



ANALISIS GEN *tufA* SECARA *IN SILICO* UNTUK PRIMER IDENTIFIKASI MIKROALGA *TREBOUXIOPHYCEAE*

IN SILICO ANALYSIS OF *tufA* GENE FOR IDENTIFICATION PRIMERS OF *TREBOUXIOPHYCEAE*

Megga Ratnasari Pikoli^{1*}, Mahsa Nuraini Syahda¹, Festy Auliyaur Rahmah², Suharti³

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta
Jl. Ir. H. Juanda No. 95 Ciputat 15412

²Laboratorium Biologi Pusat Laboratorium Terpadu Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta
Jl. Ir. H. Juanda No. 95 Ciputat 15412

³Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Ilmu Komputer Universitas Pertamina
Jl. Teuku Nyak Arief, Simprug, Jakarta 12220

*Corresponding author: meggapikoli@uinjkt.ac.id

Naskah Diterima: 24 Oktober 2023; Direvisi: 8 November 2023; Disetujui: 14 November 2023

Abstrak

Penelitian belakangan ini menunjukkan bahwa di antara mikroalga yang memiliki kandungan lipid tinggi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku biodiesel, termasuk ke dalam kelas *Trebouxiophyceae*. Kesederhanaan sel dan bentuknya yang mudah berubah menjadikannya sulit diidentifikasi secara morfologis. Oleh karena itu, identifikasinya perlu didampingi dengan metode molekuler yang mengamplifikasi gen dengan *polymerase chain reactions* (PCR). Metode PCR membutuhkan primer yang membatasi area pada DNA yang akan diampifikasi. Gen yang berpotensi dijadikan penanda identifikasi adalah *tufA* karena memiliki urutan yang lestari. Penelitian ini bertujuan mengajukan primer berdasarkan gen *tufA* untuk identifikasi *Trebouxiophyceae*. Sekuen gen *tufA* dikumpulkan dari *database*, disejajarkan, dan diamati area yang lestari untuk diambil kandidat primer. Kemudian primer *forward* dan *reverse* dipasang-pasangkan sambil diperiksa untuk diperoleh kandidat dengan sifat-sifatnya terbaik. Ada 5 pasangan kandidat yang dihasilkan yang kemudian diperiksa spesifisitasnya dalam menjaring anggota genus dari *Trebouxiophyceae*, dan juga yang bukan *Trebouxiophyceae* (*Chlorophyceae* dan *Ulvophyceae*) sebagai pembanding. Pasangan primer yang terbaik diusulkan dari penelitian ini adalah pasangan primer *tufA*. Trebo1 yang terdiri atas primer *forward* 5'-GAAAGTGTTGCTGGTGATAATGTTGG-3' dan *reverse* 5'-GGAGTATGTCGACCACCTTCTTC-3' yang menjaring 75% *Trebouxiophyceae* di GenBank. Pasangan primer ini menjaring lebih banyak *Trebouxiophyceae* dibandingkan dengan primer *tufA* yang pernah dipublikasi, namun memerlukan optimasi kondisi PCR untuk meminimalkan potensi terjadinya struktur sekunder. Dengan demikian, area lestari pada gen *tufA* berpotensi dijadikan primer untuk identifikasi *Trebouxiophyceae*.

Kata Kunci: Identifikasi; Mikroalga; Primer PCR; *Trebouxiophyceae*; *tufA*

Abstract

Recent research showed that microalgae having high lipid content to be used as raw materials for biodiesel belong to the class *Trebouxiophyceae*. The simplicity of the cell and its easily changing shape make it difficult to identify morphologically. Therefore, its identification needs to be accompanied by molecular methods that amplify genes with *polymerase chain reactions* (PCR). The gene that could potentially be used as an identification marker is *tufA* because it has a conserved sequence. This study aims to propose a primer pair based on the *tufA* gene for the identification of *Trebouxiophyceae*. The sequences of the *tufA* gene were collected from a database of *Trebouxiophyceae*, aligned, and observed in conserved areas for primer candidates. Then the primary forward and reverse are mounted while checking for the candidate with the best properties. Five candidate pairs were produced, which were then tested for their specificity to bring in members of the *Trebouxiophyceae*, as well as non-*Trebouxiophyceae* (*Chlorophyceae* and *Ulvophyceae*) as comparisons. The best proposed primary pairs from this study were the primer pair *tufA*. Trebo1 which consists of the forward 5'-GAAAGTGTTGCTGGTGATAATGTTGG-3' and the reverse 5'-GGAGTATGTCGACCACCTTCTTC-3' that capture 75% of the *Trebouxiophyceae* in the GenBank. This primer pair contains more *Trebouxiophyceae* than any previously published *tufA* primer but requires optimization of PCR conditions to minimize the occurrence of secondary structures. Therefore, the conserved area in the *tufA* gene has the potential to be used as a primer for identifying *Trebouxiophyceae*.

Keywords: Identification; Microalgae; PCR Primer; *Trebouxiophyceae*, *tufA*

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i2.1.35458>

PENDAHULUAN

Belakangan ini mikroalga banyak diteliti sebagai bahan baku biodiesel yang menjanjikan. Biodiesel membutuhkan kandungan lipid dalam bahan biologis yang menjadi sumbernya, dan mikroalga memiliki kandungan lipid yang mencapai lebih dari 50% (Ghosh et al., 2016; Milano et al., 2016; Shuba & Kifle, 2018; Yee, 2016). Penelitian yang mengeksplorasi mikroalga dari air danau Situ Gintung dan Situ Pamulang, Tangerang Selatan, Indonesia, memperoleh jenis-jenis mikroalga yang di antaranya mengandung lipid lebih dari 60%. Setelah melalui upaya identifikasi secara morfologi dan molekuler berdasarkan gen 23S rRNA, dua spesies di antara mikroalga yang unggul dari penelitian tersebut teridentifikasi sebagai *Micractinium conductrix* dan *Choricystis parasitica* (Pikoli et al., 2019). Keduanya merupakan anggota dari kelas *Trebouxiophyceae*.

Trebouxiophyceae telah digunakan dalam produksi biodiesel yang berkelanjutan karena keanekaragamannya yang luas dan kemudahan budi dayanya. Berbagai penelitian terkini menunjukkan keunggulan anggota-anggota dari *Trebouxiophyceae*. Sebagai contoh, *Parachlorella kessleri*, anggota dari *Trebouxiophyceae* di laut, mengakumulasi lipid di lingkungan miskin nutrisi (Shaikh et al., 2019). *Micractinium reisseri* mudah dipelihara dalam medium yang mengandung limbah organik tebu dan menghasilkan asam-asam lemak berkualitas tinggi (El-Sheekh et al., 2020). *Choricystis minor* var. *minor* telah dipandang sebagai sumber biomassa yang menjanjikan karena kandungan lipidnya yang tinggi dan karakteristik metil ester asam lemak yang memuaskan (Oliveira et al., 2021). Contoh-contoh tersebut menunjukkan pentingnya potensi *Trebouxiophyceae*, dan membenarkan upaya untuk menemukan spesies-spesies lain dengan sifat-sifat yang lebih potensial. Oleh karena itu, identifikasi mikroalga menjadi suatu kebutuhan agar pengembangan lebih lanjut menjadi lebih mudah dan dapat dikembangkan dalam skala besar.

Identifikasi *Trebouxiophyceae* dapat ditempuh melalui pengamatan morfologi sel dan mengetahui sekuen gen yang khas. Identifikasi morfologi memiliki tantangan dalam hal tersedianya mikroskop yang mumpuni untuk dapat menangkap struktur internal yang khas. Selain itu, fenotip yang ditunjukkan cenderung sederhana dan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Krivina et al., 2022; Pröschold & Darienko, 2020). Sementara itu, identifikasi molekuler dapat memberikan hasil yang lebih presisi karena tidak bias oleh kondisi lingkungan.

Identifikasi molekuler dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang mengamplifikasi sekuen gen penanda. *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) mengusulkan bahwa identifikasi molekuler dilakukan menggunakan satu pasang primer yang dapat diterapkan pada berbagai organisme dalam suatu kelompok dan memiliki tingkat variasi yang cukup untuk membedakan antar anggota kelompok ini (CBOL Plant Working Group, 2009). Pasangan primer yang pernah dipublikasikan tidak didesain secara khusus untuk mengamplifikasi anggota-anggota dalam kelas *Trebouxiophyceae*. Oleh karena itu, pasangan primer merupakan suatu kebutuhan dalam identifikasi molekuler *Trebouxiophyceae*.

Salah satu gen yang berpotensi untuk dijadikan penanda bagi divisi *Chlorophyta* adalah gen kloroplas *tufA* (Hall et al., 2010; Kazi et al., 2013; Saunders & McDevit, 2012). Gen *tufA* bersifat lestari (*conserved*) di berbagai organisme (Kirkendale et al., 2013). Gen ini memberikan hasil yang baik, yaitu dapat menjadi pembeda, saat digunakan sebagai penanda untuk *Chlorophyta* dari kelas *Ulvophyceae* (Famà et al., 2002; Lawton et al., 2013; Wynne et al., 2009), dan kelas *Chlorophyceae* (Vieira et al., 2016). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menemukan dan mengusulkan pasangan primer berdasarkan gen *tufA* yang spesifik untuk kelas *Trebouxiophyceae*, disertai *benchmarking* dengan primer *tufA* lain yang pernah dipublikasi. Primer yang dihasilkan diharapkan dapat membantu identifikasi *Trebouxiophyceae* sehingga memangkas waktu penelitian untuk mengenal sifat-sifat lainnya.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan komputer yang mengakses internet ke dalam pangkalan data dan menjalankan program. Pangkalan data yang digunakan adalah GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Sayers et al., 2019), dan sekuen primer gen *tufA* yang diperoleh dari berbagai penelitian terdahulu. Program yang digunakan adalah Unipro

UGENE ver. 44 (Okonechnikov et al., 2012), *Primer Designing Tool* (Primer BLAST) dari NCBI (Ye et al., 2012), dan OligoAnalyzer dari Integrated DNA Technology (<https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Pengambilan Data Sekuen Gen tufA dari Kelas *Trebouxiophyceae*

Sekuen gen tufA dari berbagai spesies *Trebouxiophyceae* dicari di GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pada kolom *Search* dengan mengetik kata kunci tufA *Trebouxiophyceae*, dan diunduh dengan format FASTA (fasta). Seluruh data yang muncul sampai dengan 30 Juli 2023 digunakan, kecuali data-data yang sama (*redundant*). Dengan memberi tanda centang pada perwakilan dari masing-masing spesies atau genus, hasil pencarian dipilih. Setelah itu, menu *Send to* dipilih untuk menyimpan sekuen. Kemudian *File* dipilih sebagai destinasi, dengan FASTA sebagai format, dan opsi *Sort by* dibiarkan mengikuti *default*. Terakhir, tombol *Create File* ditekan.

Penjajaran Sekuen Gen tufA *Trebouxiophyceae*

Seluruh sekuen gen tufA dari berbagai spesies *Trebouxiophyceae* yang telah diunduh dalam format FASTA dibuka dalam Unipro UGENE v45.0 untuk disejajarkan dengan MUSCLE. Penyejajaran dilakukan dengan prosedur sebagai berikut: pada halaman awal Unipro UGENE dipilih *Open File(s)*, kemudian file FASTA sekuen gen tufA dipilih untuk dibuka. Semua sekuen dipilih, dan ditekan opsi *Align with MUSCLE*, dan pengaturan penyejajaran bekerja sesuai *default*. Pengaturan *Colors Appearance* diganti dengan *Percentage Identity (grey)* agar daerah sekuen sejajar dengan tingkat homologi tinggi mudah diamati melalui tampilan warna yang semakin gelap dibandingkan dengan yang tingkat homologi rendah.

Perancangan Primer Gen tufA *Trebouxiophyceae* dan Analisis Spesifisitasnya

Pada daerah sekuen dengan tingkat homologi yang tinggi (*highly conserved*), 18–30 basa nukleotida diambil pada ujung-ujung kanan dan kiri, dengan mempertimbangkan panjang sekuen dan komposisi basa nukleotidanya. Sekuen basa nukleotida yang berada di ujung kiri dibiarkan sesuai sekuennya untuk menghasilkan primer *forward*, sedangkan yang di ujung kanan diubah menjadi sekuen komplemen berbalik (*reverse complement*) untuk menghasilkan primer *reverse*. Kandidat-kandidat primer *forward* dan *reverse* dipasang satu sama lain. Hasil sekuen primer *forward* dan *reverse* diperiksa spesifisitasnya menggunakan Primer BLAST dari NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Opsi pada kolom *Primer Pair Specificity Checking Parameters* diubah menjadi *nr*, opsi pada *Organism* diubah menjadi *Trebouxiophyceae* (taxid:75966). Hal yang sama dilakukan dengan *Chlorophyceae* (taxid:3166) dan *Ulvophyceae* untuk dilakukan perbandingan, kemudian pengaturan lainnya dibiarkan mengikuti *default*. Sifat-sifat primer yang diperoleh dicatat, yaitu *Length*, *Tm*, *GC%*, *Self complementarity*, dan *Self 3' complementarity*. Jumlah produk yang didapatkan dari *Trebouxiophyceae* target ditampilkan berupa nomor akses, nama genus atau spesies, dan panjang produk yang dihasilkan. Jumlah genus yang terjaring juga dihitung persentasenya dari jumlah seluruh genus dalam *Trebouxiophyceae* yang gen tufA-nya terdaftar pada GenBank. Selain itu, struktur sekunder primer seperti *Hairpins*, *Self-Dimer*, dan *Heterodimer* dari pasangan primer diperiksa menggunakan OligoAnalyzer dari IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Seluruh sifat yang dicatat dianalisis berdasarkan pada parameter primer yang baik, antara lain kandungan GC 40–60%, panjang primer 18–30 bp, dan minim struktur sekunder (Utomo et al., 2019), dan dibandingkan dengan spesifisitas primer tufA mikroalga yang telah dipublikasikan.

Pengambilan Data Sekuen Primer tufA yang Pernah Dipublikasi

Primer tufA *Trebouxiophyceae* yang dihasilkan, dibandingkan dengan primer tufA dari berbagai publikasi untuk keperluan *benchmarking*, karena belum ada primer tufA yang dikhususkan untuk kelas ini. Primer *benchmarking* antara lain merupakan primer yang dapat mengamplifikasi gen tufA dari ordo *Prasiolales*, *Watanabeales*, famili *Chlorellaceae*, genus *Caulerpa*, dan sebagainya. Pengambilan publikasi dilakukan dengan mengakses Google Scholar (<https://scholar.google.com/>),

dengan kata kunci "primer tufA". Data sekuen primer tufA dari publikasi diperiksa seperti halnya yang dilakukan pada kandidat primer dari penelitian ini.

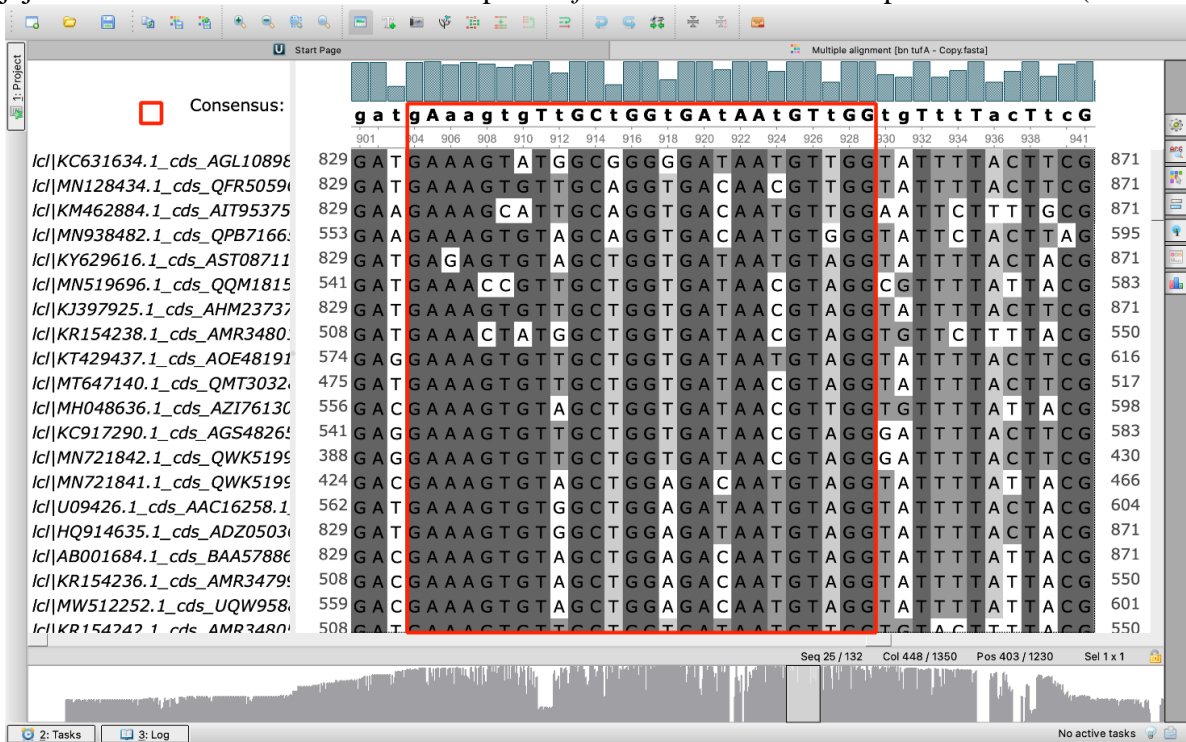
Analisis Data

Sifat-sifat kandidat primer diperiksa secara deskriptif. Ini mencakup penjelasan tentang rancangan primer tufA *Trebouxiophyceae* yang baru, evaluasi spesifisitasnya berdasarkan kemampuan penjarangan dan parameter primer yang baik, dan perbandingan dengan primer dari berbagai publikasi.

HASIL

Data Sekuen Gen tufA *Trebouxiophyceae* dan Kandidat Primer

Pencarian pada Gen tufA *Trebouxiophyceae* GenBank NCBI menghasilkan 475 sekuen yang masih bersifat data mentah (mencakup sekuen yang berulang, *uncultured species*, dan *hypothetical protein*). Setelah diseleksi, data bersih yang diperoleh adalah 134 sekuen. Hasil penjarangan ke-134 sekuen tampak adanya area lestari (Gambar 1). Kandidat primer yang diperoleh berdasarkan penjarangan 134 sekuen adalah 4 kandidat primer *forward* dan 4 kandidat primer *reverse* (Tabel 1).



Gambar 1. Contoh area lestari dari penjarangan 134 sekuen gen tufA *Trebouxiophyceae* pada UGENE. Kotak merah menunjukkan area sekuen yang diambil sebagai kandidat primer *Forward*1

Tabel 1. Kandidat primer *forward* dan *reverse* gen tufA untuk kelas *Trebouxiophyceae*

Nama kandidat	Nomor basa*	Sekuen primer (5' → 3')	Panjang (basa)	%GC
<i>Forward</i> 1	904–929	GAAAGTGTGCTGGTGATAATGTTGG	26	42,3
<i>Forward</i> 2	561–578	TGGATCTGCTCTTTTAGC	18	44,4
<i>Forward</i> 3	694–713	CCAActCCAGAACGTGATAC	20	50
<i>Forward</i> 4	704–722	GAACGTGATACAGATAAACC	20	40
<i>Reverse</i> 1	1045–1067	GGAGTATGTCGACCACCTTCTTC	23	52,2
<i>Reverse</i> 2	758–776	GCAACAGTACCACGACCAG	19	57,9
<i>Reverse</i> 3	967–984	TGCTAAAACCATTCCTCG	18	44,4
<i>Reverse</i> 4	988–1006	GAGGTGTAATAGTACCAGG	19	47,4

Keterangan: *nomor basa nukleotida didasarkan pada sekuen terpanjang (1275 basa) dari *Pseudochloris wilhelmii* (KM462886.1)

Spesifisitas Kandidat Primer Gen tufA

Kandidat-kandidat primer setelah dipasangkan satu sama lain menghasilkan 5 pasangan kandidat terbaik, yang kemudian diperiksa spesifisitasnya dalam menjaring anggota dari *Trebouxiophyceae* (Tabel 2).

Tabel 2. Spesifisitas kandidat primer tufA dalam menjaring *Trebouxiophyceae* dari penelitian ini dan penelitian lain sebagai *benchmarking*

Pasangan primer	Jumlah genus terjaring	Presentase genus terjaring (%) [*]	Panjang produk (basa)	Sumber
Pasangan tufA.Trebo1 <i>Forward 1</i> <i>Reverse 1</i>	42	75	±164	Penelitian ini
Pasangan tufA.Trebo2 <i>Forward 2</i> <i>Reverse 2</i>	20	35,71	198–216	Penelitian ini
Pasangan tufA.Trebo3 <i>Forward 3</i> <i>Reverse 3</i>	25	44,64	263–282	Penelitian ini
Pasangan tufA.Trebo4 <i>Forward 4</i> <i>Reverse 3</i>	27	48,21	±273	Penelitian ini
Pasangan tufA.Trebo5 <i>Forward 4</i> <i>Reverse 4</i>	20	35,71	±295	Penelitian ini
tufGF4-tufAR	30	53,57	902–929	Heesch et al. (2016), Moniz et al. (2014), Saunders dan Kucera (2010), Sharma et al. (2020), serta Vieira et al. (2016)
tufAF-tufAR	8	14,28	±975	Famà et al. (2002), Hall et al. (2010), Li et al. (2020; 2021), dan Liu et al. (2016)
tufA.50F-tufA.870R	1	1,78	±832	Hall et al. (2010)
TufAf-TufAr	32	57,14	691–710	Tartar dan Boucias (2004)

Keterangan: ^{*}dari 56 genus pada kelas *Trebouxiophyceae* yang tersedia di GenBank

Spesifisitas dari pasangan kandidat primer terhadap kelas *Trebouxiophyceae* diuji lebih lanjut dengan membandingkan jumlah genus yang terjaring dari kelas *Trebouxiophyceae* dengan kelas *Chlorophyceae* dan *Ulvophyceae* (Tabel 3). Jumlah genus *Trebouxiophyceae* yang terbanyak diperoleh dari pasangan tufA.Trebo1.

Tabel 3. Perbandingan perolehan genus dari kelas *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyceae*, dan *Ulvophyceae* oleh kandidat pasangan primer gen tufA *Trebouxiophyceae*

Pasangan primer	<i>Trebouxiophyceae</i>		<i>Chlorophyceae</i>		<i>Ulvophyceae</i>	
	Jumlah genus	Presentase (%)	Jumlah genus	Presentase (%)	Jumlah genus	Presentase (%)
Pasangan tufA.Trebo1	42	75	58	51,33	30	31,25
Pasangan tufA.Trebo2	20	35,71	27	23,89	18	18,75
Pasangan tufA.Trebo3	25	44,64	31	27,43	17	17,71
Pasangan tufA.Trebo4	27	48,21	62	54,87	24	25
Pasangan tufA.Trebo5	20	35,71	49	43,36	16	16,67

Sifat-sifat Kandidat Primer Gen tufA *Trebouxiophyceae*

Sifat-sifat kandidat pasangan primer selain GC% diperiksa karena dapat memengaruhi kinerja primer dalam menghasilkan produk PCR, yaitu *melting temperature* (Tm), *self-dimer*, *hairpins*, *heterodimer*, dan *repeats and runs*. Sifat-sifat dari lima pasang kandidat primer dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sifat-sifat kandidat primer gen tufA *Trebouxiophyceae*

Pasangan primer	Panjang (basa)	GC%	Tm (°C)	<i>Self-Dimer</i>	<i>Hairpins</i> (kcal/mol)	<i>Heterodimer</i> (kcal/mol)	<i>Repeats & runs</i>
Pasangan tufA.Trebo1	<i>Forward</i> 1 26	42,31	61,28	12 (maks.ΔG - 3,14; 2 bp)	3 (maks.ΔG 0,15)	18 (maks.ΔG - 6,37; 4 bp)	-
	<i>Reverse</i> 1 23	52,17	60,43	13 (maks.ΔG - 9,45; 6 bp)	6 (maks.ΔG 0,18)	-	-
Pasangan tufA.Trebo2	<i>Forward</i> 2 18	44,4	51,54	8 (maks.ΔG - 4,74; 3 bp)	1 (maks.ΔG - 1,67)	13 (maks.ΔG - 5,09; 3 bp)	Run:T (4)
	<i>Reverse</i> 2 19	57,9	58,47	6 (maks.ΔG - 3,65; 4 bp)	3 (maks.ΔG 0,92)	-	-
Pasangan tufA.Trebo3	<i>Forward</i> 3 20	50	55,89	10 (maks.ΔG - 6,3; 4 bp)	2 (maks.ΔG - 0,16)	13 (maks.ΔG - 3,61; 2 bp)	-
	<i>Reverse</i> 3 18	44,4	52,23	8 (maks.ΔG - 3,61; 2 bp) 3'	2 (maks.ΔG 0,64)	Run:A (4)	-
Pasangan tufA.Trebo4	<i>Forward</i> 4 20	40	51,46	10 (maks.ΔG - 6,3; 4 bp)	5 (maks.ΔG 0,71)	15 (maks.ΔG - 3,61; 2 bp)	-
	<i>Reverse</i> 3 18	44,4	52,23	8 (maks.ΔG - 3,61; 2 bp)	2 (maks.ΔG 0,64)	Run:A (4)	-
Pasangan tufA.Trebo5	<i>Forward</i> 4 20	40	51,46	10 (maks.ΔG - 6,3; 4 bp)	5 (maks.ΔG 0,71)	14 (maks.ΔG - 4,41; 3 bp)	-
	<i>Reverse</i> 4 19	47,4	51,06	8 (maks.ΔG - 4,41; 3 bp)	2 (maks.ΔG 1,25)	-	-

PEMBAHASAN

Sekuen gen tufA *Trebouxiophyceae* yang diperoleh dari GenBank beragam terdiri dari sekuen gen utuh maupun parsial. DNA parsial dalam pengenalan dan identifikasi jenis dapat digunakan, misalnya pada identifikasi mikroalga jenis baru dari tanah ekstrem alkali (Qiao et al., 2015) dan mikroalga dari efluen reaktor biogas (Tale et al., 2014), dengan menggunakan gen lain. Oleh karena itu, data sekuen gen tufA *Trebouxiophyceae*, baik utuh maupun parsial, seluruhnya sejumlah 134 diujarkan bersama (Gambar 1).

Panjang kandidat primer berkisar antara 18–26 basa (Tabel 1). Ukuran panjang ini masih dalam kisaran umum panjang primer, yaitu 18–30 basa (Utomo et al., 2019). Namun demikian, panjang 26 basa melebihi ukuran yang menurut Ebertz (2022), panjang maksimum primer untuk amplifikasi yang ideal adalah 24 basa. Primer yang panjang memiliki laju hibridisasi yang lebih lambat dan peluang penempelan yang lebih rendah ke sekuen *template* yang diinginkan. Risiko hibridisasi yang lebih lambat meningkat bila primer lebih panjang dari 30 pasangan basa. Dengan demikian panjang primer 26 masih bisa digunakan, meskipun bukan ukuran ideal.

Persentase basa guanin dan sitosin (%GC) dari kandidat primer yang dihasilkan pada penelitian ini berkisar antara 40–57,9% (Tabel 1). Presentase dari seluruh kandidat tersebut sudah sesuai dengan aturan umum yang diikuti oleh sebagian besar program desain primer, yaitu 40–60%. %GC pada kisaran tersebut menjaga kekuatan penempelan dengan target karena basa G dengan komplemennya C, dan sebaliknya, membentuk tiga ikatan hidrogen (Ebertz, 2022).

Spesifisitas primer yang dirangkum pada Tabel 2 adalah kemampuan primer untuk mengamplifikasi target yang dituju secara tepat dan spesifik, dalam hal ini pada gen tufA *Trebouxiophyceae*. Spesifisitas dan efisiensi primer PCR adalah faktor utama yang menentukan

keandalan PCR (Yang et al., 2020). Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan primer untuk kelas *Trebouxiophyceae* yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi sebanyak mungkin anggota dalam kelas ini, setidaknya lebih dari setengah jumlah genus yang diidentifikasi. Oleh karena itu, jumlah genus yang dapat diterima oleh masing-masing pasangan kandidat primer dihitung. Kandidat primer tufA1 yang dihasilkan pada penelitian ini menjaring 75% dari *Trebouxiophyceae* yang ada di GenBank, yang lebih banyak daripada perolehan dari kandidat primer lain dan primer dari penelitian lain (Tabel 2). Empat kandidat primer lainnya tidak dapat menjaring lebih dari 50% genus *Trebouxiophyceae* yang terdaftar di GenBank. Sementara itu, primer tufGF4-tufAR yang digunakan oleh peneliti-peneliti lain untuk alga laut tidak menjaring lebih banyak *Trebouxiophyceae* (53,57%) (Heesch et al., 2016; Moniz et al., 2014; Saunders & Kucera, 2010; Vieira et al., 2016). Selain karena primer tersebut tidak dirancang secara khusus untuk kelas *Trebouxiophyceae*, spesifisitas yang rendah dapat terjadi karena gen tufA masih memiliki tingkat evolusi menengah menurut Sáez et al. (2008), sehingga tidak mudah membuat sebuah primer yang dapat menjaring seluruh genus tersebut sekaligus. Dengan demikian, pasangan primer tufA.Trebo1 merupakan kandidat yang paling diperhitungkan dalam spesifisitas terhadap *Trebouxiophyceae*.

Perkiraan panjang amplicon (produk PCR) yang dihasilkan dari kelima kandidat pasangan primer adalah sekitar 164–295 pasang basa. Kisaran tersebut termasuk ke dalam kisaran amplicon 100–800 pasang basa yang paling efisien untuk analisis sekuensing menggunakan metode Sanger (Crossley et al., 2020). Sementara itu, pasangan primer tufGF4-tufAR dan tufAF-tufAR dari penelitian-penelitian lain menghasilkan amplicon lebih dari 800 pasang basa, yang dikhawatirkan menyebabkan analisis sekuensing kurang efisien.

Selain diperiksa spesifisitas terhadap kelas *Trebouxiophyceae*, kandidat pasangan primer diperiksa dalam menjaring genus dari kelas *Chlorophyceae* dan *Ulvophyceae* (Tabel 3). *Ulvophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyceae* (*UTC Clade*) merupakan tiga dari sebelas kelas dalam *Chlorophyta*, yang ketiga kelas tersebut bersama dengan kelas *Pedinophyceae* dan *Chlorodendrophyceae* membentuk kumpulan monofiletik yang disebut *Core Chlorophyta* (Fang et al., 2017). *UTC Clade* merupakan *Core Chlorophyta* yang paling banyak dipelajari karena keanekaragaman spesiesnya yang besar dan kepentingan ekologisnya (Gulbrandsen et al., 2021). Pasangan kandidat primer dari penelitian ini diharapkan minim, atau bahkan tidak sama sekali menjaring genus-genus dari kelas *Chlorophyceae* dan *Ulvophyceae* yang memiliki kekerabatan dekat dengan *Trebouxiophyceae*. Pada GenBank data gen tufA berada dalam 113 genus dari kelas *Chlorophyceae* dan 96 genus dari kelas *Ulvophyceae*, yang digunakan untuk menghitung persentase genus dari setiap kelas. Hasil pemeriksaan spesifisitas menunjukkan bahwa kandidat pasangan primer 1, 2, dan 3 menjaring *Trebouxiophyceae* dengan persentase genus lebih tinggi daripada *Chlorophyceae* dan *Ulvophyceae*, sesuai dengan yang diinginkan.

Sifat-sifat kelima kandidat primer yang tertera pada Tabel 4 menunjukkan mereka memiliki kelebihan tersendiri dan keterbatasan. *Melting temperature* (T_m) yang merupakan suhu untuk separuh primer dupleks mengalami lepas ikatan, pada seluruh pasangan primer telah sesuai dengan kriteria, yaitu 50–65 °C (Utomo et al., 2019). T_m yang optimal untuk mempertahankan spesifisitas primer adalah 54 °C atau lebih tinggi (54–65 °C) (Ebertz, 2022). Selain itu, selisih T_m dari primer *forward* dan *reverse* suatu pasangan primer diharapkan tidak ada atau dalam rentang 2 sampai 4 °C saja (Utomo et al., 2019). Oleh karena itu, kandidat pasangan primer tufA.Trebo1 dianggap paling ideal berdasarkan T_m , yaitu 61,28 °C pada primer *forward* dan 60,43 °C pada primer *reverse*.

Struktur sekunder yang diperiksa pada kandidat pasangan primer merupakan potensi terjadinya lipatan, lingkaran, atau penempelan pada sesamanya, yang mengurangi kesempatan penempelan primer pada *template*, sehingga sebaiknya dihindari dalam pembuatan suatu primer. Stabilitas struktur sekunder ditentukan oleh energi bebasnya (ΔG), yang semakin bernilai negatif semakin kuat atau stabil struktur tersebut. Dimer merupakan struktur sekunder yang terjadi oleh penempelan suatu primer dengan primer lainnya, yang bisa berupa penempelan primer sejenis (*self-dimer*) atau penempelan dengan pasangannya (*heterodimer*).

Kelima kandidat pasangan primer memiliki potensi terjadi dimer (Tabel 4). Kandidat primer *reverse* 1 menunjukkan potensi terbentuk 13 struktur *self-dimer* dengan energi bebas tertinggi (-9,45

kcal/mol), juga kandidat pasangan 1 menunjukkan potensi terbentuk 18 struktur *heterodimer* dengan energi bebas tertinggi pula (-6,37 kcal/mol). Namun demikian, adanya potensi dimer sulit dihindari karena dimer juga didapati pada primer tufA pada penelitian lain. Potensi *self-dimer* pada primer tufAR, tufA.870R, dan TufAr memiliki energi bebas terbesar berturut-turut senilai -17,4; -6,21; dan -6,3 kcal/mol. Meskipun energi dimer tersebut besar, dimer dapat dicegah melalui penambahan bahan tertentu ke dalam reaksi PCR atau memodifikasi proses PCR, misalnya dengan *hot start* PCR yang menahan komponen penting PCR sampai suhu naik ke titik di mana dupleks primer-primer dan dupleks primer di luar target telah meleleh (Green & Sambrook, 2018).

Struktur sekunder *hairpins* adalah interaksi intramolekul primer yang terdiri dari tiga atau lebih nukleotida di dalam primer yang saling berpasangan basa saat *annealing*. *Hairpins* dapat menyebabkan terbentuknya ampikon yang tidak spesifik atau bahkan tidak ada (Singh & Singh, 2000 dalam (Ebertz, 2022)). *Hairpins* dapat ditoleransi jika $\Delta G = -2$ kcal/mol pada ujung 3' primer, atau $\Delta G = -3$ kcal/mol terjadi di bagian tengah (Utomo et al., 2019). Kelima kandidat pasangan primer berpotensi membentuk *hairpins*, tetapi tidak ada energi bebas yang melebihi batas toleransi.

Sifat lain yang diperiksa dari kandidat pasangan primer adalah *runs*, yaitu pengulangan basa yang sama secara berurutan, yang sebaiknya dihindari lebih dari 3 basa. Adanya 4 basa T berurutan pada primer *forward* 2 dan 4 basa A berurutan pada *reverse* 3 yang merupakan *runs* menjadikan tidak memenuhi kriteria primer yang diharapkan. Adapun pengulangan dua basa yang sama secara berurutan disebut *repeats*, yang dapat menyebabkan penempelan primer di tempat yang bukan sasaran (*mispriming*). Tidak ditemukan *repeats* pada kelima kandidat pasangan primer.

Hasil dari analisis secara keseluruhan, kandidat pasangan primer yang terbaik dari penelitian ini adalah pasangan tufA.Trebo1. Jika pasangan tufA1 dibandingkan dengan pasangan primer yang menghasilkan penjarangan terbaik dari yang pernah dipublikasi, yaitu tufAF-tufAR (Tabel 2), keduanya sama-sama memiliki kelemahan pada struktur dimer. Namun tufAF-tufAR telah berhasil digunakan dalam reaksi PCR secara *in vitro* (meskipun bukan untuk *Trebouxiophyceae*) dalam berbagai penelitian. Hal ini menunjukkan bahwa potensi terjadinya struktur dimer dapat diatasi dengan optimasi kondisi PCR seperti pada penelitian-penelitian yang menggunakan pasangan primer tersebut. Struktur sekunder yang potensial terbentuk pada kandidat pasangan primer tufA.Trebo1 dapat diatasi pula melalui strategi yang sama. Oleh karena itu, primer yang didesain pada penelitian ini diharapkan menjadi alternatif bagi primer yang pernah dipublikasi, tetapi lebih spesifik dalam mengidentifikasi mikroalga dari kelas *Trebouxiophyceae*.

SIMPULAN DAN SARAN

Pasangan primer diusulkan untuk identifikasi *Trebouxiophyceae* dari penelitian ini adalah pasangan primer tufA.Trebo1 *forward* 5'-GAAAGTGTGCTGGTGATAATGTTGG-3' dan *reverse* 5'-GGAGTATGTCGACCACCTTCTTC-3'. Pasangan primer tersebut dapat menjarang 75% *Trebouxiophyceae*, dengan panjang produk sebesar 164 pasang basa. Struktur dimer yang kemungkinan muncul pada proses PCR masih dapat diatasi dengan optimasi kondisi PCR.

Pasangan primer perlu diuji dalam amplifikasi-PCR (secara *in vitro*), disertai dengan optimasi kondisinya, produk PCR dari gen ini diverifikasi dengan sekuensing, dan organismenya diverifikasi dengan *next generation sequencing* (NGS).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta atas Pembiayaan Penelitian melalui Keputusan Kuasa Pengguna Anggaran No. UN.01/KPA/1141/2022.

REFERENSI

- CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants Communicated by. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., ... Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767-775. doi: 10.1177/1040638720905833.

- Ebertz, A. (2022). *Primer design guide – the top 5 factors to consider for optimum performance*. Retrieved from <https://the-dna-universe.com/2022/09/05/primer-design-guide-the-top-5-factors-to-consider-for-optimum-performance/>.
- El-Sheekh, M. M., El-Mohsnawy, E., Mabrouk, M. E. M., & Zoheir, W. F. (2020). Enhancement of biodiesel production from the green microalga *Micractinium reisseri* via optimization of cultivation regimes. *Journal of Taibah University for Science*, 14(1), 437-444. doi: 10.1080/16583655.2020.1745505.
- Famà, P., Wysor, B., Kooistra, W. H., & Zuccarello, G. C. (2002). Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (*Caulerpales*, *Chlorophyta*) inferred from chloroplast *tufA* gene. *Journal of Phycology*, 38, 1040-1050.
- Fang, L., Leliaert, F., Zhang, Z. H., Penny, D., & Zhong, B. J. (2017). Evolution of the *Chlorophyta*: Insights from chloroplast phylogenomic analyses. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 322-332. doi: 10.1111/jse.12248.
- Ghosh, A., Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Saini, S., ... Gayen, K. (2016). Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: A review. *Energy Conversion and Management*, 113, 104-118. doi: 10.1016/j.enconman.2016.01.050.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Hot start polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5), 346-349. doi: 10.1101/pdb.prot095125.
- Gulbrandsen, S., Andresen, I. J., Krabberød, A. K., Br, J., & Shalchian-Tabrizi, K. (2021). Phylogenomic analysis restructures the *Ulvophyceae*. *Journal of Phycology*, 57(4), 1223-1233. doi: 10.1111/jpy.13168-20-145.
- Hall, J. D., Fučíková, K., Lo, C., Lewis, L. A., & Karol, K. G. (2010). An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie Algologie*, 31(4), 529-555.
- Heesch, S., Pažoutová, M., Moniz, M. B. J., & Rindi, F. (2016). *Prasiolales* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) of the Svalbard Archipelago: Diversity, biogeography and description of the new genera *Prasionella* and *Prasionema*. *European Journal of Phycology*, 51(2), 171-187. doi: 10.1080/09670262.2015.1115557.
- Kazi, M. A., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2013). Molecular phylogeny and barcoding of *Caulerpa* (Bryopsidales) based on the *tufA*, *rbcL*, 18S rDNA and ITS rDNA genes. *PLoS ONE*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0082438.
- Kirkendale, L., Saunders, G. W., & Winberg, P. (2013). A molecular survey of *Ulva* (*Chlorophyta*) in temperate Australia reveals enhanced levels of cosmopolitanism. *Journal of Phycology*, 49(1), 69-81. doi: 10.1111/jpy.12016.
- Krivina, E., Temraleeva, A., & Sinetova, M. (2022). New species *Micractinium kostikovii* (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) from Russia. *Phycological Research*, 70(1), 22-34. doi: 10.1111/pre.12469.
- Lawton, R. J., Mata, L., de-Nys, R., & Paul, N. A. (2013). Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using *Ulva*: Selecting target species and strains. *PLoS ONE*, 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0077344.
- Li, S., Sun, H., Hu, Y., Liu, B., Zhu, H., Hu, Z., & Liu, G. (2020). Four new members of foliicolous green algae within the *Watanabea* clade (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) from China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 67(3), 369-382. doi: 10.1111/jeu.12787.
- Li, S., Tan, H., Liu, B., Zhu, H., Hu, Z., & Liu, G. (2021). *Watanabeales* ord. nov. and twelve new species of *Trebouxiophyceae* (*Chlorophyta*). *Journal of Phycology*, 57(4), 1167-1186. doi: 10.1111/jpy.13165-20-198.
- Liu, B., Liu, X., Hu, Z., Zhu, H., & Liu, G. (2016). Phylogenetic position and morphological observation of the ctenocladus *circinnatus borzi*, a rare green alga from Changtang Plateau, China. *Phytotaxa*, 260(1), 75-82. doi: 10.11646/phytotaxa.260.1.8.
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K., & Vellayan, V. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180-197. doi: 10.1016/j.rser.2015.12.150.

- Moniz, M. B. J., Guiry, M. D., & Rindi, F. (2014). TufA phylogeny and species boundaries in the green algal order *Prasiolales* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *Phycologia*, 53(4), 396-406. doi: 10.2216/13-233.1.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., ... Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166-1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Oliveira, C. Y. B., D'Alessandro, E. B., Filho, N. R. A., Lopes, R. G., & Derner, R. B. (2021). Synergistic effect of growth conditions and organic carbon sources for improving biomass production and biodiesel quality by the microalga *Choricystis minor* var. *minor*. *Science of the Total Environment*, 759. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143476.
- Pikoli, M. R., Sari, A. F., Solihat, N. A., & Permana, A. H. (2019). Characteristics of tropical freshwater microalgae *Micractinium conductrix*, *Monoraphidium* sp. and *Choricystis parasitica*, and their potency as biodiesel feedstock. *Heliyon*, 5(12). doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02922.
- Pröschold, T., & Darienko, T. (2020). *Choricystis* and *Lewinosphaera* gen. nov. (*Trebouxiophyceae* *Chlorophyta*), two different green algal endosymbionts in freshwater sponges. *Symbiosis*, 82(3), 175-188. doi: 10.1007/s13199-020-00711-x.
- Qiao, K., Takano, T., & Liu, S. (2015). Discovery of two novel highly tolerant NaHCO₃ *Trebouxiophytes*: Identification and characterization of microalgae from extreme saline-alkali soil. *Algal Research*, 9, 245-253. doi: 10.1016/j.algal.2015.03.023.
- Sáez, A. G., Zaldivar-Riverón, A., & Medlin, L. K. 2008. Molecular systematics of the *Pleurochrysidaceae*, a family of coastal coccolithophores (*Haptophyta*). *Journal of Plankton Research*, 30(5), 559-566.
- Saunders, G. W., & Kucera, H. (2010). An evaluation of rbcL, tufA, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie, Algologie*, 31(4), 487-528.
- Saunders, G. W., & McDevit, D. C. (2012). Methods for DNA barcoding photosynthetic Protists emphasizing the macroalgae and Diatoms. In W. J. Kress, & D. L. Erickson (Eds.), *DNA barcodes-methods in molecular biology* (pp. 207-222). Totowa, NJ: Humana Press (Springer Science).
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Karsch-Mizrachi, I. (2019). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D94-D99. doi: 10.1093/nar/gky989.
- Shaikh, K. M., Nesamma, A. A., Abdin, M. Z., & Jutur, P. P. (2019). Molecular profiling of an oleaginous trebouxiophycean alga *Parachlorella kessleri* subjected to nutrient deprivation for enhanced biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1). doi: 10.1186/s13068-019-1521-9.
- Sharma, S., Sutar, R. R., Parida, A., & Bast, F. (2020). DNA barcoding and ITS-tufA multi-local molecular phylogeny of nitrophilic alga *Prasiola crista* growing on penguin guano at Larsemann Hills, Eastern Antarctica. *Czech Polar Reports*, 11(2), 194-202. doi: 10.5817/CPR2021-2-13.
- Shuba, E. S., & Kifle, D. (2018). Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81(May 2017), 743-755. doi: 10.1016/j.rser.2017.08.042.
- Tale, M., Ghosh, S., Kapadnis, B., & Kale, S. (2014). Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. *Bioresource Technology*, 169, 328-335. doi: 10.1016/j.biortech.2014.06.017.
- Tartar, A., & Boucias, D. G. (2004). The non-photosynthetic, pathogenic green alga *Helicosporidium* sp. has retained a modified, functional plastid genome. *FEMS Microbiology Letters*, 233(1), 153-157. doi: 10.1016/j.femsle.2004.02.006.
- Utomo, D. H., Ichsan, M., & Putri, J. F. (2019). *Prinsip dasar desain primer dengan bioinformatika: Vol cetakan pertama*. Global Science.
- Vieira, H. H., Bagatini, I. L., Guinart, C. M., & Vieira, A. A. H. (2016). tufA gene as molecular marker for freshwater *Chlorophyceae*. *Algae*, 31(2), 155-165. doi: 10.4490/algae.2016.31.4.14.

- Wynne, M. J., Verbruggen, H., & Angel, D. L. (2009). The recognition of *Caulerpa integerrima* (Zanardini) comb. et stat. nov. (*Bryopsidales, Chlorophyta*) from the Red Sea. *Phycologia*, 48(4), 291-301. doi: 10.2216/08-78.1.
- Yang, Y., Li, M., Li, H., Li, X. Y., Lin, J. G., Denecke, M., & Gu, J. D. (2020). Specific and effective detection of anammox bacteria using PCR primers targeting the 16S rRNA gene and functional genes. *Science of the Total Environment*, 734. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139387.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134>.
- Yee, W. (2016). Microalgae from the *Selenastraceae* as emerging candidates for biodiesel production: A mini review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 1-11. doi: 10.1007/s11274-016-2023-6.