

Introduksi Vektor Ekspresi *pGWB5-SOD* pada Bakteri *Escherichia coli* DH5 α dengan Metode Kejut Panas

Rinda Mulmeyda¹, Imam Safir Alwan Nurza^{2*}

¹Universitas Negeri Jakarta, Indonesia

²Institut Pertanian Bogor, Indonesia

ABSTRACT

Bacterial transformation is a process inserting foreign genes into bacterial cells and expressing these genes. Bacterial transformation process involves many methods, one of these methods is heat shock method. Heat shock method is used to increase competence of bacterial cells and their membrane permeability. Thus, foreign genes can enter to bacterial cells. One of the bacteria that can be used for transformation is *Escherichia coli*. *Escherichia coli* bacteria are generally used in molecular biology as test bacteria. *Escherichia coli* bacteria are known have many strains, one of which is DH5 α . *Escherichia coli* DH5 α bacteria is a strain that easily accepts foreign genes because it is easy to make competent cells, no existing F plasmid and endonuclease 1 enzyme (endA1 gene mutation), and has selection marker in form resistance antibiotic ampicillin. Transformation of *Escherichia coli* DH5 α bacteria with *pGWB5* expression vector containing SOD gene that has not been studied and it is success unknown. Therefore, the research aims to insert *pGWB5-SOD* expression vector into *Escherichia coli* DH5 α bacteria via heat shock method and analyze it is expression via colony PCR amplification as confirmation of success transformation. The research method used was heat shock method with *pGWB5-SOD* expression vector and *Escherichia coli* DH5 α bacteria. Bacterial transformation was carried out in 10 technical replicates on bacterial culture and amplification SOD gene by PCR. Results showed that *pGWB5-SOD* expression vector successfully entered *Escherichia coli* DH5 α bacteria and transformation occurred. This success was obtained from bacterial colonies that grew and bands appeared after amplification by PCR.

ABSTRAK

Transformasi bakteri adalah proses gen asing dimasukkan ke dalam sel bakteri dan mengekspresi gen tersebut. Proses transformasi bakteri melibatkan banyak metode, salah satunya adalah metode kejut panas. Metode kejut panas digunakan untuk meningkatkan kompetensi sel bakteri dan permeabilitas membrannya. Sehingga, gen asing dapat masuk ke dalam sel bakteri. Salah satu bakteri yang dapat digunakan untuk transformasi adalah *Escherichia coli*. Bakteri *Escherichia coli* secara umum digunakan dalam biologi molekuler sebagai bakteri uji. Bakteri *Escherichia coli* diketahui memiliki banyak strain, salah satunya adalah DH5 α . Bakteri *Escherichia coli* DH5 α merupakan strain yang mudah menerima gen asing. Karena mudah dibuat menjadi sel kompeten, tidak ada plasmid F, tidak ada enzim endonuklease 1 (mutasi gen endA1), dan memiliki penanda seleksi berupa resistensi antibiotik ampisilin. Transformasi bakteri *Escherichia coli* DH5 α dengan vektor ekspresi *pGWB5* mengandung gen SOD belum diteliti dan belum diketahui keberhasilannya. Sehingga, tujuan penelitian dilakukan untuk memasukkan vektor ekspresi *pGWB5-SOD* ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α melalui metode kejut panas dan menganalisis ekspresinya melalui amplifikasi PCR koloni sebagai konfirmasi keberhasilan transformasi. Metode penelitian yang digunakan adalah metode kejut panas dengan vektor ekspresi *pGWB5-SOD* dan bakteri *Escherichia coli* DH5 α . Transformasi bakteri dilakukan sebanyak 10 ulangan teknis pada kultur bakteri dan amplifikasi gen SOD dengan PCR. Hasil penelitian menunjukkan vektor ekspresi *pGWB5-MmSOD* berhasil masuk ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α dan terjadi transformasi. Keberhasilan ini diperoleh dari koloni bakteri yang tumbuh dan muncul pita setelah amplifikasi dengan PCR.

KONTAK

mulmeyda.12@gmail.com

KATA KUNCI

DH5 α , *Escherichia coli*, Kejut Panas, Vektor Ekspresi

PENDAHULUAN

Transformasi bakteri merupakan proses DNA asing dimasukkan ke dalam sel bakteri dan mengekspresikan DNA eksogen tersebut. Proses ini digunakan dalam rekayasa genetika untuk mendapatkan DNA rekombinan, kloning gen, ekspresi gen, dan menghasilkan organisme hasil rekayasa genetik (Moo-Young, 2011; Pandey dan Teixeira, 2017). Proses transformasi didasarkan pada prinsip yaitu, kompetensi sel bakteri, penyerapan DNA asing,

penanda seleksi, ekspresi gen asing, kejutan panas, elektroporasi, dan pertumbuhan sel bakteri (Sirajuddin dan Sundram, 2020). Kompetensi sel bakteri dilakukan untuk memudahkan DNA asing masuk ke dalam sel. DNA asing yang masuk ke dalam sel dapat berupa vektor ekspresi berisi plasmid tersisip gen yang telah dikonstruksi. Kompetensi sel dapat dibuat melalui metode kejutan panas untuk meningkatkan permeabilitas membran sel. Sehingga, DNA mudah terserap (Rahimzadeh *et al.*, 2016; Thompson dan Yildirim, 2019). Penyerapan DNA asing dari lingkungan dapat terjadi ketika sel sudah kompeten. Gen asing diekspresi ketika DNA asing masuk. Ekspresi gen asing dapat diamati melalui penanda seleksi berupa antibiotik. Sel yang tumbuh dalam penanda seleksi menunjukkan berhasil transformasi. Karena vektor yang digunakan mengandung penanda resistensi antibiotik (Mugwanda *et al.*, 2023; Contreras dan Gardner, 2022).

Transformasi bakteri dengan metode kejutan panas telah dilakukan oleh Ghazaei (2019), Rotinsulu *et al.* (2019), Rahimzadeh *et al.* (2016), dan Patigu *et al.* (2021). Hasil penelitian Ghazaei (2019) menjelaskan bahwa suhu kejutan panas 47°C dengan kejutan dingin 0°C dapat meningkatkan laju transformasi bakteri. Rotinsulu *et al.* (2019) menggunakan suhu kejutan panas 40°C, 42°C, dan 44°C selama 30 detik dapat mempermudah transformasi bakteri *E. coli* TOP-10 yang mengandung gen merB. Rahimzadeh *et al.* (2016) menggunakan metode kejutan panas pada transformasi bakteri *E. coli* BL21 dengan suhu 42°C selama 45 detik. Sedangkan Patigu *et al.* (2021) menggunakan suhu kejutan panas 55°C selama 60 detik menjadi suhu terbaik pada transformasi bakteri *E. coli* pada introduksi *pRGE32*. Namun, introduksi *pGWB5-SOD* pada bakteri *E. coli* belum ada yang teliti dan belum diketahui apakah metode kejutan panas sesuai protokol dapat mentransformasinya atau tidak. Sehingga, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keberhasilan introduksi *pGWB5-SOD* pada Bakteri *Escherichia coli* DH5α dengan metode kejutan panas.

Bakteri *Escherichia coli* DH5α digunakan dalam transformasi karena mudah menerima gen asing. Bakteri *E. coli* DH5α juga memiliki karakteristik genetika yang mudah dimodifikasi. Sehingga, strain bakteri *E. coli* DH5α umum digunakan dalam rekayasa genetika (Wang *et al.*, 2020). Karakteristik bakteri strain ini memiliki situs restriksi yang sedikit. Sehingga, dapat mencegah degradasi DNA asing yang masuk. Mutasi akhir A1 pada gen *endA1* yang mengkode endonuklease I. Mutasi ini mengurangi aktivitas enzim tersebut dan melindungi DNA asing yang masuk. Tidak ada plasmid F, mudah dibuat kompeten, ada penanda resistensi antibiotik berupa ampicilin, mudah diamati melalui biru/putih jika ada vektor pembawa gen LacZ, dan umum digunakan dalam kloning dan amplifikasi plasmid (Hamed *et al.*, 2020; Deng *et al.*, 2021). Bakteri diketahui dapat diamati melalui PCR yang dikenal sebagai PCR koloni.

PCR koloni merupakan metode cepat dan efisien untuk memverifikasi keberadaan konstruksi DNA spesifik dalam koloni bakteri setelah tahap transformasi. Nouemssi *et al.*, (2020) menjelaskan bahwa teknik PCR koloni melewati proses dalam pemurnian DNA dan enzim restriksi. Sehingga, teknik ini menjadi metode yang mudah digunakan dan memiliki hasil yang tinggi untuk menyaring konstruksi kloning. Prosesnya melibatkan penambahan sejumlah kecil koloni dari kultur cair bakteri padat langsung ke campuran utama PCR. Campuran PCR mencakup komponen-komponen yang diperlukan untuk PCR, seperti primer, polimerase, dan dNTP. Campuran tersebut mengalami termosiklik yang menyebabkan sel lisis dan melepaskan DNA target. Sehingga, menghasilkan cetakan untuk reaksi PCR. Produk PCR yang dihasilkan dapat dianalisis menggunakan elektroforesis gel untuk mengetahui ada tidaknya gen yang diinginkan (Bergkessel dan Guthrie, 2013; Walch *et al.*, 2016).

METODOLOGI

Penelitian ini menggunakan metode kejutan panas dengan bakteri *Escherichia coli* DH5α. Metode kejutan panas digunakan untuk memunculkan pori pada dinding sel bakteri. Sehingga, gen yang diinginkan dapat mudah masuk dan berekombinasi dengan gen bakteri target. Penelitian ini dilakukan dengan menyiapkan kultur bakteri *E. coli* DH5α menggunakan koloni tunggal dikultur pada media LB tanpa antibiotik dengan suhu 37°C selama 48 jam. Kemudian, Subkultur pada suhu 37°C selama 1,5-3 jam (hingga OD₆₀₀: 0.3-0.4). Kultur sel bakteri *E. coli* DH5α diambil untuk pembuatan sel kompeten. Pembuatan sel kompeten dilakukan agar sel yang berkompeten dapat mempermudah gen yang diinginkan dapat masuk. Pembuatan sel kompeten untuk transformasi bakteri dilakukan sebanyak 10 ulangan. Kultur sel bakteri *E. coli* DH5α diambil sebanyak 1,5 ml ke dalam *tube* dan dididamkan di es selama 10 menit. Hasilnya kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dan pelet diambil. Pelet ditambahkan 0.33X TFB (495 µl) dan dire suspensi secara perlahan. Sampel dimasukkan ke dalam kotak es selama 10 menit. Sentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dan pelet diambil. Kemudian, ditambahkan 1/12X TFB (125 µl) dan 7-8% DMSO (8.8 µl). Sampel dimasukkan ke dalam kotak es selama 10 menit dan sel kompeten bakteri *E. coli* DH5α didapatkan.

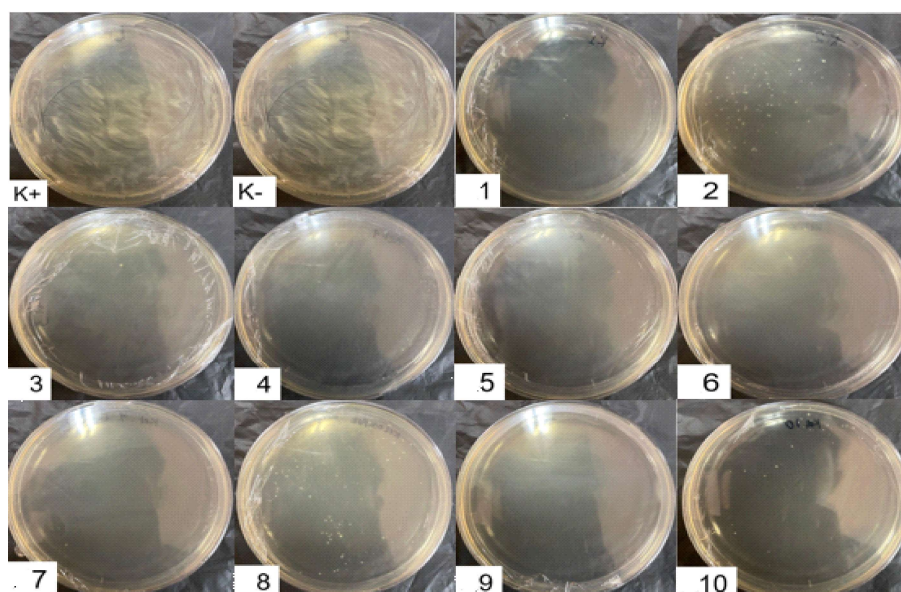
Sel bakteri yang sudah berkompeten dapat dilakukan transformasi bakteri. Sel kompeten diambil sebanyak 50 µl dan ditambahkan 10 µl plasmid. Campuran dididamkan di es selama 20-25 menit. Kemudian, secara cepat diberi

heat shock pada suhu 42°C selama 45 detik dan didiamkan di kotak es selama 5 menit. Kemudian, ditambahkan 100 µl media 2YT/LB dan diinkubasi dalam *shaker* pada suhu 37°C dengan 100 rpm selama 20 menit. Campuran disebar di cawan petri (LA+Hig+Kan) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

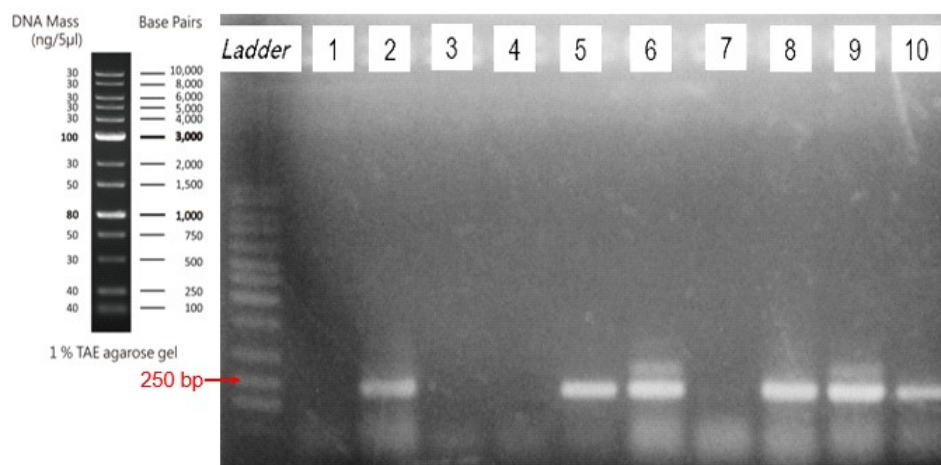
Setelah dilakukan transformasi bakteri. Gen diamati melalui PCR koloni untuk mengetahui gen telah tersisip dengan baik atau tidak. PCR koloni dilakukan dengan menggunakan koloni tunggal hasil transformasi diambil dan ditambahkan 7 µl ddH₂O. kemudian, dipanaskan pada suhu 95°C selama 10 menit dan didiamkan di kotak es selama 5 menit. Sampel ditambahkan 5.5 µl *mix* PCR. PCR dilakukan dengan ketentuan pra-PCR suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* suhu 55°C selama 45 detik, *elongasi* 72°C selama 1 menit, proses akhir 72°C selama 5 menit dan pasca-PCR suhu 20°C selama 10 menit. Kemudian, elektroforesis dilakukan menggunakan agarosa 1% dengan tegangan 100 volt selama 28 menit. Hasil elektroforesis diamati dengan UV transiluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil transformasi ke bakteri *E. coli* DH5α di cawan petri menunjukkan terbentuk koloni pada semua kelompok. Tetapi, koloni yang terlihat lebih banyak pada ulangan ke-2 (K2) dan ke-8 (K8) (Figure 1). Koloni yang terbentuk dan muncul dalam media LA+Hig+Kan mengindikasikan bahwa terseleksi bakteri *E. coli* DH5α yang membawa vektor *pGWB5-MmSOD*.



Gambar 1. Hasil transformasi bakteri di cawan petri. K+: Kontrol positif, K-: Kontrol negatif, 1-10: ulangan



Gambar 2. Hasil elektroforesis PCR koloni dari transformasi bakteri. *Ladder*: DNA *ladder* 1 kb, 1-10: ulangan

Hasil koloni diamplifikasi dengan PCR menunjukkan muncul pita tebal pada ulangan ke-2, ke-5, ke-6, ke-8, ke-9, dan ke-10 dengan ukuran 250 bp (Figure 2). Sedangkan, ulangan ke-1, ke-3, ke-4, dan ke-7 tidak muncul pitanya. Pita tebal yang muncul dari visualisasi elektroforesis menunjukkan bahwa vektor *pGWB-MmSOD* berhasil masuk ke dalam bakteri *E. coli* DH5 α . Ketidakhadiran pita mengindikasikan kemungkinan primer 35SF1 dan SODR2 ketika fase *annealing* pada suhu 56°C tidak menempel dengan tepat pada beberapa cetakan DNA plasmid atau vektor selama amplifikasi dengan PCR.

Faktor keberhasilan transformasi bakteri berupa plasmid, media pertumbuhan, metode yang digunakan sesuai, waktu dan suhu inkubasi, dan efisiensi sel kompeten (Chan *et al.*, 2013; Charpentier *et al.*, 2012). Jenis plasmid yang digunakan dapat mempengaruhi efisiensi transformasi bakteri, seperti transformasi menggunakan plasmid ukuran besar biasanya lebih rendah dibandingkan dengan ukuran kecil. Memilih sel kompeten yang tepat dan metode elektroporasi dapat membantu meningkatkan efisiensi transformasi saat bekerja dengan plasmid besar (Liu *et al.*, 2018).

Media pertumbuhan yang digunakan untuk sel kompeten juga dapat mempengaruhi efisiensi transformasi. Penting untuk menggunakan media yang mendukung pertumbuhan sel dan memungkinkan sel mengambil DNA asing secara efektif (Domenech *et al.*, 2018). Metode yang digunakan untuk membuat sel kompeten, seperti elektroporasi atau kejutan panas dapat mempengaruhi efisiensi transformasi. Elektroporasi secara umum lebih efisien dibandingkan kejutan panas dengan efisiensi hingga 90% dibandingkan dengan 50-70% untuk kejutan panas (Bhattacharjee dan Sorg, 2020; Kant *et al.*, 2019).

Waktu inkubasi dan suhu sel setelah transformasi dapat mempengaruhi efisiensi. Karena waktu dan suhu inkubasi optimum akan bergantung pada jenis sel kompeten yang digunakan (Zhou *et al.*, 2018). Efisiensi sel yang kompeten dalam mengambil DNA asing dapat berdampak signifikan pada hasil proses transformasi. Sangat penting untuk menggunakan sel yang kompeten dengan efisiensi transformasi yang tinggi (Liu *et al.*, 2014).

Ketidakberhasilan transformasi bakteri kemungkinan disebabkan oleh rendahnya efisiensi transformasi sel kompeten yang digunakan. Hal ini karena sel yang kompeten adalah kunci keberhasilan transformasi bakteri, dan efisiensinya dapat berdampak signifikan pada hasil proses tersebut. Jika sel yang kompeten memiliki efisiensi transformasi yang rendah, mungkin sulit untuk mencapai keberhasilan transformasi, bahkan dengan kondisi dan metode yang optimal (Voigt, 2011).

Media yang digunakan dalam praktikum berupa LA dengan antibiotik ampicilin dan LA tanpa antibiotik ampicilin. Media LA dengan antibiotik ampicilin bertujuan untuk menyeleksi bakteri yang telah ditransformasi membawa vektor ekspresi *pGWB5-SOD*. Bakteri yang berhasil transformasi akan tumbuh menjadi koloni dan bakteri yang tidak berhasil tumbuh akan mati. Karena diketahui bakteri yang ditumbuhkan membawa gen resisten ampicilin (Alam *et al.*, 2019). Media LA tanpa antibiotik ampicilin bertujuan untuk menyeleksi bakteri yang tidak resisten terhadap ampicilin. Hal ini karena ampicilin merupakan antibiotik beta-laktam yang menghambat sintesis dinding sel bakteri. Bakteri yang resisten terhadap ampicilin telah mengembangkan mekanisme untuk melawan efek antibiotik, seperti memproduksi enzim yang memecah antibiotik atau mengubah struktur dinding sel bakteri agar tidak rentan terhadap aksi antibiotik (O'Brien *et al.*, 2021).

Transformasi bakteri dilakukan dengan menggunakan bakteri *E. coli* DH5 α karena sedikit situs restriksi. Situs restriksi yang sedikit dapat meningkatkan transformasi bakteri dan mencegah degradasi DNA asing yang akan diintroduksi ke dalam sel (Abulmagd *et al.*, 2022; Kasarjian *et al.*, 2003). Sedikit aktivitas endonuklease untuk meminimalisir peluang non-spesifik degradasi DNA. Bakteri ini juga memiliki efisiensi transformasi yang tinggi dan plasmid yang stabil. Selain itu, bakteri *E. coli* DH5 α diketahui memiliki kompatibilitas yang baik dengan vektor secara umum (Liu *et al.*, 2018).

Bakteri *E. coli* diketahui secara alami tidak memiliki kemampuan kompeten untuk transformasi, seperti *Bacillus subtilis* atau *Haemophilus influenzae*. Dinding sel bakteri *E. coli* memiliki penghalang yang dapat mencegah DNA asing masuk (Huang *et al.*, 2021). Sehingga, untuk mempermudah transformasi diperlukan metode untuk membuat sel menjadi kompeten. Sel kompeten merupakan sel yang memiliki kemampuan untuk mengambil DNA asing dari lingkungan. Untuk membuat sel menjadi kompeten dilakukan perubahan pada permeabilitas membran (Liu *et al.*, 2018). Perubahan permeabilitas membran dapat dilakukan dengan metode kejutan panas, elektroporasi, dan secara kimia dengan CaCl₂ (Kalsium Klorida) (Datey *et al.*, 2017; Asif *et al.*, 2017). Metode kejutan panas dilakukan dengan prinsip bersuhu tinggi dalam waktu cepat untuk membuat vektor dapat masuk ke dalam sel. Suhu yang biasa digunakan 42°C selama 45 detik (Rahimzadeh *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2017). Metode elektroporasi dilakukan dengan menggunakan listrik pada sel bakteri. Listrik ini akan membuat membran sel berpori secara temporal. Sehingga, DNA asing bisa masuk ke dalam sel (Young dan Dean 2014). Metode kimia dengan CaCl₂ dapat mendisrupsi membran sel dan membuatnya menjadi lebih permeabel (Asif *et al.*, 2017).

Transformasi bakteri dapat dilakukan dengan TFB (*Transformation Buffer*) dan DMSO. TFB adalah larutan yang mengandung senyawa kimia untuk meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri. TFB digunakan dalam preparasi sel kompeten untuk meningkatkan efisiensi transformasi bakteri karena mengandung senyawa $MnCl_2$, $CaCl_2$, KCl, dan Lfcin-B (Liu *et al.*, 2018). DMSO adalah senyawa yang digunakan untuk preparasi sel kompeten. DMSO dicampur dengan TFB dapat meningkatkan efisiensi proses transformasi. DMSO diketahui berkontribusi pada peningkatan permeabilitas membran, meningkatkan penyerapan DNA masuk ke dalam sel, melindungi sel dari pembentukan es kristal, dan meningkatkan efisiensi transformasi (Chan *et al.*, 2013; Mizuno *et al.*, 2022).

Transformasi bakteri diketahui setelah diberi TFB, DMSO, dan kejut panas. Bakteri dikultur dalam media Luria Bertani Agar (LA) dan *Broth* (LB). LA berupa media padat dan LB media cair. Hasil transformasi bakteri dapat diamati melalui media LA yang berisi antibiotik higromisin dan kanamisin sebagai penanda seleksi. Media Luria Bertani merupakan media yang sering digunakan dalam pengujian kultur bakteri karena mengandung komposisi nutrisi yang lengkap dan dapat menunjang pertumbuhan bakteri (Imamuddin, 2011). Antibiotik higromisin dan kanamisin digunakan sebagai penanda seleksi untuk mengamati bakteri yang mengalami transformasi dan tidak. Bakteri yang bertransformasi akan terlihat di media dengan jelas dan bakteri yang tidak bertransformasi akan mati. Karena bakteri yang bertransformasi tersisip plasmid resistensi higromisin dan kanamisin. Sedangkan bakteri yang tidak tersisip resistensi antibiotik tersebut akan mati (Setiari *et al.*, 2018; Arnak *et al.*, 2016).

Hasil transformasi dapat diamati melalui PCR koloni. PCR koloni dilakukan dengan bahan *mix* PCR. Bahan *mix* PCR yang digunakan berupa master *mix*, primer 35SF₁, dan primer SODR₂. Master *mix* berperan penting dalam proses amplifikasi DNA dari koloni bakteri. Master *mix* merupakan larutan pra-campuran yang mengandung semua reagen yang diperlukan untuk PCR, termasuk DNA polimerase, dNTP, primer, dan *buffer* (Cieślińska *et al.*, 2014). Fungsi master *mix* untuk memudahkan reaksi PCR, membantu meminimalkan risiko amplifikasi tidak lengkap, menjaga konsistensi reaksi PCR, mengoptimalkan kondisi PCR, dan meningkatkan efisiensi dan spesifitas reaksi amplifikasi (Kalle *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010). Primer 35SF₁ diketahui berfungsi untuk amplifikasi promotor 35S CaMV dan mendeteksi adanya transformasi yang terjadi pada tanaman kedelai dan kentang (Musawira *et al.*, 2022; Raharjo dan Surajiman, 2017). Primer SODR₂ untuk mendeteksi di tengah gen MmCu/Zn-SOD (Musawira *et al.*, 2022).

Program PCR yang digunakan dengan pra-PCR suhu 94°C selama 5 menit. Kondisi ini sebagai denaturasi awal sebelum amplifikasi PCR. Pra-PCR sangat penting dalam memisahkan DNA cetakan beruntai ganda menjadi untai tunggal. Sehingga, dapat mengamplifikasi urutan target yang efisien selama siklus PCR berikutnya (Putra *et al.*, 2020). Denaturasi suhu 94°C selama 1 menit kondisi DNA akan berpisah dari untai ganda menjadi untai tunggal dan merupakan bagian proses dalam PCR. Proses ini penting untuk mempermudah pengikatan primer ke urutan DNA target dan amplifikasi selanjutnya (Dwiputri *et al.*, 2013). *Annealing* suhu 55°C selama 45 detik diketahui untuk memudahkan penempelan primer ke DNA target dan amplifikasi pada DNA target (Silalahi *et al.*, 2021). Elongasi suhu 72°C selama 1 menit merupakan proses pemanjangan dimana DNA polimerase memperluas bagian DNA target yang telah ditempel oleh primer dan secara efektif menyalin urutan DNA target (Prout *et al.*, 2023). Proses akhir 72°C selama 5 menit dalam PCR merupakan tahap akhir elongasi dalam proses PCR. Proses ini memastikan bahwa DNA tetap beruntai tunggal sepenuhnya, sehingga menghasilkan amplifikasi urutan DNA target (Taiwo, 2019; Verma *et al.*, 2014). Pasca-PCR suhu 20°C selama 10 menit sebagai pendingin setelah final elongasi dalam tahap PCR (Wong *et al.*, 2015).

Hasil elektroforesis PCR koloni divisualisasikan berdasarkan DNA *ladder* 1 kb berukuran 250 bp. Ukuran 250 bp dalam hasil elektroforesis PCR koloni pada *pGWB5-mmSOD* berbeda dengan hasil penelitian Musawira *et al* (2022). Musawira *et al* (2022) memperoleh *pGWB5-mmSOD* dengan ukuran 633 bp. Perbedaan ukuran panjang basa kemungkinan disebabkan oleh sebagian sampel yang terdegradasi, hasil koloni dalam cawan petri yang sedikit, atau pengambilan koloni yang terlalu sedikit. Kemudian, hasil elektroforesis PCR koloni pada gen $G\alpha$ SL16 dengan ukuran 650 bp berbeda dengan hasil penelitian Pratiwi (2012). Pratiwi (2012) memperoleh gen $G\alpha$ SL 16 dengan ukuran 1295 bp dari vektor ekspresi *pMSH1* sebelum diintroduksi ke dalam bakteri *E. coli* DH5 α .

KESIMPULAN

Vektor *pGWB5-SOD* masuk ke bakteri *E. coli* DH5 α dan terjadi transformasi dapat diperoleh setelah sel bakteri tersebut dikompetenkan secara kejut panas. Karena dengan metode kejut panas dapat membuat membran sel menjadi tinggi permeabilitasnya dan mudah menerima vektor *pGWB5-SOD*. Keberhasilan transformasi dapat diamati melalui cawan petri terbentuk koloni dan muncul pita tebal dari visualisasi elektroforesis setelah diamplifikasi dengan PCR.

REFERENSI

- Abulmagd S, Khattab AEA, Zedan H. (2022). Expression of full and fragment-B of diphtheria toxin genes in *Escherichia coli* for generating of recombinant diphtheria vaccines. *Clin Exp Vaccine Res.* 11(1):12-29. doi: 10.7774/cevr.2022.11.1.12.
- Alam ST, Le TAN, Park JS, Kwon HC, Kang K. (2019). Antimicrobial biophotonic treatment of ampicillin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with hypericin and ampicillin cotreatment followed by orange light. *Pharmaceutics.* 11(12):641. doi: 10.3390/pharmaceutics11120641.
- Arnak R, Altun B, Tosato V, Bruschi CV. (2016). Multiple antibiotic resistance plasmids allow scalable, PCR-mediated DNA manipulation and near-zero background cloning. *Food Technol Biotechnol.* 54(3):257-265. doi: 10.17113/ftb.54.03.16.4230.
- Asif A, Mohsin H, Tanvir R, Rehman Y. (2017). Revisiting the mechanisms involved in calcium chloride induced bacterial transformation. *Front Microbiol.* 8:2169. doi: 10.3389/fmicb.2017.02169.
- Bergkessel M, Guthrie C. (2013). Colony PCR. *Methods Enzymol.* 529:299-309. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2.
- Bhattacharjee D, Sorg JA. (2020). Factors and Conditions That Impact Electroporation of *Clostridioides difficile* Strains. *mSphere.* 5(2):e00941-19. doi: 10.1128/mSphere.00941-19.
- Chan WT, Verma CS, Lane DP, Gan SK. (2013). A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Biosci Rep.* 33(6):e00086. doi: 10.1042/BSR20130098.
- Chang, A.Y., Chau, V.W.Y., Landas, J.A., Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI Methods.* 1: 22-25.
- Charpentier, X, Polard, P, Claverys, JP. (2012). Induction of competence for genetic transformation by antibiotics: convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS? *Current Opinion in Microbiology.* 15 (5): 570-576. doi: 10.1016/j.mib.2012.08.001.
- Cieślińska A, Kostyra E, Fiedorowicz E, Bukalo M, Kocbach B, Matysiewicz M. (2014). Identifying stability of polymerase in master mixes used in PCR and repair possibilities for the degraded reagents. *Polish Annals of Medicine.* 21(2):82–85. doi: 10.1016/j.poamed.2014.07.009.
- Contreras SUJ, Gardner CM. (2022). Environmental fate and behaviour of antibiotic resistance genes and small interference RNAs released from genetically modified crops. *Journal of Applied Microbiology.* 133(5):2877–2892. doi: 10.1111/jam.15741.
- Datey A, Subburaj J, Gopalan J, Chakravorty D. (2017). Mechanism of transformation in *Mycobacteria* using a novel shockwave assisted technique driven by in-situ generated oxyhydrogen. *Sci Rep.* 7:8645. doi: 10.1038/s41598-017-08542-5.
- Deng X, Yang W, Shao Z, Zhao Y. (2021). Genetically modified bacteria for targeted phototherapy of tumor. *Biomaterials.* 272(120809):1-12. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120809.
- Domenech A, Slager J, Veening JW. (2018). Antibiotic-induced cell chaining triggers pneumococcal competence by reshaping quorum sensing to autocrine-like signaling. *Cell Reports.* 25:2390–2400. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.007.
- Dwiputri AW, Ratnayani K, Yowani SC. (2013). Amplification of 0.7kb fragment katG gene from clinical multi drug resistant *Tuberculosis* isolate in Bali. *Indonesia Journal of Biomedical Science.* 7(2):69072.
- Ghazaei, C. (2019). Investigating the effect of thermal shock factors and different cell treatments on bacterial transformation efficiency. *J. Bas. Res. Med. Sci.* 6 (1): 49-56.
- Hamed AA, Khedr M, Abdelraof M. (2020). Activation of LacZ gene in *Escherichia coli* DH5 α via α -complementation mechanism for β -galactosidase production and its biochemical characterizations. *J Genet Eng Biotechnol.* 18(1):80. doi: 10.1186/s43141-020-00096-w.
- Huang M, Liu M, Huang L, Wang M, Jia R, Zhu D, Chen S, Zhao X, Zhang S, Gao Q, Zhang L, Cheng A. (2021). The activation and limitation of the bacterial natural transformation system: The function in genome evolution and stability. *Microbiological Research.* 252:126856. doi: 10.1016/j.micres.2021.126856.
- Imamuddin H. (2011). Uji resistensi terhadap HgCl yang diisolasi dari tanah penambangan emas di pongkor, Jawa Barat. *Berita Biologi.* 10(4):424-430.
- Kalle E, Kubista M, Rensing C. (2014). Multi-template polymerase chain reaction. *Biomol Detect Quantif.* 2:11-29. doi: 10.1016/j.bdq.2014.11.002.
- Kant R, Geeta B, Vinay KP, Anurup G, Deepak S, Monalisha N, Keerti M, Ankur G, Keshab G, Shubhra G, Gurunath R, Shantanu B. (2019). Synchronized electromechanical shock wave-induced bacterial transformation. *ACS Omega.* 4(5):8512-8521. doi: 10.1021/acsomega.9b00202.

- Kasarjian JK, Iida M, Ryu J. (2003). New restriction enzymes discovered from *Escherichia coli* clinical strains using a plasmid transformation method. *Nucleic Acids Res.* 31(5):e22. doi: 10.1093/nar/gng022.
- Liu J, Chang W, Pan L, Liu X, Su L, Zhang W, Li Q, Zheng Y. (2018). An improved method of preparing high efficiency transformation *Escherichia coli* with both plasmids and larger DNA fragments. *Indian J Microbiol.* 58(4):448-456. doi: 10.1007/s12088-018-0743-z.
- Liu X, Liu L, Wang Y, Wang X, Ma Y, Li Y. (2014). The study on the factors affecting transformation efficiency of *E. coli* competent cells. *Pak J Pharm Sci.* 27(3):679-684.
- Mizuno M, Matsuzaki T, Ozeki N, Katano H, Koga H, Takebe T, Yoshikawa HY, Sekiya I. (2022). Cell membrane fluidity and ROS resistance define DMSO tolerance of cryopreserved synovial MSCs and HUVECs. *Stem Cell Res Ther.* 13:177. doi: 10.1186/s13287-022-02850-y.
- Moo-Young M. (2011). *Comprehensive biotechnology*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Mugwanda K, Hamese S, Van Zyl WF, Prinsloo E, Du Plessis M, Dicks LMT, Thimiri Govinda Raj DB. (2023). Recent advances in genetic tools for engineering probiotic lactic acid bacteria. *Biosci Rep.* 43(1):BSR20211299. doi: 10.1042/BSR20211299.
- Musawira, Suharsono, Miftahudin, Tjahjoleksono A. (2022). Establishment of transgenic potato cultivar IPB CP1 plants containing gene encoding for superoxide dismutase to increase the abiotic stress tolerance. *Indonesian Journal of Biotechnology.* 27(3):118-125. doi: 10.22146/ijbiotech.68040.
- Nouemssi SB, Ghribi M, Beauchemin R, Meddeb-Mouelhi F, Germain H, Desgagné-Penix I. (2020). Rapid and efficient colony-pcr for high throughput screening of genetically transformed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Life.* 10(9):186. doi: 10.3390/life10090186.
- O'Brien S, Baumgartner M, Hall AR. (2021). Species interactions drive the spread of ampicillin resistance in human-associated gut microbiota. *Evol Med Public Health.* 9(1):256-266. doi: 10.1093/emph/eoab020.
- Pandey A, Teixeira JAC. (2017). *Current developments in biotechnology and bioengineering: foundations of biotechnology and bioengineering*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Patigu, R.F., Wijayanti, P., Sebastian, A., Purwestri, Y.A. (2021). Optimization of heat shock temperature and time on the transformation of pRGE32 into *Escherichia coli* DH5 α . *Jurnal Biologi Tropis.* 21 (3): 632-640.
- Pratiwi R. (2012). Perakitan vektor ekspresi protein G subunit α dari Kedelai (*Glycine max*) kultivar slamet [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Prout J, Tian M, Palladino A, Wright J, Thompson JF. (2023). LNA blockers for improved amplification selectivity. *Sci Rep.* 13(1):4858. doi: 10.1038/s41598-023-31871-7.
- Putra LAG, Christianus JY, Nabila IN, Mochammad HRF, Jessica RY. (2020). A review of the development of polymerase chain reaction technique and its uses in scientific field. *Stannum: Jurnal Sains dan Terapan Kimia.* 2(1):17-30. doi: 10.33019/jstk.v2i1.1619.
- Raharjo TJ, Surajiman. (2017). PCR primer specific CaMV 35S promoter to detect transgenic soybean in indonesia commercial soybean and tempeh. *Indones J Chem.* 17(3):415-421. doi: 10.22146/ijc.24163.
- Rahimzadeh M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Arab S, Mobasheri H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Mol Biol Res Commun.* 5(4):257-261.
- Rotinsulu, S.H., Fatimawali, Tallei, T.E. (2019). Transformasi Plasmid yang Mengandung Gen merB Pada Bakteri *Escherichia coli* TOP-10. *Pharmacon.* 8 (2): 290-297.
- Setiari N, Purwantoro A, Moeljopawiro S, Semiarti E. (2018). Micropropagation of *Dendrobium phalaenopsis* orchid through overexpression of embryo gene AtRKD4. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science.* 40(2):284-294. doi: 10.17503/agrivita.v40i2.1690.
- Silalahi D, Wirawan IGP, Sasadara MMV. (2021). Optimization of annealing temperature for amplification of Ehosc01a locus in pranajiwa (*Euchresta horsfieldii*) plant collected from mountains, urban and coastal areas in Bali. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* 913:012059. doi: 10.1088/1755-1315/913/1/012059.
- Sirajuddin SA, Sundram S. (2020). Evaluation of two transformation protocols and screening of positive plasmid PENDAHULUAN into *Bacillus cereus* EB2, a gram-positive bacterium using qualitative analyses. *Braz J Microbiol.* 51(3):919-929. doi: 10.1007/s42770-020-00241-0.
- Taiwo, S.S. (2019). Overview of Molecular Diagnosis in Medical Microbiology. *PAJOLS.* 1: 25-32. doi: 10.36108/pajols/8102/10(0150).
- Thompson M, Yildirim S. (2019). Transformation of *Acinetobacter baumannii*: electroporation. *Methods in molecular biology.* 1946:69-74. doi: 10.1007/978-1-4939-9118-1_7.
- Verma, K., Dalal, J., Sharma, S. (2014). Scientific Concepts of Polymerase Chain Reaction (PCR). *IJPSR.* 5 (8): 3086-3095. doi: 0.13040/IJPSR.0975-8232.

- Voigt C. (2011). *Methods in enzymology volume 498*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Walch G, Knapp M, Rainer G, Peintner U. (2016). Colony-PCR is a rapid method for dna amplification of *Hyphomycetes*. *J Fungi (Basel)*. 2(2):12. doi: 10.3390/jof2020012.
- Wang Y, Wang X, Yu L, Tian Y, Li S, Leng F, Ma J, Chen J. (2020). Effects of Sr^{2+} on the preparation of *Escherichia coli* DH5 α competent cells and plasmid transformation. *PeerJ*. 8(e9480):1-20. doi: 10.7717/peerj.9480.
- Wong G, Wong I, Chan K, Hsieh Y, Wong S. (2015). A rapid and low-cost pcr thermal cycler for low resource settings. *PLoS One*. 10(7):e0131701. doi: 10.1371/journal.pone.0131701.
- Young JL, Dean DA. (2014). Electroporation-mediated gene delivery. *Adv Genet*. 89:49-88. doi: 10.1016/bs.adgen.2014.10.003.
- Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. (2010). Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. *J Mol Diagn*. 12(2):152-61. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090070.
- Zhou J, Li X, Xia J, Wen Y, Zhou J, Yu Z, Tian B. (2018). The role of temperature and bivalent ions in preparing competent *Escherichia coli*. *3 Biotech*. 8(5):222. doi: 10.1007/s13205-018-1243-x.