan adalah; pasangan primer *rbcL* 7F-753R dan *rbcL* 577F-rbcSR.

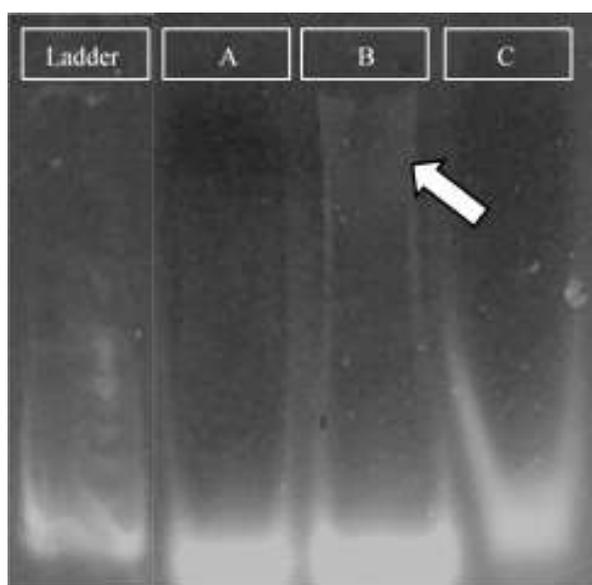
Amplifikasi gen *rbcL* dilakukan pada kondisi PCR dengan pre-denaturasi 95°C selama 6 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik (35 siklus), proses annealing 52°C

selama 30 detik, elongi 72°C selama 30 detik, dan post-elongi 72°C selama 10 menit. Setelah tahap amplifikasi selesai kemudian dilanjutkan pada tahap elektroforesis gel untuk melihat keberhasilan dari tahap amplifikasi gen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA Alga *Caulerpa* sp., *Gracilaria* sp., dan *Sargassum* sp.

Isolasi DNA pada alga dengan menggunakan metode CTAB yang telah dimodifikasi dari Doyle & Doyle (1987) dan Allen *et al.*, (2006) berhasil di isolasi pada alga *Gracilaria* sp. (B), sedangkan pada alga *Caulerpa* sp.(C), dan *Sargssum* sp. (A) , tidak berhasil. (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA yang telah melalui proses modifikasi metode ekstraksi DNAmenggunakan CTAB

Hasil ini menunjukkan bahwa kurangnya DNA yang dihasilkan *Caulerpa* sp. dan *Sargassum* sp. dapat disebabkan oleh ketebalan dinding sel, sehingga sel tidak dapat terlisir dengan sempurna. Secara umum dinding sel disusun oleh selulosa dan polimer-polimer lain (Wildak, 2014 dalam Hengkengbala dkk, 2018). Polisakarida dapat melarutkan DNA sehingga mempengaruhi jumlah dan

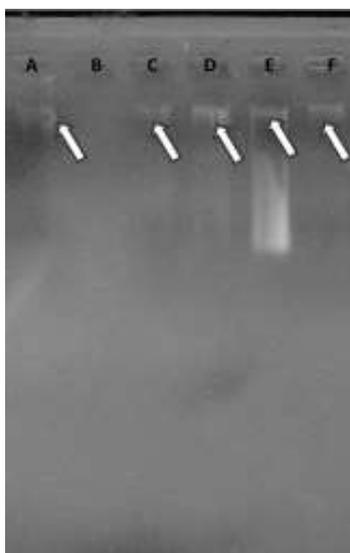
kualitas DNA hasil ekstraksi, sedangkan tingginya konsentrasi komponen polifenol dapat menjadi enzim penghalang mempengaruhi proses ekstraksi DNA (Greco *et al.*, 2014). Dalam hal ini juga disesuaikan dengan pernyataan (Doyle & Doyle, 1990) bahwa prosedur yang berhasil digunakan isolasi DNA pada suatu kelompok tumbuhan atau alga

seringkali gagal diaplikasikan untuk kelompok yang lainnya.

Amplifikasi Gen *rbcL* alga *Sargassum* sp., *Gracilaria* sp., dan *Caulerpa* sp.

Amplifikasi gen *rbcL* dilakukan dengan menggunakan 2 pasangan primer yakni *rbcL* 7F-753R dan *rbcL* 577F-*rbcSR*. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa alga *Caulerpa* sp., *Gracilaria* sp. dan *Sargassum* sp. berhasil di amplifikasi. Pada alga *Caulerpa* sp. berhasil di amplifikasi menggunakan primer *rbcL* 7F-753F (Gambar 2A) dengan pita DNA hasil elektroforesis pada posisi sekitar 2000-2300 bp, sedangkan pada primer *rbcL* 577F-*rbcSR* tidak menunjukkan adanya

pita DNA. Hal ini menunjukkan bahwa primer tidak dapat mengamplifikasi DNA. Pada alga *Gracilaria* sp. berhasil di amplifikasi menggunakan kedua pasangan primer yakni primer *rbcL* 7F-753R (Gambar 2C) pada posisi pita sekitar 2200-2300 bp, primer *rbcL* 577F-*rbcSR* (Gambar 2D) dengan posisi pita sekitar 2200-2300 bp. Munculnya pita DNA pada gel elektroforesis ditemukan pula pada kedua pasangan primer *rbcL* 7F-753R (Gambar 2E) pada posisi pita sekitar 2200-2300 bp, primer *rbcL* 577F-*rbcSR* (Gambar 2F) dengan posisi sekitar 2200-2300 bp dari alga *Sargassum* sp. (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen *rbcL* menggunakan pasangan primer *rbcL* 7F-753R dan *rbcL* 577F-*rbcSR*.

Dari hasil penelitian tersebut di atas menunjukkan bahwa pemilihan primer yang cocok merupakan salah satu parameter yang berpengaruh dalam proses amplifikasi DNA dengan PCR (Henkengbala dkk, 2018, Annisaqois dkk, 2018). Perbedaan intensitas amplifikasi DNA dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya adalah kemurnian dan konsentrasi DNA cetakan. Menurut Weeden *et al.*, (1992) bahwa polisakarida, senyawa fenolik dan konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau tidak jelas. Primer yang memiliki kesamaan urutan

nukleotida dengan genom akan menghasilkan amplifikasi fragmen DNA dalam jumlah tertentu (Alberto *et al.*, 1997, Aggraeni dkk, 2008).

KESIMPULAN

Isolasi DNA adalah tahap paling penting dalam analisis molekuler, pada penelitian ini isolasi DNA dengan menggunakan metode InnuPrep Plant DNA Kit tidak berhasil dalam isolasi, namun pada metode CTAB yang telah dimodifikasi berhasil dalam isolasi DNA pada alga *Gracilaria* sp. Gen *rbcL* berhasil di amplifikasi pada kedua pasangan primer pada alga *Gracilaria* sp., dan *Sargassum*

sp., namun pada alga *Caulerpa* sp. berhasil di amplifikasi pada pasang primer *rbcl* 7F-753R.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberto, F., R. Santos, & J.M. Leitao. 1997. DNA extraction and RAPD markers to assess the genetic similarity among *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) populations. *J. Phycology*, 33:706-710.
- Allen, G. C., M. A. Flores-Vergara, S. Krasynanski, S. Kumar, & W. F. Thompson. 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*. 1 (5): 2320-2325
- Anggraeni, S. R., Sudarsono., & D. Soedharma. 2008. Karakterisasi Genetika Rumput Laut *Euclima* spp. Dari Tiga Daerah di Indonesia (Kepulauan Seribu, Keruak, dan Sumenep). *Jurnal Bionatura*. Vol 10(3): 196-208
- Annisaoqois, M., G. S. Gerung., S. Wullur., D. A. Sumilat., B. T. Wagey & S. V. Mandagi. 2018. Analisis Molekuler DNA Alga Merah (RHODOPHYTA) *Kappaphycus* sp. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. Vol 1(1): Hal 107-112.
- Doyle, J.J. & Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* Vol 19: Pp 11-15
- Doyle, J.J. & Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13.
- Geraldino, J.P., Chang, Y.E. and Kim, M.S. 2009. Systematics of *Hypnea asiatica* sp. nov. (Hypneaceae, Rhodophyta) Based on Morphology and nrDNA SSU, Plastid *rbcl*, and Mitochondrial *Cox1*. *Taxon*, 58(2), 606-616.
- Gerung, S.G. 2004. Biodiversity of Indonesian seaweeds. In: *Marine Science into the New Millennium: New Perspective & Challenges*. Phang, S.M., Chong, V.C., Ho, S.C., Mokhtar, N. and Sim, J.O.L. pp. 41-54.
- Gerung, G.S. 2006. Seaweeds from Manado Bay, Indonesia. In *Advance in Seaweeds cultivation and utilization in Asia* (eds. Phang Siew Mo. Alan T. Critchley & Put O. Ang jr.). University of Malaya Maritime Research Centre, Malaysia. Pp. 35-40.
- Greco, M., C. A. Saez., M. T. Brown., & M. B. Bitonti. 2014. A Simple Extraction of Genomic DNA and Total RNA from Low Biomass *Ectocarpus siliculosus*, the Model Brown Alga. *Journal Plos one* 9(7): e96470.
- Hengkengbala, I. R. G. S. Gerung., S. Wullur. 2018. Ekstraksi DNA dan Amplifikasi gen *rbcl* (*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit*) Alga Merah *Gracilaria* sp. dari Perairan Desa Bahoi, Kabupaten Minhasa Utara. *Journal of Aquatic Science & Management*. 6(2): 33-38.
- Kadi, A. 2005. *Beberapa Catatan Kehadiran Marga Sargassum di Perairan Indonesia*. Oseana, 30 (4) : 19-29.
- Kumari, B. 2013. DNA Isolation Protokol for Different Types of Seaweeds From Seashore Areas of Rameswaram. *Applied Biology and Biotechnology*. Vol 1(2): Hal 5-10
- Lyra, G. M., Costa, E.S., De Jesus P. B., De Matos, J. C. G. and Caires, T. A. 2015. Phylogeny Of Gracilariaceae (Rhodophyta): Evidence from Plastid and Mitochondrial Nucleotide Sequences. *Journal Of Phycology*, 51, 356-366
- Nontji, A. 1993. *Laut Nusantara*. Jakarta: Perebit Djambatan. 367 hal
- Phillips, N., Smith, C. M., Morden, C. W. 2001. An effective DNA extraction protocol for Brown Algae. *Phycological Research*, 49, 97-102.
- Ruenes, J. 2010. DNA barcoding of Select Freshwater and Marine Red Algae

- (Rhodophyta). *Cryptogamie, Algologie*, 31 (4),377-386
- Sahri, A. and Suparmi. 2009. Mengenal Potensi Alga : Kajian Pemanfaatan Sumber Daya Alga Dari Aspek Industri Dan Kesehatan. *Sultan Agung*, XLIV(118).
- Shiviji, M. S. Rogers, S. O Stanhope, M. J. 1992. Rapid Isolation of High Molecular Weight DNA from Marine Macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*. Vol 84: Hal 197-203
- Teddy, M.S., 2009, *Pembuatan nori Secara Tradisional Dari Rumput Laut Jenis Gracilaria sp.,*. Skripsi Program Studi Teknologi Hasil Perairan. Fak. Perik. Dan Ilmu Kelautan. IPB. Hal 3-4
- Terada, R., & Watanebe, Y. 2016. *Seaweeds and Seagrasses in the Amami Islands: Biodiversity and Utilization*. Chapter 17. Kagoshima University Research Center for the Pacific Island. Pp 107-115
- Trono, G. C. & E. P. Ganzon-Fortes. 1988. *Philippine Seaweeds*. Philippines: National Book Store. Inc Publishers Metro Manila. Pp 330
- Tuney, I. and Sukatar, A. 2010. DNA extraction protocol from Brown Algae. *Biological Diversity and Conservation*. Vol 3(1): Pp 51-55.
- Wattier, R.A., Prodohl, P.A. and Maggs, C.A. 2000. DNA Isolation Protocol for Red Seaweed (Rhodophyta). *Plant Molecular Biology Reporter*, 18, 275-281.
- Weeden N.F., Timmerman G.M., Hemmat M., Kneen B.E., Lodhi M.A. 1992. Inheritance & Reability of RAPD markers. In Applications of RAPD technology to plant breeding, Symposium Proceedings. Crop Science Society of America, Madison. pp 12-17
- Yang, E.C., Kim, M.S., Geraldino, P.J.L., Sahoo, D., Shin, J. and Boo, S.M. 2013. Mitochondrial cox1 and Plastid rbcL Genes of Gracilaria vermiculophylla (Gracilaria-ceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 20, 161-168.