

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Penelitian

Plasmid merupakan molekul DNA berukuran relatif kecil, melingkar, dan beruntai ganda. Plasmid membawa gen-gen yang terpisah dari kromosom bakteri. Plasmid digunakan sebagai vektor kloning yang bermanfaat untuk dua tujuan dasar, yaitu membuat banyak salinan gen tertentu dan memproduksi protein dalam jumlah besar (Reece dkk., 2011).

Salah satu tahapan yang harus dilakukan dalam kloning gen adalah transformasi (Brown, 2010). Sel yang digunakan dalam proses transformasi umumnya harus dibuat menjadi kompeten atau siap ditransformasi. Sel kompeten biasanya dibuat dari inokulum awal dengan konsentrasi 2% (v/v) pada nilai OD_{600} 0,4. Inokulum awal untuk sel kompeten merupakan sel yang telah ditumbuhkan selama 3 hingga 4 jam dengan agitasi 200 – 250 rpm (Sezonov dkk., 2007).

Transformasi dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu kejutan panas, elektroporasi (Casali dan Preston, 2003), dan kejutan dingin (Ng, 2009). Metode transformasi yang paling sering digunakan adalah metode kejutan panas dengan prinsip kejutan suhu tinggi selama beberapa detik pada sel bakteri sehingga plasmid dapat masuk ke dalam sel. Metode kejutan panas umumnya dilakukan pada suhu 42°C selama 2 menit (Sambrook dan Russel, 2001).

Efisiensi transformasi merupakan salah satu cara untuk mengetahui efektivitas transformasi plasmid ke dalam sel inang. Nilai efisiensi transformasi

yang rendah sangat berkaitan dengan metode transformasi plasmid yang dilakukan. Oleh karena itu, proses optimasi dalam metode transformasi penting dilakukan untuk meningkatkan nilai efisiensi transformasi (Hanahan dkk., 1983).

Efisiensi transformasi dapat dipengaruhi oleh waktu dan suhu kejutan panas. Kejutan panas dapat dilakukan selama 30 (Inoue dkk., 1990), 45 (Froger dan Hall, 2007), 60, 90 (Hanahan, 1983), atau 240 detik (Yoo, 2010). Selain itu, suhu kejutan panas dapat dilakukan pada 40°, 42°, 44° (Inoue dkk., 1990), 46°, 48°, 50°, atau 52°C (Bergès dan Barreau, 1989). Oleh karena itu, belum terdapat waktu dan suhu optimum untuk transformasi plasmid kejutan panas. *E. coli* KY1429 memiliki waktu kejutan panas optimal 120 detik, sedangkan *E. coli* KY1445 memiliki waktu kejutan panas optimal 60 detik (Yoo, 2010).

Plasmid pTA7002-*AtRKD4* merupakan modifikasi plasmid alami pada *Agrobacterium tumefaciens* yang mengandung gen *AtRKD4*. Plasmid ini memiliki resistensi terhadap antibiotik higromisin karena memiliki gen higromisin fosfotransferase (*HPT*) (Zuo dkk., 2002). Gen *AtRKD4* adalah gen yang menginduksi pembentukan embrio somatik pada biji (Nakajima dkk., 2010). Ekspresi gen *AtRKD4* secara berlebihan akan menyebabkan sel somatik mampu melakukan proses embriogenesis (Waki dkk., 2011).

Transformasi plasmid rekombinan dapat dilakukan pada sel inang *Escherichia coli*. Bakteri ini mampu bereplikasi sangat cepat dan dapat tumbuh pada medium sederhana ataupun medium khusus, sehingga mudah dikulturkan (Casali dan Preston, 2003). Strain *Escherichia coli* yang digunakan untuk

transformasi dapat beragam, contohnya *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21, *E. coli* JM109, dan *E. coli* HB101 (Inoue dkk., 1990). *E. coli* BL21(DE3) merupakan salah satu jenis strain bakteri yang dapat digunakan sebagai sel inang untuk transformasi karena efisiensinya yang cukup tinggi, yaitu $1,9 \times 10^5$ CFU/ng/mL untuk pBR322 dan 2×10^5 CFU/ μ g untuk 1μ g pUC19 (Liu dkk., 2014). Bakteri ini digunakan sebagai sel inang berbagai jenis plasmid, contohnya pRSETB (Saraniya dkk., 2012), pET-32b(+)-IFN α 2a (Kusumawati dkk., 2013), dan pGEM-T (Retnoningrum dkk., 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efisiensi transformasi pTA7002-*AtRKD4* dengan metode kejutan panas pada *Escherichia coli* BL21(DE3). Kejutan panas dilakukan dengan variasi waktu (30, 60, 90, 120, dan 240 detik) dan suhu (42 $^{\circ}$, 44 $^{\circ}$, dan 46 $^{\circ}$ C) untuk mengetahui pengaruh waktu dan suhu dalam proses transformasi. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk menentukan konsentrasi inokulum awal (1, 2, atau 3%, v/v) *Escherichia coli* BL21(DE3) yang paling cepat mencapai nilai OD₆₀₀ 0,4 pada tiga variasi agitasi (170, 190, atau 220 rpm) untuk pembuatan sel kompeten dalam transformasi.

B. Keaslian Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efisiensi transformasi kejutan panas plasmid pTA7002 yang telah diinsersi gen *AtRKD4*. Plasmid pTA7002 sering dimanfaatkan untuk modifikasi tanaman tertentu dengan sel inang *Agrobacterium tumefaciens*. Sementara itu, gen *AtRKD4* merupakan gen

dari *Arabidopsis thaliana* yang merangsang pembelahan sel somatik. Mursyanti dkk. (2015) meneliti mengenai transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* ke dalam tanaman untuk menginduksi pembentukan embrio-somatik dengan nilai efisiensi transformasi 0,677. Sementara itu, penelitian ini melakukan transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* untuk memperbanyak jumlah plasmid.

Transformasi plasmid untuk tujuan memperbanyak paling sering menggunakan *Escherichia coli* sebagai sel inang. Penelitian Inoue dkk. (1990) menggunakan beberapa strain *Escherichia coli* untuk transformasi plasmid pBR322, yaitu *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21, *E. coli* JM109, dan *E. coli* HB101. Transformasi dengan metode kejutan panas dilakukan pada berbagai variasi suhu (40°-44°C) dan waktu (0 – 90 detik) pada berbagai ukuran plasmid pBR322 (4400 – 17600 bp). Waktu kejutan panas optimal adalah 30 detik, sedangkan variasi suhu kejutan panas tidak mempengaruhi proses transformasi plasmid. Selain itu, semakin besar ukuran plasmid yang digunakan, proses transformasi plasmid akan semakin jarang terjadi. Sementara itu, penelitian ini menggunakan strain *Escherichia coli* BL21(DE3) sebagai sel inang dalam proses transformasi kejutan panas dengan variasi waktu (30 – 240 detik) dan suhu (42°-46°C). Ukuran plasmid pTA7002-*AtRKD4* sebesar 14000 bp.

Transformasi yang diinduksi pada *Escherichia coli* dapat dipengaruhi oleh ukuran plasmid dan larutan garam. Hanahan dkk. (1983) melakukan transformasi plasmid pada *Escherichia coli*. Transformasi ini menggunakan 400 buah plasmid dengan berbagai ukuran. Transformasi plasmid dilakukan

dengan metode kejutan panas pada suhu 42°C selama 90 detik. Selain itu, pembuatan sel kompeten untuk transformasi menggunakan variasi larutan garam, yaitu $MnCl_2$, $CaCl_2$, $RbCl_2$, KCl_2 , dimetil sulfat, ditionitritol, dan heksammin kobalt (III). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa larutan $CaCl_2$ merupakan larutan garam yang paling baik untuk membuat sel kompeten dalam proses transformasi. Sementara itu, penelitian ini menggunakan larutan $CaCl_2$ untuk pembuatan sel kompeten.

Sel kompeten yang digunakan dalam transformasi juga berperan penting dalam mempengaruhi efisiensi transformasi. Penelitian Sezonov dkk. (2007) melakukan transformasi plasmid pada *Escherichia coli* dengan konsentrasi inokulum awal sel kompeten sebesar 2% (v/v) dari rentang OD_{600} 0,2 hingga 7 yang ditumbuhkan dalam waktu 2 jam hingga 3 hari. Sel kompeten memiliki efisiensi transformasi terbaik pada nilai OD_{600} 0,4. Nilai OD_{600} 0,4 dicapai dalam waktu 3 hingga 4 jam tergantung dari kuatnya agitasi (200-250 rpm). Sementara itu, penelitian juga bertujuan untuk melihat pengaruh konsentrasi inokulum awal (1, 2, dan 3%, v/v) dan kecepatan agitasi (170, 190, dan 220 rpm) terhadap laju pertumbuhan *Escherichia coli* BL21(DE3) hingga nilai OD_{600} 0,4.

Efisiensi transformasi *Escherichia coli* juga dipengaruhi oleh jenis plasmid yang digunakan. Yoo (2010) melakukan transformasi plasmid pBR322 dan pUC19 pada *Escherichia coli* KY1445 dan *E. coli* KY1249 dengan metode kejutan panas. Kejutan panas dilakukan pada suhu 42°C dengan variasi waktu, yaitu 0 detik, 45 detik, 60 detik 120 detik, dan 240 detik. Waktu kejutan panas

optimal adalah 120 detik untuk *E. coli* KY1429 dan 60 detik untuk *E. coli* KY1445. *E. coli* KY1445 memiliki efisiensi transformasi sebesar $1,033 \times 10^3$ CFU/ μ g/mL untuk plasmid pBR322 dan $7,6875 \times 10^2$ CFU/ μ g/mL untuk plasmid pUC19. Sementara itu, *E. coli* KY1429 memiliki efisiensi transformasi sebesar $4,16 \times 10^2$ CFU/ μ g/mL untuk plasmid pBR322 dan $0,4375 \times 10^2$ CFU/ μ g/mL untuk plasmid pUC19.

Kusumawati dkk. (2013) melakukan transformasi plasmid pET-32b(+)-IFN α 2a pada *Escherichia coli* BL21(DE3). Transformasi dilakukan dengan metode kejutan panas pada suhu 42°C selama 90 detik. *E. coli* BL21(DE3) hasil transformasi diseleksi menggunakan medium Luria-Bertani (LB) padat dengan antibiotik ampisilin. Plasmid pET-32b(+)-IFN α 2a yang telah diinsersi ke dalam sel diverifikasi melalui PCR koloni dan identifikasi protein fusi. Sementara itu, penelitian ini menggunakan medium seleksi berupa medium LB padat dengan antibiotik kanamisin dan higromisin.

C. Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi inokulum awal dan kecepatan agitasi terhadap laju pertumbuhan *Escherichia coli* BL21(DE3) hingga nilai OD₆₀₀ 0,4?
2. Bagaimana pengaruh variasi waktu dan suhu kejutan panas terhadap efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* dengan metode kejutan panas menggunakan sel inang *Escherichia coli* BL21(DE3)?

D. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum awal dan kecepatan agitasi terhadap laju pertumbuhan *Escherichia coli* BL21(DE3) hingga nilai OD₆₀₀ 0,4.
2. Mengetahui pengaruh variasi waktu dan suhu kejutan panas terhadap efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* dengan metode kejutan panas menggunakan *Escherichia coli* BL21(DE3).

E. Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat menjadi sumber pengetahuan bagi masyarakat terkait dengan efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* menggunakan metode kejutan panas pada sel inang *Escherichia coli* strain BL21(DE3). Penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian-penelitian selanjutnya untuk mengkaji efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* pada sel inang lainnya ataupun efisiensi transformasi plasmid pTA7002 yang telah diinsersi gen lain pada sel inang *Escherichia coli* BL21(DE3). Penelitian ini juga bermanfaat sebagai dasar untuk penelitian mengenai perbanyakan plasmid pTA7002-*AtRKD4*, deteksi kloning gen *AtRKD4*, dan penelitian lanjutan ekspresi gen *AtRKD4* di dalam sel tanaman. Selain itu, penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk produk bio-terapan dalam industri kultur jaringan tanaman yang menggunakan gen *AtRKD4*.