

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### A. Simpulan

Berdasarkan penelitian efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* menggunakan sel inang *Escherichia coli* BL21(DE3) yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa :

1. Variasi konsentrasi inokulum awal dan kecepatan agitasi akan mempercepat laju pertumbuhan *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan konsentrasi inokulum optimum 3% ( $\frac{v}{v}$ ) dan agitasi 220 rpm.
2. Suhu kejutan panas 44°C selama 30 detik pada transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* meningkatkan efisiensi transformasi plasmid.

### B. Saran

Saran yang diajukan bagi penelitian lanjutan yang terkait dengan penelitian efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* menggunakan sel inang *Escherichia coli* BL21(DE3), yaitu :

1. Rentang waktu kejutan panas dapat diperkecil menjadi 15, 30, 45, 60, 75 detik, dan seterusnya agar pengaruh waktu benar-benar terlihat dalam efisiensi transformasi.
2. Penelitian lanjutan berupa pengaruh jenis dan konsentrasi larutan garam untuk pembuatan sel kompeten dapat dilakukan untuk meningkatkan efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* menggunakan sel inang *Escherichia coli* BL21(DE3).

3. Ketersediaan alat laboratorium, seperti elektroforase, *biosafety cabinet*, *refrigerated centrifuge*, *heating block*, dan *shaking waterbath*, dapat ditambahkan untuk menunjang kegiatan penelitian mengenai transformasi plasmid ataupun penelitian lainnya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Addgene. 2016. pTA7002. <https://www.addgene.org/vector-database/7040/>. 16 Juni 2016.
- Aehle, W. 2007. *Enzymes in industry : production and applications*, Third, Completely Revised Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Halaman : 101-105
- An X, Lu J, Huang J, Zhang B, dan Liu D. 2007. Rapid assembly of multiple-exon cDNA 2 directly from genomic DNA. *PLoS ONE* (11): e1179.
- Aoyama, T. dan Chua, N. H. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant journal* 11 (1) : 605-612.
- Arsene, F., Tomoyasu, T., dan Bukau, B. 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology* 55(1-3) : 3-9.
- Atlas, R. M. 2010. *Handbook of microbiological media*, fourth edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton. Halaman : 937.
- Basim, E. dan Basim, H. 2001. Pulsed field gel electrophoresis technique and its use in molecular biology. *Turkish journal of biology*. 25(3):405-418.
- Bauer, A. P., Dieckmann, S. M., Ludwig, W., dan Schleifer, K. 2007. Rapid identification of *Escherichia coli* safety and laboratory lineages based on multiplex-PCR. *FEMS microbiology letter* 269 (1) : 36-40.
- Bergès, T. dan Barreau, C. 1989. Heat shock at an elevated temperatures improves transformation efficiency of protoplast from *Podospora anserina*. *Journal of general microbiology* 135 (1) : 601-604.
- Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Fredrick, K., dan Cate, J. H. D. 2008. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA* 14 (1) : 1590-1599.
- Brown, T. A. 2010. *Gene cloning and DNA analysis*. Blackwell Publishing, Oxford. Halaman : 95-99.
- Bycroft, B. W. 1988. *Dictionary of antibiotics and related substances*. Chapman and Hall Ltd, London. Halaman : 543.
- Cabañas, M. J., Vázquez, D., dan Modolell, J. 1978. Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *European journal of biochemistry* 87 (1) : 21-27.
- Camilleri, P. 1998. *Capillary electrophoresis : theory and practice*. CRC Press, Boca Raton. Halaman : 1, 3, dan 4.

- Casali, N. dan Preston, A. 2003. *E. coli plasmid vectors : methods and applications*. Humana Press, New Jersey. Halaman : 317-323.
- Corcoran, J. W. dan Hahn, F. E. 1974. *Antibiotics : mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents*, Volume III. Springer-Verlag, Berlin. Halaman : 241-243.
- Das, S. dan Dash, H. R. 2015. *Microbial biotechnology – a laboratory manual for bacterial systems*. Springer, New Delhi. Halaman : 12-72.
- Faraji, R., Parsa, A., Torabi, B., Withrow, T. 2006. Effects of kanamycin on the macromolecular composition of kanamycin sensitive *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain. *Journal of experimental microbiology and immunology* 9(1):31-38.
- Froger, A. dan Hall, J. E. 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments* 6 (1). <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=253>, doi: 10.3791/253
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166(1) : 557-580.
- Imanaka, T. 2010. Enzymes involved in DNA amplification (e.g) polymerase from thermophiles : Evolution of PCR Enzymes. Dalam : Horikoshi, K. *Extremophiles handbook*. Springer, Tokyo.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96 (1) : 23- 28.
- Kang, H., Fang, Y., dan Singh, K. B. 1999. A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in *Arabidopsis* and induces deference-related genes. *The plant journal* 20 (1) : 127-133.
- Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z., dan Kurłowicz, W. 1967. *Antibiotics : origin, nature, and properties*. Pergamon Press, Oxford. Halaman : 618-628.
- Kusumawati, A, Santoso, A., dan Radji, M. 2013. Soluble expression of recombinant human interferon alpha 2a fusion protein in *Eshcherichia coli*. *International journal of pharmaceutical science and health care* 2(3) : 42-49.
- Langga, I. F. 2012. Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi DNA tanaman bitti (*Vitex cofassus* Reinw) serta analisis keragaman genetik dengan teknik RAPD-PCR. *Jurnal sains dan teknologi* 12 (3): 265-276.

- Lee, S. W. dan Bahaman, A. R. 2012. Discriminatory power of agarose in gel electrophoresis. Dalam : Magdeldin, S. *Gel electrophoresis – principles and basics*. Halaman : 41-44. Intech, Rijeka.
- Lehninger, L. A. 1982. *Dasar-dasar biokimia* . Erlangga, Jakarta. Halaman : 254-265.
- Lim, G., Lum, D., Ng, B., dan Sam, C. 2015. Differential transformation efficiencies observed for pUC19 and pBR322 in *E. coli* may be related to calcium chloride concentration. *Journal of experimental microbiology and immunology* 20 (1) : 1-6.
- Liu, X., Liu, L., Wang, Y., Wang, X, Ma, Y., dan Li, Y. 2014. The study on the factors affecting transformation efficiency of *Escherichia coli* competent cells. *Pakistan journal of pharmacy science* 27 (3) : 679-684.
- MacFaddin, J. F., *Biochemical Tests For Identification of Medical Bacteria*, 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Halaman : 221-223
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. 2013. *Brock Biology of Microorganism*, 13<sup>th</sup> edition. Benjamin Cummings Publisher, San Fransisco. Halaman : 261-295.
- Marks, D. B., Marks, A. D., dan Smith, C. A. 1996. *Biokimia Kedokteran Dasar : Sebuah Pendekatan Klinis*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. Halaman : 233.
- Mijts, B. N. dan Patel, B. K. C. 2002. Cloning, sequencing and expression of an alpha amylase gene, *amyA* from the thermophilic halophile *Halotermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinana enzyme. *Microbiology* 148 (1) : 2343 – 2349.
- Morozkina, E. V. dan Zvyagilskaya, R. A. 2007. Nitrate reductases : structure, functions, and effects of stress factors. *Biochemistry* 72(10) : 1151-1160.
- Mursyanti, E., Purwantoro, A., Moeljopawiro, S., dan Semiarti, E. 2015. Induction of somatic embryogenesis through overexpression of *AtRKD4* genes in *Phalaenopsis* “sogo vivien”. *Indonesian journal of biotechnology* 20 (1) : 42-53.
- Nakajima, K., Waki, T., Hiki, T., Watanabe, R., dan Hashimoto, T. 2010. The *Arabidopsis* RWP-RK motif-containing putative transcription factor *RKD4* functions in embryonic pattern formation. *21<sup>st</sup> International conference on arabidopsis research*. Yokohama, 6-10 Juni 2010.
- Ng, N. 2009. Optimizing bacterial transformation efficiency : a study of heat and cold shock parameters and DNA plasmid concentration. *California state science fair*. California, 18-19 Mei 2009.

- O' Hara, I. dan Mundree, S. 2016. *Sugarcane-based biofuels and bioproducts*. John Wiley & Sons, Inc., Canada. Halaman : 121-123.
- Octaviani, I. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak daun pariijoto (*Medinilla speciosa*) terhadap *Escherichia coli* dan *Stahpylococcus aureus*. Naskah skripsi-S1. Universitas Atma Jaya Yoyakarta, Yogyakarta.
- Pakoskey, A. M., Leshner, E. C., dan Scott, D. B. M. 1965. Hexokinase of *Escherichia coli*, assay of enzyme activity and adaptation to growth in various media. *Journal of genetic microbiology* 38 (1) : 78-80.
- Patel. K. G., Raval, H. G., Patel, K. N., dan Lingavkar, R. S. 2014. Derivative and derivative spectroscopic methods for simultaneous determination of cefalexin and kanamycin monosulfate using phenylsocyante as derivatizing reagent. *Journal of pharmacy research* 8(5) : 689-695.
- Primrose, S. B., Twyman, R. M., dan Old, R. W. 2001. *Principles of gene manipulation*, sixth edition. Blackwell Publishing, Oxford. Halaman : 143-152.
- Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.I., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., dan Jackson, R.B. 2011. *Campbell : biology*, ninth edition. Pearson Education Inc., San Fransisco. Halaman : 452-455.
- Retnoningrum, D. S., Ningrum, R. A., Kurniawan, Y. N., Indrayati, A., dan Rachmawati, H. 2010. Construction of synthetic open reading frame encoding human interferon alpha 2b for high expression in *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *Journal of biotechnology* 145(2) : 193-198.
- Ritcher, K., Haslbeck, M., dan Buchner, J. 2010. The heat shock response : life on the verge of death. *Molecular cell* 40 (1) : 253 – 266.
- Sambrook, J., dan Russel, D. W. 2001. *Molecular cloning*, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saraniya, P., Misba, M. B., dan Langeswaran, K. 2012. Recombinant streptokinase expression optimization in *Escherichia coli* BL21((DE3). *Journal of pharmacy research* 5(3) : 1713-1715.
- Seager, S. .L. dan Slabaugh, M. R. 2010. *Organic and biochemisty for today*, seventh edition. Cengage Learning, California. Halaman : 293.
- Sekse, C., Bohlin, J., Skjerve, E., Vegarud, G. E. 2012. Growth comparison of several *Escherichia coli* exposed to various concentration of lactoferrin using linear spline regression. *Microbial informatics and experimentation* 2(5) : 1-12.

- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., dan D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology* 189 (23) : 8746-8749.
- Sinden, R. R. 2012. *DNA structure and function*. Academic Press, California. Halaman : 95-133.
- Singh, B. dan Gupta, R. S. 2009. Conserved inserts in the Hsp60 (GroEL) and Hsp70 (DnaK) proteins are essential for cellular growth. *Molecular genetic genomics* 281 (1) : 361-373.
- Sköld, O. 2010. *Antibiotics and antibiotic resistance*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. Halaman : 221-222.
- Souii, A., M.Hadheb-Gharbi, M., dan Gharbi, J. 2013. Gene cloning : a frequently used technology in a molecular biology laboratory – alternatif approaches, advantages, and limitations. *American journal of research communication* 1(5) : 18-35.
- Stellwagen, N. C. 2009. Electrophoresis of DNA in agarosa gels, polyacrylamid gels, and in free solution, Supplemen I. *Electrophoresis* 30 (1) : 1 – 14.
- Straus, D. B., Walter, W. A., dan Gross, C. A. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma^{32}$ . *Nature* 329 (1) : 348-351.
- Stryer, L. 2000. *Biokimia*, edisi 4 . Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. Halaman : 45-60.
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi kesehatan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta. Halaman : 69-75.
- Sulaiman, H. A. 2007. Pemisahan dan karakterisasi spesi senyawa kompleks ytrium – 90 dan stronsium – 90 dengan elektroforesis kertas. *JFN* 1 (2): 176-182.
- Sword, W. E. 2003. Chemical transformation of *E. coli*. Dalam : Casali, N. dan Preston, A. *E. coli plasmid vectors : methods and applications*. Humana Press, New Jersey.
- Tang, Y., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., dan Schwartzman, J. 2015. *Molecular Medical Microbiology*, Volume 1, Second Edition. Academic Press, London. Halaman : 201-202.
- Thomas J. G. dan Baneyx, F. 1998. Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management : Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. *Journal of Bacteriology* 180(19) : 5165-5172.

- Tong, Z dan Kim, S. H. 2004. *Proceedings of the 4th international conference separation science and technology : frontiers of separation science and technology*. World Scientific Publishings, Singapore. Halaman : 779-785.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. dan Case, C. L. 2007. *Microbiology : an introduction*, Ninth Edition. Pearson Education, Inc., San Fransisco. Halaman : 189-190.
- Urban-Chmiel, R., Dec, M., Puchalski, A., dan Wernicki, A. 2013. Characterization of heat-shock proteins in *Escherichia coli* strains under thermal stress *in vitro*. *Journal of medical microbiology* 62 (1) : 1897-1901.
- Waki, T., Hiki, T., Watanabe, R., Hashimoto, T., dan Nakajima, K. 2011. The *Arabidopsis* RWP-RK protein RKD4 triggers gene expression and pattern formation in early embryogenesis. *Current biology* 21(1) : 1277-1281.
- Westmermeier. 2004 . *Electrophoresis in practice : a guide to theory and practice*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- Yepyhardi. 2009 . *Elektroforesis : pintu gerbang penelitian biologi molekuler*. UI Press, Jakarta. Halaman : 10-13.
- Yoo, L. 2010. The effect of *rpoH* for heat shock gene expression on plasmid transformation. *Journal of experimental microbiology and immunology* 14 (1) : 108-111.
- Yoon, S. H., Jeong, H., Kwon, S., dan Kim, J. F. 2009. Genomics, biological features, and biotechnological applications of *Escherichia coli* B : “is B for better?!”. Dalam : Lee, S. Y. *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*. Springer, Netherlands.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi, Yogyakarta. Halaman : 131-133.
- Zuo, J., Niu, Q., dan Chua, N. 2002. *United States patent 6.542.068 BI : Chemical inducible promoters used to obtain transgenic plants with a silent marker*. 12 November 2002.



## LAMPIRAN

**Lampiran 1. Jadwal kegiatan penelitian**

Kegiatan	2016			2017						
	Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni	Jul
Preparasi										
Uji kemurnian bakteri										
Isolasi plasmid										
Penentuan konsentrasi sel kompeten										
Pembuatan sel kompeten										
Transformasi										
Deteksi PCR										
Penentuan efisiensi transformasi										
Analisis data										
Penyusunan Naskah										
Pendadaran										

**Lampiran 2. Perbanyak *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 yang mengandung plasmid pTA7002-*AtRKD4***

Perbanyak *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 yang mengandung plasmid pTA7002-*AtRKD4* dilakukan berdasarkan Jutono dkk. (1980) dengan modifikasi. Kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 diambil sebanyak 1 ose. Setelah itu, ose diinokulasikan ke medium LB dengan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam. Kultur bakteri ini digunakan untuk isolasi plasmid pTA7002-*AtRKD4*. Koloni tunggal dari biakan hasil inkubasi diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam 20 mL LB cair. Setelah itu, biakan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam.

### Lampiran 3. Perbanyakan dan pembuatan kultur stok *Escherichia coli* BL21(DE3)

Perbanyakan *Escherichia coli* BL21(DE3) dilakukan berdasarkan Jutono dkk. (1980) dengan modifikasi. Kultur bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3) hasil uji kemurnian diambil sebanyak 1 ose, dan diinokulasikan ke medium LB dengan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni tunggal dari biakan hasil inkubasi diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam 20 mL LB cair. Setelah itu, biakan diinkubasikan pada suhu 37°C selama semalam (16-18 jam). Koloni tunggal dari biakan hasil inkubasi diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam 20 mL LB cair atau digoreskan ke LB miring.

Pembuatan kultur stok dilakukan berdasarkan Thermo Scientific (2012) dengan modifikasi. Kultur stok dibuat dari 500 µL biakan bakteri yang diinokulasikan ke dalam 500 µL gliserol 50% (<sup>b</sup>/<sub>v</sub>). Kultur stok diinkubasi pada suhu -20°C.

#### Lampiran 4. Isolasi plasmid menggunakan Presto™ Mini Plasmid Kit

##### 1. Pemanenan sel

Sel bakteri yang telah dikulturkan ( $OD_{600}$  4) diambil sebanyak 1,25 mL ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL. Sel disentrifugasi pada 15.000 g selama 1 menit di suhu ruang untuk membentuk pelet sel dan supernatan dibuang. Tahap pemanenan sel diulangi seperlunya hingga volume sel kultur sebanyak 10 mL menggunakan *microcentrifuge tube* yang sama.

##### 2. Resuspensi

*Microcentrifuge tube* 1,5 mL yang baru disiapkan dan ditambahkan dengan 200  $\mu$ L Buffer PD1 (yang telah ditambahkan RNase A), kemudian *TrueBlue Lysis Buffer* ditambahkan sebanyak 2  $\mu$ L dan campurkan dengan dikocok. Campuran tersebut dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL yang mengandung pelet sel, kemudian resuspensi pelet sel dengan vorteks atau pipet hingga seluruh pelet sel tercampur.

##### 3. Lisis sel

Larutan Buffer PD2 ditambahkan sebanyak 200  $\mu$ L ke dalam *tube*, kemudian diresuspensi dengan cara membolak-balikkan *tube* 10 kali. Botol Buffer PD2 ditutup secepatnya untuk menghindari asidifikasi  $CO_2$ . Lisat dalam *tube* jangan dihomogenisasi dengan vorteks untuk menghindari rusaknya DNA genom. Lisat didiamkan dalam suhu ruang selama 2-5 menit untuk memastikan lisat tercampur sempurna.

##### 4. Netralisasi

Larutan Buffer PD3 dicampurkan sebanyak 300  $\mu$ L ke dalam *tube*, kemudian diresuspensi dengan cara membolak-balikkan *tube* 10 kali. Lisat

tidak dihomogenisasi dengan vorteks untuk menghindari rusak DNA genom. Setelah itu, lisat disentrifugasi pada 18.000 x g selama 7 menit. Selama sentrifugasi, kolom PDH diletakkan di *Collection Tube*.

#### 5. Pengikatan DNA

Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke kolom PDH. Tip pipet yang sempit digunakan untuk memastikan seluruh supernatan telah dipindah tanpa merusak presipitat putih. Setelah itu, supernatan disentrifugasi pada 15.000 x g selama 30 detik pada suhu ruang, kemudian buang cairan pada *Collection Tube*. Kolom PDH diletakkan kembali di *Collection Tube*.

#### 6. Pencucian

*Wash Buffer* (telah ditambahkan dengan etanol absolut) ditambahkan sebanyak 600  $\mu\text{L}$  ke dalam kolom PDH. Setelah itu, larutan disentrifugasi pada 15.000 x g pada suhu ruang selama 30 detik. Larutan sisa pada *Collection Tube* dibuang dan kolom PDH diletakkan kembali ke dalam *Collection Tube*, kemudian disentrifugasi kembali pada 15.000 x g pada suhu ruang selama 3 menit untuk mengeringkan matriks kolom. Kolom PDH yang telah kering dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL yang baru.

#### 7. Elusi

*Elution Buffer* dihangatkan pada suhu 60-70°C. Setelah itu, *Elution Buffer* sebanyak 30  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke tengah-tengah matriks kolom dan didiamkan selama 2 menit untuk membiarkan *Elution Buffer* terserap sempurna. Setelah itu, larutan disentrifugasi pada 15.000 x g pada suhu ruang selama 2 menit untuk mengelusi plasmid yang telah dipurifikasi.

### Lampiran 5. Perhitungan konsentrasi dan massa plasmid pTA7002-*AtRKD4*

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi plasmid pTA7002-AtRKD4} &= A_{260} \times 30 \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL} \\
 &= 1,837 \times 30 \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL} \\
 &= 2.755,5 \text{ } \mu\text{g/mL} \\
 &= 0,0027555 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}
 \end{aligned}$$

Jadi, konsentrasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* sebesar 0,0027555  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

$$\begin{aligned}
 \text{Massa plasmid pTA7002-AtRKD4} &= \text{konsentrasi plasmid} \times \text{volume plasmid transformasi} \\
 &= 0,0027555 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 2 \text{ } \mu\text{L} \\
 &= 0,00511 \text{ } \mu\text{g}
 \end{aligned}$$

Jadi, massa plasmid pTA7002-*AtRDK4* untuk satu proses transformasi sebesar 0,00511  $\mu\text{g}$

$$\begin{aligned}
 \text{Fraksi plasmid pTA7002-AtRKD4} &= \frac{\text{volume yang dispread plate}}{\text{volume total medium+bakteri}} \\
 &= \frac{10 \text{ } \mu\text{L}}{450 \text{ } \mu\text{L}} \\
 &= 0,02222
 \end{aligned}$$

Jadi, fraksi plasmid pTA7002-*AtRKD4* yang digunakan sebesar 0,0222

$$\begin{aligned}
 \text{Massa plasmid pTA7002-AtRKD4 yang disebar} &= \text{Massa plasmid} \times \text{fraksi plasmid} \\
 &= 0,00511 \text{ } \mu\text{g} \times 0,02222 \\
 &= 0,000122 \text{ } \mu\text{g} \\
 &= 0,122 \text{ ng}
 \end{aligned}$$

Jadi, massa plasmid pTA7002-*AtRKD4* yang diinokulasi *spread plate* dalam satu kali proses transformasi sebesar 0,000122  $\mu\text{g}$  atau 0,122 ng.

**Lampiran 6. Raw Data efisiensi transformasi plasmid pTA7002-AtRKD4**

Waktu Transformasi (detik)		Suhu Transformasi					
		42°C		44°C		46°C	
		KT	ET	KT	ET	KT	ET
30	1	11	$8,98.10^4$	60	$4,90.10^5$	14	$1,14.10^5$
	2	30	$2,45.10^5$	198	$1,62.10^6$	9	$7,35.10^4$
	3	16	$1,31.10^5$	171	$1,40.10^6$	23	$1,88.10^5$
	Rerata	<b>19</b>	<b><math>1,55.10^5</math></b>	<b>143</b>	<b><math>1,17.10^6</math></b>	<b>15,33</b>	<b><math>1,25.10^5</math></b>
60	1	45	$3,67.10^5$	11	$8,98.10^4$	27	$2,20.10^5$
	2	44	$3,59.10^5$	26	$2,12.10^5$	28	$2,29.10^5$
	3	110	$8,98.10^5$	131	$1,07.10^6$	36	$2,94.10^5$
	Rerata	<b>66,33</b>	<b><math>5,42.10^5</math></b>	<b>56</b>	<b><math>4,57.10^5</math></b>	<b>30,33</b>	<b><math>2,48.10^5</math></b>
90	1	42	$3,43.10^5$	69	$5,63.10^5$	45	$3,67.10^5$
	2	39	$3,18.10^5$	20	$1,63.10^5$	24	$1,96.10^5$
	3	51	$4,16.10^5$	26	$2,12.10^5$	44	$3,59.10^5$
	Rerata	<b>44</b>	<b><math>3,59.10^5</math></b>	<b>38,33</b>	<b><math>3,13.10^5</math></b>	<b>37,67</b>	<b><math>3,08.10^5</math></b>
120	1	61	$4,98.10^5$	9	$7,35.10^4$	38	$3,10.10^5$
	2	39	$3,18.10^5$	7	$5,72.10^4$	30	$2,45.10^5$
	3	36	$2,94.10^5$	5	$4,08.10^4$	43	$3,51.10^5$
	Rerata	<b>45,33</b>	<b><math>3,70.10^5</math></b>	<b>7</b>	<b><math>5,72.10^4</math></b>	<b>37</b>	<b><math>3,02.10^5</math></b>
240	1	176	$1,44.10^6$	31	$2,53.10^5$	13	$1,06.10^5$
	2	133	$1,09.10^6$	172	$1,40.10^6$	13	$1,06.10^5$
	3	106	$8,66.10^5$	98	$8,00.10^5$	14	$1,14.10^5$
	Rerata	<b>138,33</b>	<b><math>1,13.10^6</math></b>	<b>100,33</b>	<b><math>8,19.10^5</math></b>	<b>13,33</b>	<b><math>1,09.10^5</math></b>

Keterangan :

<sup>1</sup>KT merupakan jumlah koloni tunggal yang dinyatakan dalam satuan CFU

<sup>2</sup>ET merupakan efisiensi transformasi plasmid pTA7002-AtRKD4 yang dinyatakan dalam satuan CFU/ $\mu$ g plasmid.

**Lampiran 7. Hasil ANAVA efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* menggunakan metode kejutan panas pada *Escherichia coli* BL21(DE3)**

**Analisis Univariat dari Varians**

**Tes Efek Antar-Subjek**

Variabel bebas : Efisiensi Transformasi (x10000 CFU/ $\mu$ g)

Sumber	Jumlah Kuadrat Tipe III	Df	Rerata kuadrat	F	Sig.
Model terkoreksi	50870.704	14	3633.622	4/401	.000
<i>Intercept</i>	83505.123	1	83505.123	101.143	.000
Suhu	10359.219	2	5179.610	6.274	.005
Waktu	10265.963	4	2566.491	3.109	.030
Suhu*Waktu	30245.522	8	3780.690	4.579	.001
Error	24768.496	30	85.617		
Total	159144.323	45			
Total Terkoreksi	75639.200	44			

a. Kuadrat R = .673 (Kuadrat R Terukur = .520)



**Lampiran 8. Hasil DMRT efisiensi transformasi plasmid pTA7002-AtRKD4 menggunakan metode kejutan panas pada *Escherichia coli* BL21(DE3)**

**Suhu Transformasi (Celsius)**

**Subset Homogen**

Efisiensi Transformasi (x10000 CFU/ $\mu$ g)

Duncan<sup>a,b</sup>

Suhu Transformasi (Celsius)	N	Subset	
		1	2
Suhu 46°	15	21.82907	
Suhu 42°	15		51.11595
Suhu 44°	15		56.28743
Sig.		1.000	,626

Rerata untuk grup dalam subset homogen diperlihatkan

Berdasarkan rerata observasi

Nilai error adalah Rerata Kuadrat (Error) = 825.617

a. Menggunakan Ukuran Rerata Sampel Harmonik = 15,000.

b. Alpha = ,05

**Waktu Transformasi**

**Subset Homogen**

Efisiensi Transformasi (x10000 CFU/ $\mu$ g)

Duncan<sup>a,b</sup>

Waktu Transformasi	N	Subset	
		1	2
120 detik	9	24.31501	
90 detik	9	32.66195	
60 detik	9	41.55326	41.55326
30 detik	9	48.26710	48.26710
240 detik	9		68.59009
Sig.		.115	.068

Rerata untuk grup dalam subset homogen diperlihatkan

Berdasarkan rerata observasi

Nilai error adalah Rerata Kuadrat (Error) = 825.617

a. Menggunakan Ukuran Rerata Sampel Harmonik = 9,000.

b. Alpha = ,05