

Tracing The CRISPR System in The Genomes of The *Oscillatoria acuminata* and *Stanieria cyanosphaera* Originated from Malalayang Waters

(Penelusuran Sistem CRISPR pada Genom *Oscillatoria acuminata* dan *Stanieria cyanosphaera* asal Perairan Malalayang)

Jurwin A. Laliboso, Inneke F.M. Rumengan*, Elvy L. Ginting, Indri S. Manembu, Desy M.H. Mantiri, Nickson J. Kawung

Marine Science Study Program, Faculty of Fisheries and Marine Science, Sam Ratulangi University Manado, North Sulawesi

*Corresponding author: innekerumengan@unsrat.ac.id

ABSTRACT

The CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) system is a specific nucleotide sequence in genomes of certain bacteria and archaea that functions as an adaptive immune system against viral infections and foreign genetic elements. However, not all microorganisms possess CRISPR systems; therefore, bioinformatic approaches are required to trace the occurrence of CRISPR-Cas systems. The objective of this study was to detect CRISPR-Cas systems in genomes of *Oscillatoria acuminata* and *Stanieria cyanosphaera*. Both species were identified among 2679 operational taxonomic units (OTUs) of microorganisms associated with ascidian *Lissoclinum patella* originated from Malalayang waters, based on previously reported metagenomic analyses. These species were selected due to their relatively high abundance and the availability of complete genome sequence data in the NCBI database, which were downloaded as FASTA format and analyzed using CRISPRCasFinder software. The results showed that *O. acuminata* possesses a complete genome sequence of 7,689,443 bp, containing 80 CRISPR arrays, of which two arrays are associated with Cas systems, and a total of 338 spacers. In the other hand, *S. cyanosphaera* has a complete genome sequence of 5,041,209 bp, with eight CRISPR arrays, two of which are associated with Cas systems, and a total of 37 spacers. The detected CRISPR loci were visualized using CRISPRCasViewer in three display models: linear, circular, and scatter plot. Further studies are required to determine the specific types of CRISPR-Cas systems present in each microbial genome.

Keywords: *O. acuminata*, *S. cyanosphaera*, bioinformatics, CRISPRCasFinder, CRISPRCasViewer

ABSTRAK

Sistem CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) merupakan susunan sekuens nukleotida spesifik dalam genom bakteri dan arkaea tertentu yang berfungsi sebagai sistem imun adaptif mikroba terhadap serangan virus dan materi genetik asing. Namun, tidak semua mikroba memiliki sistem CRISPR, sehingga diperlukan pendekatan analisis bioinformatika untuk mendeteksi CRISPR. Tujuan penelitian ini adalah untuk menelusuri keberadaan sistem CRISPR-Cas pada genom *Oscillatoria acuminata* dan *Stanieria cyanosphaera*. Kedua 2 jenis mikroba ini ditemukan di antara 2679 *operational taxonomic units* (OTUs) mikroba yang berasosiasi dengan ascidia *Lissoclinum patella* dari perairan Malalayang, berdasarkan analisis metagenom yang telah dilaporkan sebelumnya. Kedua spesies ini dipilih karena terdeteksi cukup melimpah, dan ketersediaan data urutan genom lengkap di NCBI. Data urutan genom diunduh dalam format FASTA dan dianalisis dengan perangkat lunak *CRISPRCasFinder*. Ternyata *O. acuminata* memiliki sekuens genom lengkap 7.689.443 bp dengan 80 unit sistem CRISPR, dimana ada 2 unit dengan sistem Cas, serta 338 *spacer*. Sedangkan *S. cyanosphaera* memiliki sekuens genom lengkap sekitar 5.041.209 bp dengan 8 unit CRISPR, dan 2 unit dengan sistem Cas serta 37 *spacer*. Hasil deteksi CRISPR divisualisasikan menggunakan *CRISPRCasViewer* dalam tiga model tampilan, yaitu *Linear*, *Circular*, dan *Scatter Plot*. Selanjutnya, ke depan perlu penelusuran lebih lanjut untuk menentukan tipe CRISPR-Cas pada setiap genom mikroba tersebut.

Kata Kunci: *O. acuminata*, *S. cyanosphaera*, bioinformatika, *CRISPRCasFinder*, *CRISPRCasViewer*

PENDAHULUAN

Genom merupakan keseluruhan DNA dalam satu sel yang mengandung semua informasi genetika yang diwariskan ke keturunannya (Rumengan, 2024). Di dalam genom terdapat ribuan gen yang berfungsi untuk mengkode protein dan molekul lainnya yang sangat penting bagi kehidupan. Ishino *et al.* (1987), menemukan pola urutan DNA pendek yang khas dan terdapat berulang pada genom bakteri *Escherichia coli* tanpa memahami fungsinya. Istilah CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) pertama kali diusulkan pada akhir tahun 2001 oleh Francisco Mojica dan diperkenalkan secara resmi dalam literatur ilmiah oleh Jansen *et al.* (2002), dimana Francisco Mojica tercantum sebagai salah satu anggota tim penulis. Al-Attar *et al.* (2011) kemudian mendeskripsikan CRISPR sebagai fitur pada genom mikroba tertentu yang terdiri dari sekuens-sekuens tertentu (*spacer* dan *repeat*) dan bisa didahului oleh sekuens gen-gen *cas*. Sistem CRISPR ini berperan penting sebagai mekanisme pertahanan yang dimiliki oleh bakteri dan arkae untuk melindungi diri dari serangan virus dan materi genetik asing lainnya (Rumengan, 2021). Koonin dan Makarova (2022) mendeskripsikan bahwa dengan sistem CRISPR-Cas, mikroba dapat melakukan serangan balik dengan menggunakan RNA pemandu hasil transkripsi sekuens *spacer* pada unit CRISPR yang dapat menemukan dan mengenali urutan sekuens tertentu pada genom virus dan materi genetik asing penyerang. Sistem CRISPR ini kemudian menjadi basis temuan teknologi CRISPR-Cas9 oleh Jennifer Doudna dan Emmanuelle Charpentier sehingga mendapat penghargaan *Nobel Prize*

bidang kimia pada tahun 2020 (Ledford & Callaway, 2020). Hanya mikroba yang tergolong bakteri dan arkae yang memiliki sistem CRISPR, terutama pada arkae 90% dari total jenis arkae (Rumengan, 2021). Penelusuran sistem CRISPR dapat dimungkinkan jika sekuens genom lengkap mikroba target sudah terdata pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), dengan menggunakan perangkat lunak *CRISPRCasFinder*. Hasil deteksi *CRISPRCasFinder* dapat divisualisasi dengan *CRISPRCasViewer* yang menampilkan posisi unit-unit CRISPR pada genom (Couvin *et al.*, 2018).

Komunitas mikroba laut yang berasosiasi dengan ascidia *Lissoclinum patella* asal perairan Malalayang Sulawesi Utara, berdasarkan analisis metagenom yang dilaporkan oleh Rumengan *et al.* (2024) teridentifikasi ada 2679 *operational taxonomic units* (OTUs). Untuk itu patut ditelusuri apakah ada jenis-jenis mikroba tersebut yang memiliki unit-unit CRISPR pada genomnya. Jadi perlu diseleksi spesies-spesies mana yang cukup melimpah pada komunitas mikroba tersebut, dan memiliki data sekuens genom lengkap di NCBI. Tujuan penulisan artikel ini adalah memaparkan hasil penelusuran sistem CRISPR-Cas pada genom mikroba yang terseleksi pada diagram krona data metagenom tersebut, dengan pendekatan analisis bioinformatika.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Mikroba laut yang diuji secara analisis *in silico* terdeteksi pada sampel ascidia yang berasal dari Perairan Malalayang Dua, Teluk Manado, pada koordinat 1°27'39,4"LU dan

124°47'32,0"BT, tanggal 8 Agustus 2024 oleh Tim Peneliti Riset Fundamental Reguler, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan Riset, dan Teknologi (Gambar 1). Analisis *in silico* dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Farmasetika Laut di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK), Universitas Sam Ratulangi (UNSRAT).

Prosedur Penelitian

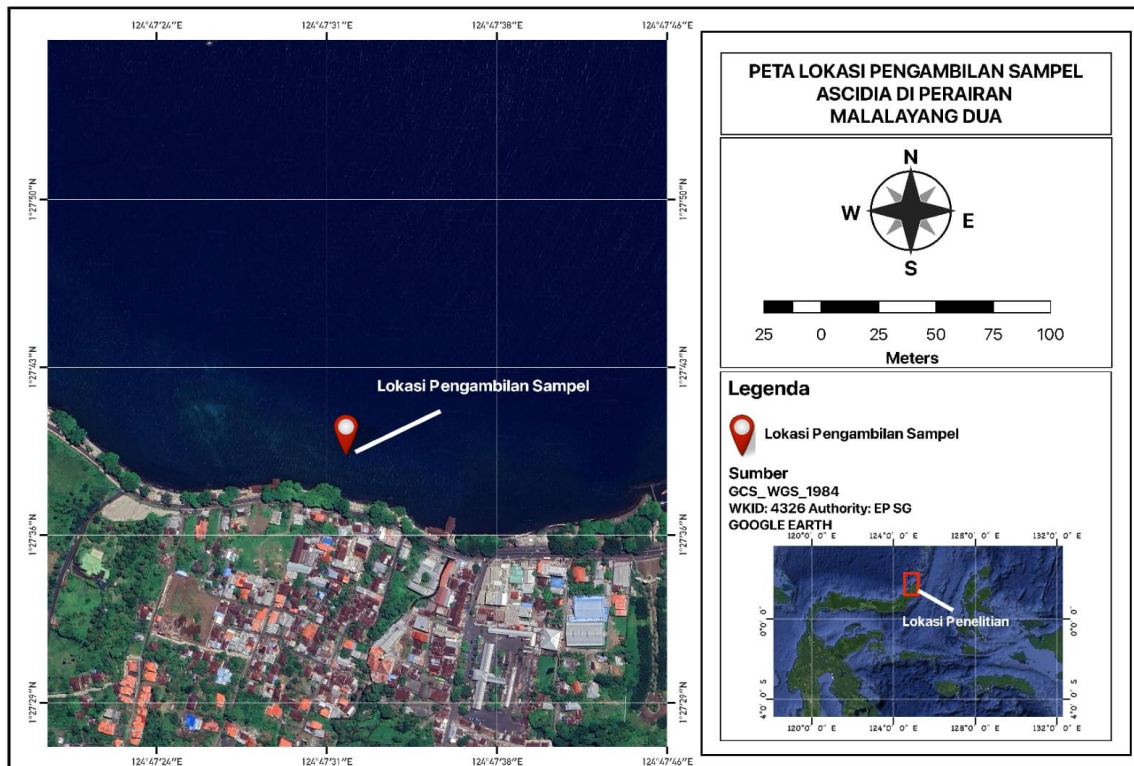
Perangkat dan basis data yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat sekuens CRISPR dalam genom secara otomatis, dan *CRISPRCasViewer* untuk memvisualisasikan hasil deteksi CRISPR dari *CRISPRCasFinder*, serta NCBI sebagai basis data yang digunakan

untuk memperoleh data genom dari masing-masing spesies.

Seluruh perangkat tersebut mendukung kelancaran proses analisis pada penelitian ini. Keras meliputi laptop, yang digunakan untuk melakukan proses pengolahan data. Perangkat lunak yang digunakan mencakup *CRISPRCasFinder* sebagai alat untuk mendeteksi dan mengklasifikasikan.

Seleksi Spesies Mikroba

Seleksi jenis mikroba dilakukan berdasarkan data OTUs (*Operational Taxonomy Units*) pada diagram krona hasil analisis metagenom dari sampel suspensi mikroba yang berasosiasi dengan ascidia *L. patela* dari Perairan Malalayang (Rumengan et al., 2024).



Gambar 1. Lokasi asal mikroba laut *O. acuminata* dan *S. cyanosphaera* yang genomnya digunakan sebagai sumber data dalam pelaksanaan analisis sistem CRISPR-Cas

Dengan analisis bioinformatika seleksi spesies yang melimpah, dilakukan dengan mengklik lingkaran pada diagram krona, mulai dari lingkaran inti menunjuk kingdom, diikuti lingkaran berikut menunjuk filum, dan seterusnya pada lingkaran terluar menunjuk spesies, dan kelimpahan setiap spesies kelihatan di samping kanan atas krona tersebut. Pengecekan sekuens genom yang lengkap di NCBI, dilakukan mulai pada spesies yang paling melimpah dan seterusnya. Ditemukan ada dua spesies yang cukup melimpah dan memiliki sekuens genom yang lengkap di NCBI, yaitu *Oscillatoria acuminata* dan *Stanieria cyanosphaera*.

Prosedur Analisis Bioinformatika

Sekuens nukleotida lengkap dari genom dari *O. acuminata* dan *S. cyanosphaera* pada laman NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> diunduh dalam format FASTA. Format FASTA merupakan format teks yang digunakan untuk menampilkan urutan nukleotida atau asam amino menggunakan kode satu huruf, sehingga termasuk dalam jenis data alfabet yang terdiri dari simbol-simbol penyusun sekuens genetik. Proses pengunduhan dilakukan dengan mengakses situs resmi NCBI dan memilih basis data "Nucleotide", kemudian memasukkan nama kedua spesies secara spesifik pada kolom pencarian untuk memperoleh data genomnya. Dari beberapa hasil yang muncul, dipilih genom lengkap (*complete genome*) untuk *O. acuminata* PCC 6304 dan *S. cyanosphaera* PCC 7437. Sekuens yang diunduh melalui menu "Send to" dengan memilih opsi "Complete Record", dilanjutkan dengan memilih opsi "File", dan tahap terakhir disimpan dalam bentuk format FASTA. Setelah file dihasilkan dan terunduh,

namanya disesuaikan menjadi "*O. acuminata.fasta*" atau "*S. cyanosphaera.fasta*" dan disimpan pada folder khusus. Tahap berikutnya adalah menginput file FASTA tersebut ke *CRISPRCasFinder* melalui laman resminya (<https://CRISPR-Cas.i2bc.parissaclay.fr/CRISPRCasFinder/Index>). File yang telah tersimpan diunggah ke sistem, kemudian dilakukan penyesuaian parameter awal untuk mendeteksi sekuens CRISPR. Pengguna memasukkan email sebelum menjalankan analisis, kemudian sistem dijalankan menggunakan fitur "Run *CRISPRCasFinder*".

Hasil analisis mencakup informasi mengenai keberadaan unit CRISPR, gen *cas*, panjang genom, jumlah *spacers*, *repeats*, dan parameter lain yang secara otomatis juga dikirim ke email.

Hasil deteksi *CRISPRCasFinder* kemudian divisualisasikan menggunakan *CRISPRCasViewer*. Perangkat lunak ini diunduh dalam bentuk file zip, diekstrak, dan dipindahkan ke folder khusus agar tidak bercampur dengan file lain. Di dalam folder tersebut tersedia beberapa berkas, termasuk *CRISPRCasViewer* yang digunakan dalam proses visualisasi dan dapat diakses melalui <https://CRISPR-Cas.i2bc.paris-saclay.fr/Home/Download>. File hasil analisis dari *CRISPRCasFinder* (*result.json*) dimasukkan melalui menu "Select a sequence". Setelah file terbaca, pengguna dapat memilih salah satu dari tiga model visualisasi untuk menampilkan hasil deteksi CRISPR dan gen *cas*. Melalui visualisasi tersebut, ditampilkan parameter seperti jumlah unit CRISPR, lokasi unit dalam genom, panjang *spacers*, jumlah *repeats*, dan gen *cas* yang terdeteksi. Pengoperasian *CRISPRCasFinder* dan *CRISPRCasViewer* menampilkan parameter-parameter CRISPR, seperti

panjang sekuens *spacer*, jumlah *repeat*, gen *cas*, jumlah unit dan posisi unit *CRISPR* pada genom.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi Unit *CRISPR* pada Genom *O. acuminata* dan *S. cyanosphaera*

Sianobakteri *O. acuminata* dan *S. cyanosphaera* merupakan dua mikroba yang teridentifikasi di antara 2679 *Operational Taxonomic Units* (OTUs) hasil analisis komunitas mikroba. Analisis genom menggunakan *CRISPRCasFinder* menunjukkan bahwa kedua spesies memiliki sistem *CRISPR-Cas*, yang tersusun atas gen-gen *cas*, sekuens *repeat*, *spacer*, serta *evidence level*. Parameter ukuran genom, jumlah unit *CRISPR*, jumlah *spacer*, dan nilai *evidence level* pada *O. acuminata* dan *S. cyanosphaera* disajikan pada Tabel 1. Penentuan nilai *evidence level* pada *CRISPRCasFinder* didasarkan pada jumlah *spacer*, tingkat kesamaan antar *spacer*, serta keteraturan pola sekuens *repeat*. Berdasarkan kriteria tersebut, *CRISPRCasFinder* mengelompokkan array *CRISPR* ke dalam tingkat bukti level 1 hingga 4, yang menunjukkan tingkat keyakinan apakah suatu array merupakan *CRISPR* sejati atau

berpotensi bukan *CRISPR*. Level yang lebih tinggi mencerminkan struktur

CRISPR yang lebih valid, sedangkan level rendah menunjukkan tingkat kepercayaan yang lebih kecil. Namun, dalam penelitian ini Tabel 1 yang disajikan hanya menampilkan jumlah *evidence level* secara keseluruhan tanpa merinci distribusi setiap unit *CRISPR* pada masing-masing tingkat bukti. Susunan *repeat* sendiri dianalisis berdasarkan pola sekuens nukleotida yang berulang secara khas dan tersusun teratur dalam *CRISPR* array, yang menjadi dasar penting dalam penilaian keandalan sistem *CRISPR-Cas* (Couvin et al., 2018).

Berdasarkan hasil deteksi menggunakan *CRISPRCasFinder* pada Tabel 1, *O. acuminata* memiliki 80 unit *CRISPR* dengan total 338 *spacer*, sedangkan *S. cyanosphaera* hanya memiliki 8 unit *CRISPR* dengan 37 *spacer*. Jumlah ini menunjukkan bahwa *O. acuminata* mempunyai susunan array *CRISPR* yang lebih banyak dan lebih panjang dibandingkan *S. cyanosphaera*. Perbedaan juga terlihat

Tabel 1. Hasil deteksi unit-unit *CRISPR* menggunakan *CRISPRCasFinder*

Spesies Mikroba	Ukuran Genom (base pair)	Jumlah unit <i>CRISPR</i>	Jumlah <i>Spacer</i>	<i>Evidence</i> <i>Level</i> (1-4)
<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304 (Complete Genom)	7.689.443 bp	80	338	102
<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437 (Complete Genom)	5.041.209 bp	8	37	17

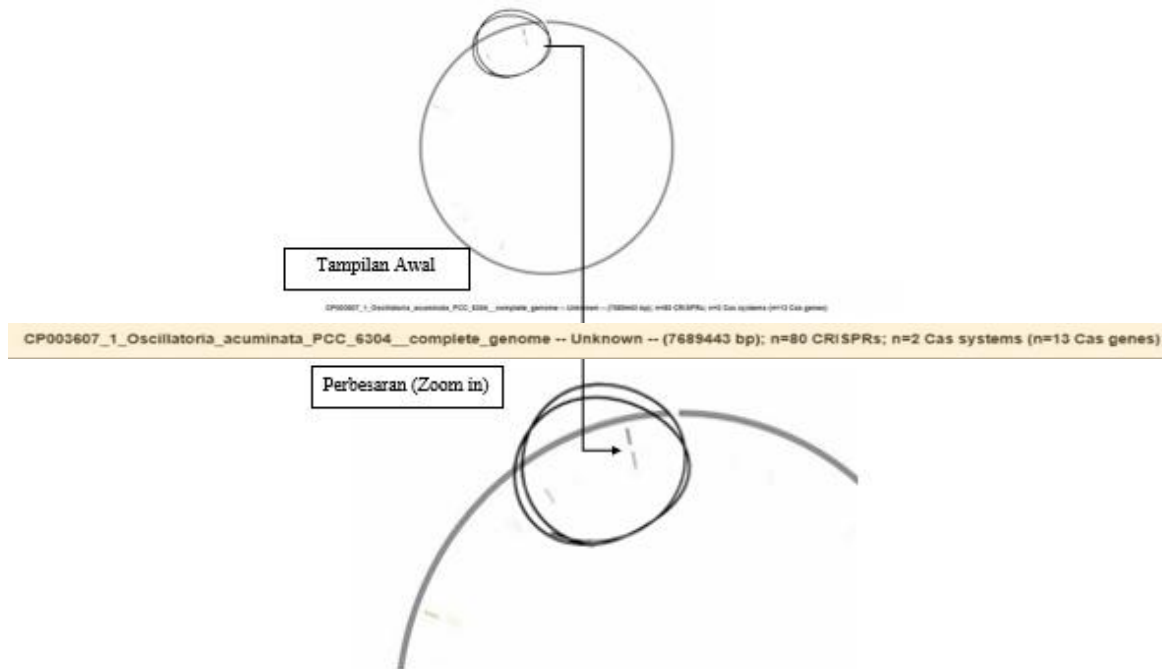
pada nilai *evidence level*, di mana *O. acuminata* memperoleh total nilai 102, sementara *S. cyanosphaera* hanya 17, yang mengindikasikan bahwa *O. acuminata* memiliki lebih banyak array CRISPR dengan tingkat keyakinan deteksi yang lebih tinggi. Secara keseluruhan, hasil ini menegaskan adanya perbedaan yang signifikan dalam jumlah unit CRISPR, jumlah *spacer*, dan kekuatan bukti sistem CRISPR-Cas antara kedua spesies sianobakteri tersebut.

Hasil deteksi jumlah unit CRISPR (Tabel 1) berbeda dengan yang dilaporkan oleh Pangemanan et al. (2023), dimana dengan perangkat *CRIPRCasFinder* yang sama, telah dioperasikan pada genom *Leptolyngbya* sp. PCC 7376 yang berukuran 5.125.950 bp terdeteksi ada 20 unit CRISPR dengan 36 *spacers*, lebih sedikit dari yang terdeteksi pada genom *Synechococcus* sp. PCC 7002 (3.008.047 bp) hanya 5 unit CRISPR dengan 17 *spacer*. Perbedaan jumlah *spacer* CRISPR antar spesies mikroba berkaitan erat dengan riwayat paparan terhadap virus dan elemen genetik asing di lingkungannya. *Spacer* berasal dari fragmen DNA virus atau elemen asing lain yang pernah menginfeksi sel, sehingga jumlah dan keragamannya dapat mencerminkan intensitas interaksi mikroba dengan ancaman genetik sepanjang proses evolusi. Semakin beragam paparan virus yang dialami suatu mikroba, semakin besar peluangnya untuk mengakumulasi *spacer* sebagai bagian dari mekanisme

pertahanan imun adaptif (Martynov et al., 2017).

Visualisasi Hasil Deteksi Unit CRISPR pada Genom *O. acuminata* dan *S. cyanosphaera*

CRISPRCasViewer menyediakan tiga jenis tampilan untuk menganalisis struktur dan variasi sistem CRISPR–Cas. *Linear View* (TnT) menampilkan susunan *repeat*, *spacer*, dan gen *cas* secara berurutan sehingga mudah ditelusuri. *Circular View* (*BioCircos*) menyajikan data dalam bentuk melingkar yang ringkas dan memudahkan pengamatan hubungan antar elemen genom dalam satu visualisasi. *Scatter Plot* (*Highcharts*) menampilkan hubungan antara dua parameter, seperti panjang sekuens atau tingkat konservasi, dalam bentuk diagram pencar. Kombinasi ketiga tampilan ini memberikan gambaran yang lebih menyeluruh dan membantu pemahaman kompleksitas sistem CRISPR–Cas. Pada tahap visualisasi, hasil yang ditampilkan hanya untuk satu mikroba sebagai representasi, sementara hasil analisis pada mikroba lainnya tetap dijelaskan secara rinci dalam pembahasan. Pada tampilan ini, genom dari *O. acuminata* PCC 6304 dengan panjang 7.689.943 bp ditampilkan dalam pembagian skala dalam kelipatan 1.000.000 pasangan (bp). Skala ini ditandai pada posisi 0 bp, 1,000,000 bp, dan seterusnya hingga mencapai 7,000,000 bp. Sebaliknya pada genom



Gambar 2. Visualisasi letak CRISPR dalam genom *S. cyanosphaera* dengan model *Linear View*

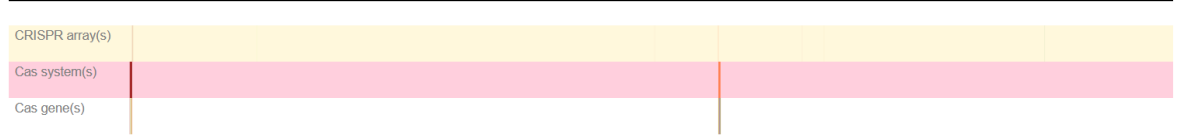
S. cyanosphaera PCC 7437 dengan panjang total 5.041.209 bp ditampilkan dalam interval skala 1.000.000 pasangan (bp), mulai dari posisi 0 bp hingga 5.000.000 bp. Pada Gambar 2 ada 1 garis yang berada di dalam lingkaran merupakan unit-unit CRISPR yang terdeteksi pada panjang genom tertentu. Tampilan ini juga menampilkan fitur yang memungkinkan pengguna mengubah ukuran frame sesuai kebutuhan.

Gambar 3 menampilkan visualisasi dengan tampilan Circular atau berbentuk melingkar. Tampilan ini hanya menampilkan bentuk lingkaran yang sederhana. Untuk melihat detailnya perlu dilakukan perbesaran dengan fitur zoom in, sehingga dapat terlihat dengan jelas unit-unit CRISPR yang terdeteksi dengan bentuk seperti garis-garis kecil.

Gambar 4 menampilkan letak CRISPR dalam bentuk *Scatter Plot* atau seperti grafik. Tampilan ini menunjukkan lokasi dimana CRISPR terdeteksi dari *CRISPRCasFinder*. Hasil temuan dari visualisasi dengan tampilan ini menunjukkan pada genom *O. acuminata* terdapat 80 unit CRISPR yang terdeteksi berawal dari 1.324.03 bp dan berakhir pada 7.581.814 bp, dan terdapat 2 sistem Cas. Sistem Cas yang pertama ada pada 6.238.808 bp dan yang kedua ada di 7.496.149 bp.

Gambar 5 menampilkan hasil visualisasi dalam bentuk *Scatter Plot* yang menunjukkan bahwa pada genom *S. cyanosphaera* terdapat 8 unit CRISPR yang tersebar mulai dari posisi 132.403 bp hingga 4.486.141 bp. Selain itu terdeteksi juga 2 sistem Cas, pada genom mikroba tersebut di posisi 512.235 bp dan 3.072.411 bp.

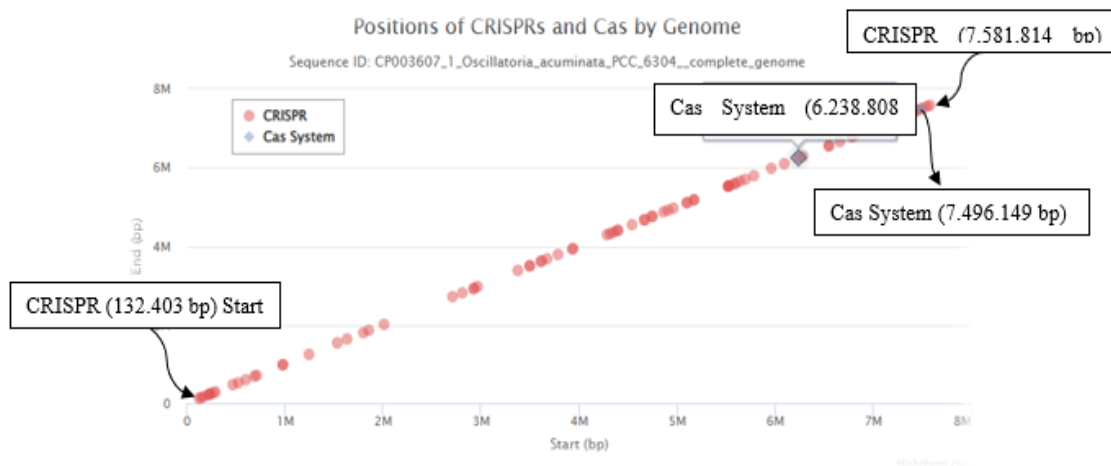
CP003653_1_Stanieria_cyanosphaera_PCC_7437__complete_genome -- Unknown -- (5041209 bp); n=8 CRISPRs; n=2 Cas systems (n=12 Cas genes)



CRISPR_Id*	Evidence Level	Start	End	Direction	Nb spacers	DR Consensus
1	4	534,533	535,100	+	7	CTCTATCTTTTGTAGAGAACTAATTGAATGGAAC
2	4	536,594	537,916	+	17	CTCTATCTTTTGTAGAGAACTAATTGAATGGAAC
3	1	1,074,051	1,074,159	ND	1	GATTGAACCTGTTCTGCTATTTCTACCA
4	1	2,796,866	2,796,970	ND	1	CCGACTCCTCCAATTAAGTATCA
5	4	3,071,543	3,072,157	ND	8	GTGATCAACGCCTAACGGCATCTAAGGTTAGTACAC
6	1	3,434,760	3,434,873	ND	1	TAAACCATTAGTCAAAGTTTGATTAATCTGCTCTA
7	1	3,529,794	3,529,902	ND	1	CTTTAGCTTGTACTAGAAGATGCACC
8	1	4,485,921	4,486,141	ND	1	CCAGTAAATTGCGTCTCATTTATAAAATTGCCGTTAATCCAA

*CRISPR_Id column content corresponds to the last number of the real CRISPR name (e.g. 1 corresponds to CP014688_1 for the sequence identified by "CP014688").

Gambar 3. Visualisasi letak CRISPR dalam genom *O. acuminata* dan *S. cyanosphaera* dengan tampilan *Circular*



Gambar 4. Visualisasi letak CRISPR dalam genom *O. acuminata* dengan Grafik *Scatter Plot*

Gambar-gambar di atas menampilkan rincian hasil deteksi dalam model *Scatter Plot*. Selain itu, informasi yang sama juga dapat ditemukan pada visualisasi *Linear View*, yang menunjukkan rincian posisi unit CRISPR dan sistem Cas secara sejajar pada genom.

• **CRISPR_Id**

Pada tampilan tabel di atas CRISPR_Idnya adalah "1". Kode ini digunakan untuk mengidentifikasi

setiap array CRISPR yang ditemukan dalam genom.

• **Evidence Level**

Tingkat keyakinan atau bukti terhadap keberadaan dan karakterisasi array CRISPR, levelnya mulai dari 1 hingga 4. Level 1 menunjukkan bukti paling rendah dan level 4 menunjukkan bukti paling tinggi. Level 4 menunjukkan bukti yang sangat tinggi mengenai keberadaan CRISPR (Couvin *et al.*, 2018).

CRISPR_Id*	Evidence Level	Start	End	Direction	Nb spacers	DR Consensus
1	1	132,403	132,488	ND	1	CACCCTTCAGGGTGC GG G T T T T T T A
10	1	523,242	523,357	ND	1	TAGGAGAGGGCCGGGGAGAGGTCTCTTG
11	1	603,093	603,201	ND	1	CCGGTTTCTGAACCTTTACCTAGA
12	1	690,793	690,903	ND	1	GGGCCTGCGCATTGCGCCCTACACATA
13	1	717,270	717,370	ND	1	GGAGGGCCGGAGAGGGGTCTCTCTAGGG

Gambar 5. Hasil Interpretasi CRISPR-Cas dari *CRISPRCasViewer*

- **Start**
Menunjukkan posisi atau letak awal dari *array* CRISPR dalam urutan genom. Posisi ini diukur dalam pasangan basa (*base pair*) dari awal kromosom. Dalam contoh ini, *array* dimulai pada posisi 132,403 bp.
- **End**
Posisi akhir *array* CRISPR dalam urutan genom pada tabel di atas yaitu 7.581.814 bp.
- **Direction**
Arah orientasi dari *array* CRISPR dalam genom. Arah ini bisa maju dan mundur. "ND" berarti '*Not Determined*' atau tidak ditentukan menunjukkan bahwa arahnya belum dipastikan atau ditentukan.
- **Nb spacer**
Nb spacer adalah jumlah *spacer* dalam *array* CRISPR. *Spacer* adalah urutan yang disisipkan antara urutan pengulangan *repeats* pada CRISPR. Dalam contoh ini, ada 338 *spacer*.
- **DR Consensus**
Direct Repeats (DR) adalah urutan yang sering muncul beberapa kali dalam urutan genetic dan berada diantara *spacer* (Makarova et al., 2020). Urutannya pada gambar diatas adalah "GTGTACTGATGCATGCATG".

Temuan CRISPR pada sianobakteri dari perairan Malalayang membuka peluang untuk eksplorasi lebih lanjut terkait

tipe-tipe CRISPR-Cas yang dapat menjadi acuan pengembangan teknologi pengeditan genom. Terobosan penerapan teknologi ini telah meluas ke berbagai bidang, termasuk bidang pertanian seperti yang dilaporkan baru-baru ini oleh Mansi dan Danai (2026) yang berperan penting dalam membentuk sistem pangan global, tangguh dan produktif untuk generasi mendatang. Tidak menutup kemungkinan penerapan teknologi CRISPR dalam bidang kelautan dapat memulihkan kondisi ekosistem terumbu karang.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelusuran dengan perangkat *CRISPRCasFinder* pada genom *O. acuminata* dengan panjang 7.689.443 bp dan genom *S. cyanosphaera* dengan panjang 5.041.209 bp, ternyata *O. acuminata* menunjukkan sistem CRISPR-Cas yang lebih kompleks, ditandai oleh keberadaan 80 unit CRISPR, 338 *spacer*, dan 2 sistem Cas, serta nilai *evidence level* total 102. Berbeda dengan sistem CRISPR pada genom *S. cyanosphaera* yang hanya memiliki 8 unit CRISPR, 37 *spacer*, dan 2 sistem Cas, dengan nilai *evidence level* total sebesar 17. Ke depan perlu analisis lanjut mengenai tipe dan karakteristik sistem CRISPR-Cas yang nantinya dapat dijadikan acuan pengembangan teknologi pengeditan genom.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kedua spesies mikroba yang digunakan merupakan hasil analisis metagenom dari penelitian skema Fundamental Reguler tahun 2024 yang didanai oleh Kementerian PendidikanTinggi, Riset dan Teknologi yang difasilitasi oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Sam Ratulangi dengan Kontrak Turunan No.1880/UN12.13/LT/2024 tertanggal 13Juni 2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Attar, S., Westra, E. R., Van Der Oost, J., Brouns, S. J. J. 2011. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs): The Hallmark of An Ingenious Antiviral Defense Mechanism in Prokaryotes. *Biological Chemistry*, 392(4), 277–289.
<https://doi.org/10.1515/BC.2011.042>
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E. P. C., Vergnaud, G., Gautheret, D., Pourcel, C. 2018. Crisprcasfinder, An Update of Crisfinder, Includes A Portable Version, Enhanced Performance and Integrates Search for Cas Proteins. *Nucleic Acids research*, 46(W1), W246–W251.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide Sequence of The Lap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of The Gene Product. *J Bacteriol*, 169(12),5429-5433.
<https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, R., Embden, J. D. A. Van Gastra, W., Schouls, L. M. 2002. Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Koonin, E. V., Makarova, K.S. 2022. Evolutionary Plasticity and Functional Versatility of CRISPR Systems. *PLoS Biol* 20(1), 1-19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001481>
- Ledford, H., Callaway, E. 2000. Pioneers Of Revolutionary CRISPR Gene Editing Win Chemistry Nobel. . News 07 October 2020. *Nature*, 586, 246-347.
<https://doi.org/10.1038/d41586-020-02765-9>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. 2020. Evolutionary Classification of CRISPR-Cas Systems. *In: R. Barrangou, E. J. Sontheimer, L. A. Marraffini (Eds.), CRISPR: Biology and Applications*. Academic Press. pp 1-293.
- Mansi, M., Danai, P. 2026. The Emerging Impact of CRISPR and Gene Editing on Global Crop Improvement. *Transgenic Research*, 35(1), 1–25.
- Martynov, A. V., Shah, S. A., Shabalina, S. A. 2017. Optimal Number of Spacers in CRISPR Arrays. *PLoS Computational Biology*, 13(2). 1-23.
- Pangemanan, T., Rumengan, I., Kemer, K., Rumengan, A., Ginting, E., Lintang, R., Sangari, J. 2023. Deteksi Unit-unit CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) pada Genom Beberapa Mikroba yang Berasosiasi dengan *Ascidia Laut*. *JURNAL BIOS LOGOS*, 13(2), 127–133.
<https://doi.org/10.35799/jbl.v13i2.48847>
- Rumengan, I. F. M., Wulur, S., Bara, R.A. 2024. Potensi Hepatoprotektor Senyawa Peptida Siklik dari Mikroba Endosimbion Pada *Ascidia Tunikata* di Perairan Sulawesi Utara (Laporan Akhir Riset Fundamental Regular DPP), Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi. 34 hal.
- Rumengan, I.F.M. 2021. Mikroba Laut sebagai Perangkat Penyuntingan Gen. *Dalam: Wullur, S. (Ed). Pengelolaan Sumberdaya Laut Berkelanjutan*. ISBN : 978-623-5790-

- 35-0. Lembaga Pengabdian dan Penelitian Masyarakat. pp 1-20.
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F., Koonin, E. V. 2015. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*, 60(3), 385–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10>.
- Takada Y. 1993. Vertical and Horizontal Distributions and Size Structures of Four Species of Limpets (*Notoacmea*) in Amakusa. *Venus. Japanese Journal of Malacolog*, 52(1), 77-85.
- Tomanek, L., Helmuth, B. 2002. Physiological Ecology of Rocky Intertidal Organisms: A Synergy of Concepts. *Integrative and Comparative Biology*, 42(4), 771–775. <https://doi.org/10.1093/ICB/42.4.771>
- Virgin, S. D. S., Schiel, D. R. 2023. Physiological Responses of Cooccurring Intertidal Limpets (*cellana* spp.) to Journal of Acute and Repeated Heat Stress. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 565, 151912. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2023.151912>
- Yulianda, F., Salamuddin Yusuf, M., Windy Prayogo, 2013. Zonation and Density of Intertidal Communities at Coastal Area of Batu Hijau, Sumbawa. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 5(2), 409–416. http://itk.fpik.ipb.ac.id/ej_itkt52