

Optimization of heat shock temperature and time on the transformation of pRGE32 into *Escherichia coli* DH5 α

Rosy Feraningsih Patigu¹, Putri Wijayanti², Alfino Sebastian², Yekti Asih Purwestri^{1,2*}

¹Biochemistry Laboratory, Tropical Biology Department, Faculty of Biology, Universitas Gadjah Mada, Jalan Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281, Indonesia

²Research Center for Biotechnology, Universitas Gadjah Mada, Jalan Teknik Utara, Berek, Depok, Sleman, Yogyakarta, Indonesia

Article History

Received : July 16th, 2021

Revised : August 12th, 2021

Accepted : September 02th, 2021

Published : September 13th, 2021

*Corresponding Author:

Yekti Asih Purwestri,

Research Center for
Biotechnology, Universitas
Gadjah Mada, Jalan Teknik
Utara, Berek, Depok, Sleman,
Yogyakarta, Indonesia;

Email: yekti@ugm.ac.id

Abstract: Genome editing technique is one of the methods for studying the expression of gene, eliminating unfavorable traits or phenotypes and generating the new characters of species. The pRGE32 plasmid is one of the vectors that used in genome editing with carrying the *Cas9* gene, restriction site of sgRNA (*single guide RNA*) and specific promoters that can be expressed in plants. The first step in the genome editing process is inserting pRGE32 into *Escherichia coli* for propagation. The large size of the plasmid molecule becomes a challenge to determine the right method in the transformation process. This study aims to determine the temperature and time of heat shock transformation of plasmid pRGE32 into *E. coli*. The transformation of pRGE32 into plasmids was carried out with variations in temperature and time, 42°C (30 seconds and 60 seconds) and 55°C (30 seconds and 60 seconds). The results showed that a heat shock temperature of 55°C with a time of 60 seconds was the best temperature for the transformation of pRGE32 into *E. coli*. This optimization of heat shock condition will increase the transformation efficiency, which is in the range of 3322-10.989 cfu/ μ g.

Keywords: Heat shock; pRGE32; *Escherichia coli*; Transformation.

Pendahuluan

Transformasi merupakan salah satu metode transfer genetik yang dapat terjadi secara alami maupun artifisial ke dalam sistem sel (Johnston *et al.*, 2014). Di alam, bakteri dapat memperoleh informasi dari lingkungannya dengan tiga cara yaitu konjugasi, transduksi dan transformasi (Tjahjoleksono, 2021). Transduksi merupakan mekanisme perpindahan gen secara horizontal, yang diperantarai oleh bakteriofag. Konjugasi merupakan transfer gen melalui kontak langsung antar sel, mekanisme ini terkadang mengarah pada transfer kromosom (Johnston *et al.*, 2014). Mekanisme transformasi melibatkan DNA dan permukaan sel dimana DNA akan terikat pada permukaan membran dan akan melewati kompleks dinding dan membran sel (Rahimzadeh *et al.*, 2016). Transformasi artifisial bakteri dilakukan di bawah kondisi laboratorium yang terkendali.

Metode transformasi dengan perlakuan Rubidium (RbCl) dan *heat shock* menjadi salah satu metode yang dapat digunakan sebagai variasi dari metode CaCl₂ (Walker, 1984; Curtis *et al.*, 1977; Roychoudhury *et al.*, 2009).

Transformasi artifisial melibatkan pembuatan sel kompeten dari bakteri *Escherichia coli*. Pembuatan sel kompeten membutuhkan kondisi yang kaya akan kation. Rubidium merupakan logam alkali yang memiliki energi ionisasi yang tinggi, sehingga menyediakan elektron yang dapat memfasilitasi pengikatan antara fragmen DNA dengan permukaan sel (Greenwood & Earnshaw, 1997). Muatan positif akan diberikan ke gugus fosfat DNA dan fosfolipid membran sehingga menghilangkan gaya tolak menolak antara DNA dan membran sel. Kondisi ini memungkinkan DNA untuk masuk ke dalam sistem bakteri (Asif *et al.*, 2017). Pemberian suhu dingin dan panas dalam proses transformasi akan

mengganggu kompleksitas membran. Suhu yang rendah mengakibatkan terjadinya perubahan struktur protein dan suhu yang tinggi akan melepaskan lipid dari membran. Proses berulang ini mengakibatkan terbentuknya pori-pori pada permukaan membran plasma dan meningkatkan efisiensi transformasi (Panja *et al.*, 2009).

Plasmid merupakan DNA untai ganda ekstrakromosomal, berbentuk sirkuler dan/atau linear yang dapat bereplikasi secara independen (Wiley *et al.*, 2008). Plasmid sering digunakan sebagai alat untuk memasukkan gen asing ke dalam bakteri dengan tujuan memproduksi protein rekombinan dan kloning gen yang diinginkan (Yusuf dkk, 2014). pRGEB32 merupakan salah satu plasmid vektor yang digunakan dalam transformasi melalui perantara agrobakterium pada padi. pRGEB32 sering digunakan dalam teknologi pengeditan genome CRISPR/Cas9 (Simanjuntak, 2021; Xie *et al.*, 2015), memiliki U3 snoRNA promoter (*U3p*) yang dapat mengekspresikan sgRNA dan *rice ubiquitin* promoter (*UBIp*) dengan ujung 5 *untranslated region* conserved yang dapat mengekspresikan *Cas9* (Xie *et al.*, 2015).

Efisiensi transformasi dipengaruhi oleh suhu dan waktu perlakuan *heat shock*. Selain itu perbedaan efisiensi juga berkorelasi dengan ukuran plasmid (Ohse *et al.*, 1995; Hanahan, 1983). Ukuran plasmid yang relatif lebih besar mengakibatkan ketidakstabilan *E. coli* transforman (Lim *et al.*, 2015). Plasmid pRGEB32 memiliki ukuran 15.888 bp, besarnya ukuran plasmid ini menuntut suatu optimasi metode dalam proses

transformasinya. Perlakuan *heat shock* 42°C selama 45 detik meningkatkan efisiensi transformasi pada plasmid pUC18 (Chan *et al.*, 2013), 90 detik (Hanahan, 1983) atau 2 menit (Sambrook & Russel, 2001). Selain itu, modifikasi suhu transformasi dilakukan oleh Berges & Barreau (1989) dengan beberapa tingkatan suhu yaitu 44°C, 46°C, 48°C, 50°C dan 52°C.

Modifikasi metode *heat shock* pada plasmid pRGEB32 belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan optimasi suhu dan waktu *heat shock* pada plasmid pRGEB32.

Bahan dan Metode

Bahan dan alat yang digunakan yaitu bakteri *E. coli* strain DH5 α , medium Luria Bertani (Trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, bacto agar 15 g), buffer Rubidium (0,1 M MOPS pH 6,5, 0,05 M CaCl₂, 0,01 M RbCl), plasmid pRGEB32 (Xie *et al.*, 2015), primer gen *HPT* dan *Cas9* (Tabel 1), antibiotik kanamisin 50 mg/L, Laminar Air Flow (GelmanSciences), Sentrifus Beckman dan Eppendorf 5430 R, Shaker Waterbath (GFL 1083), Thermocycler Applied Biosystem by Life Technologies, mikropipet (1000p, 200p dan 10p). Transformasi vektor ke dalam bakteri *E. coli* menggunakan metode Rubidium buffer dengan *heat shock*. Pemberian *heat shock* dilakukan dengan variasi suhu dan waktu yaitu 42°C dan 55°C selama 30 detik dan 60 detik. Efisiensi transformasi dihitung menggunakan formula sebagai berikut:

$$TC \text{ (cfu)} = \frac{\text{Jumlah koloni bakteri} \times \text{rasio pengenceran} \times \text{volume transformasi awal}}{\text{volume yang diplating}}$$

$$TE \text{ (cfu/}\mu\text{g)} = \frac{TCU}{\text{Plasmid DNA } (\mu\text{g)}} \quad (\text{Liu, et al., 20018})$$

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk deteksi keberhasilan transformasi (Fauzia, 2017)

Primer	Sekuen	Produk
<i>HPT</i>	<i>Forward</i> : GAGCCTGACCTATTGCATCTCC <i>Reverse</i> : GGCTCCAGAAGAAGATGTTGG	455 bp
<i>Cas9</i>	<i>Forward</i> : GAAAGAACTGGTGGACAGCAC <i>Reverse</i> : CGTCGTAGGTGTCCTTGCTCAG	402 bp

Pembuatan Kompeten Sel Menggunakan Suhu Dingin

Koloni tunggal bakteri *E. coli* diinokulasikan ke dalam medium 10 mL medium

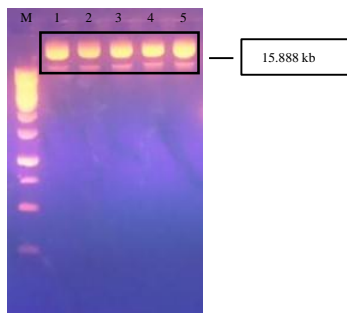
LB cair, diikuti dengan inkubasi pada 37°C selama semalam. Selanjutnya sebanyak 200 μ L kultur dipindahkan ke dalam 5 mL medium LB cair diikuti dengan inkubasi pada 37°C selama \pm 3 jam

hingga mencapai $OD_{600}=0,6$. Sebanyak 1,2 mL kultur *E. coli* di sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 detik. Pelet yang diperoleh kemudian di resuspensi dengan 400 μ L Rubidium buffer. Setelah mencapai homogenasi dengan *slow pipetting*, suspensi diinkubasi di dalam es selama 40 menit. Selanjutnya sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 detik. Pelet diresuspensi kembali dengan 100 μ L rubidium buffer.

Transformasi vektor pRGEB32 ke dalam bakteri *E. coli*

Metode transformasi yang dilakukan mengacu pada Sambrook and Russell (2001). Sebanyak 1 (195 ng/ μ L) μ L plasmid pRGEB32 dimasukkan ke dalam 100 μ L sel kompeten. Selanjutnya suspensi diinversi sebanyak 3 kali diikuti dengan inkubasi dalam es selama 40 menit. Setelah itu suspensi diberi perlakuan *heat shock* dengan variasi suhu dan waktu yaitu: 42°C dan 55°C masing-masing selama 30 detik dan 60 detik. Selanjutnya, suspensi diinkubasi dalam es selama 2 menit. Sebanyak 1 mL medium LB ditambahkan ke dalam suspensi dan gojok dalam shaker incubator 200 rpm pada suhu 37°C selama 1 jam. Suspensi kemudian disentrifugasi dengan 13.000 rpm selama 5 detik. Pelet yang didapatkan diresuspensi dengan 1 mL medium LB. Selanjutnya suspensi dikultur di dalam medium LB yang telah berisi antibiotik kanamisin. Inkubasi dilakukan pada 37°C selama semalam.

Skrining Hasil Transformasi



Gambar 1. Deteksi molekuler isolasi DNA plasmid pRGEB32. M= Marker 1 Kb; 1-5= plasmid pRGEB32.

Plasmid pRGEB32 dengan ukuran molekul besar mengakibatkan migrasinya pada gel agarose 0,8% (b/v) terjadi lambat (90 menit). Konsentrasi agarose bergantung pada ukuran fragmen DNA

Bakteri yang tumbuh pada medium LB+kanamisin kemudian dilakukan skrining untuk mengkonfirmasi keberadaan vektor pRGEB32 di dalam *E. coli*. Skrining dilakukan menggunakan metode PCR koloni dengan GoTaq® Master Mixes. Mesin PCR mengikuti kondisi sebagai berikut: *Pre-denaturasi*: 95°C, 1 menit; *Denaturasi*: 95°C, 30 detik; *Annealing*: 58°C, 30 detik; *Elongation*: 72°C, 30 detik, 35 siklus; *Extention*: 72°C, 5 menit dan *Hold*: 4°C, 30 menit. PCR koloni dilakukan di dalam mesin *Thermocycler Applied Biosystem by Life Technologies* menggunakan primer *HPT* dan *Cas9*.

Hasil dan Pembahasan

A. Isolasi plasmid pRGEB32

Plasmid pRGEB32 yang telah diisolasi, kemudian dikonfirmasi menggunakan elektroforesis (Gambar 1). Visualisasi menunjukkan pita yang terbentuk berada di atas 10.000 bp. Plasmid pRGEB32 memiliki ukuran sebesar 15.888 bp (Xie *et al.*, 2015). Plasmid merupakan molekul DNA ekstra kromosomal yang terpisah dari DNA kromosomal, berbentuk sirkuler dengan ukuran beberapa ribu pasang basa hingga lebih dari 100 kb (Lodish *et al.*, 2000). Teknologi DNA rekombinasi umumnya menggunakan plasmid sebagai vektor pada kloning DNA. Bakteri *E. coli* menjadi bakteri pilihan dalam studi biologi molekuler karena pertumbuhannya cepat pada medium, dan koloninya tidak bertumpuk.

yang akan dipisahkan, mulai dari 0,5%-2%. Konsentrasi agarose yang tinggi akan membentuk pori-pori yang kecil, sedangkan konsentrasi yang rendah akan membentuk pori-pori yang besar. Laju

migrasi molekul DNA di dalam gel agarose ditentukan oleh beberapa faktor seperti: ukuran molekul DNA, konsentrasi agarose, konformasi DNA, voltage yang diberikan, keberadaan pewarna fluoresens, jenis agarose, dan buffer yang digunakan (Lee *et al.*, 2012).

Kemurnian hasil isolasi plasmid diukur dengan menggunakan nanodrop spektrofotometri

pada panjang gelombang 230, 260 dan 280 nm (Tabel 2). Panjang gelombang 260/280 nm memiliki kemurnian DNA plasmid yang tinggi yaitu berkisar antara 1,9-2,0. Hasil ini mengindikasikan bahwa plasmid pRGEB32 yang berhasil diisolasi bebas dari kontaminan berupa protein, RNA ataupun residual senyawa fenol (Matlock, 2015).

Tabel 2. Absorbansi, konsentrasi dan kemurnian plasmid pRGEB32

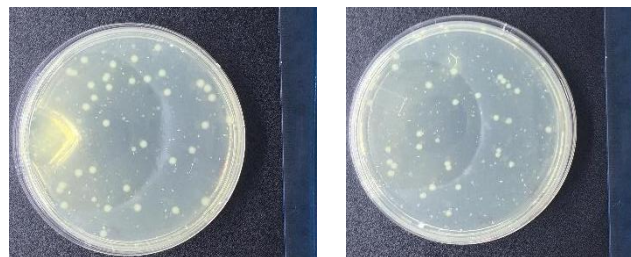
Plasmid pRGEB32	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	A260/A230	A280/A260
Sumur 1	195,65	2,058	2,065
Sumur 2	176,99	2,031	2,023
Sumur 3	181,69	2,047	1,987
Sumur 4	184,85	2,135	1,942
Sumur 5	196,67	2,094	1,851

B. Transformasi pRGEB32 ke dalam *E. coli* DH5 α

Transformasi vektor ke dalam *E. coli* diawali dengan pembuatan kompeten sel DH5 α dengan perlakuan rubidium buffer. Rubidium buffer menyediakan kondisi optimum bagi interaksi antara plasmid DNA dan lipopolisakarida (Panja *et al.*, 2008). Muatan positif pada rubidium menstabilkan muatan antara DNA plasmid dan permukaan membran dengan membentuk ikatan antara rubidium-kepala fosfat DNA dan rubidium-lipopolisakarida membran *E. coli* (Zauqiah, 2006; Asif *et al.*, 2017). Inkubasi es yang

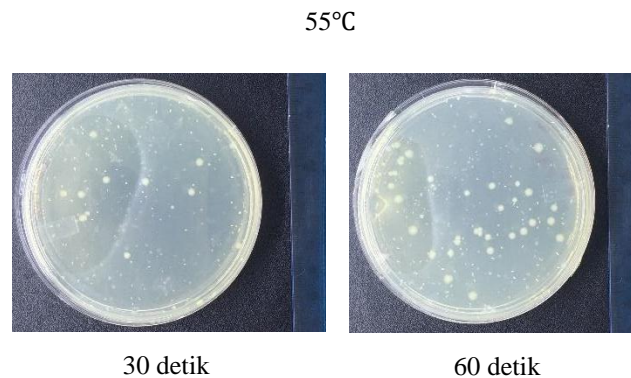
dilakukan pada pembuatan sel kompeten bertujuan menjaga fluiditas membran bakteri. Setelah itu perlakuan *heat shock* mendorong DNA plasmid untuk masuk ke dalam sel kemudian menutup kompleks dinding-membran sel bakteri (Das & Dash, 2015). Suspensi selanjutnya ditumbuhkan ke dalam medium seleksi yang mengandung resisten antibiotik kanamisin. Bakteri transforman yang positif membawa pRGEB32 akan tumbuh dan membentuk koloni pada medium seleksi (Gambar 2). Variasi suhu dan waktu perlakuan *heat-shock* mengakibatkan jumlah koloni yang tumbuh pada medium seleksi berbeda-beda (Tabel 3).

42°C



30 detik

60 detik



Gambar 2. Bakteri transforman tumbuh pada medium seleksi LB yang mengandung kanamisin 50 µg/ml

Tabel 3. Jumlah koloni dan efisiensi transformasi dari masing-masing variasi suhu dan waktu pada medium seleksi

	Variasi Suhu <i>Heat-shock</i>			
	42°C		55°C	
	30 detik	60 detik	30 detik	60 detik
Waktu	30 detik	60 detik	30 detik	60 detik
Jumlah koloni	39	36	13	43
Efisiensi Transformasi	9.966 cfu/µg	9.200 cfu/µg	3.322 cfu/µg	10.989 cfu/µg

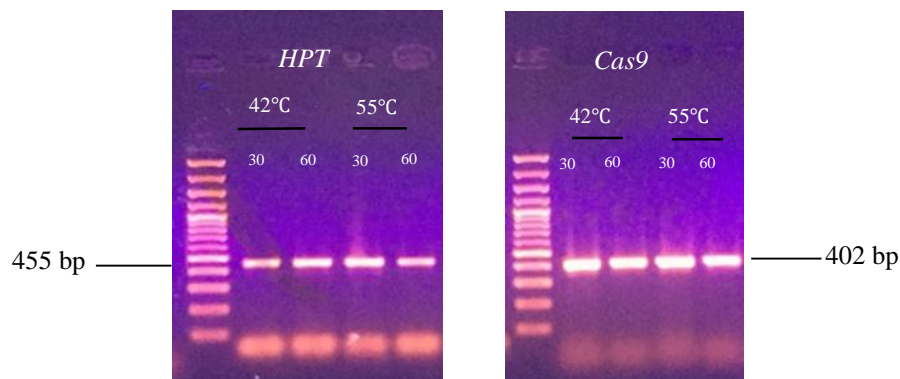
Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa variasi suhu dan waktu perlakuan *heat shock* menghasilkan efisiensi transformasi yang berbeda. Pemaparan *heat shock* yang dalam rentang waktu tertentu, diperkirakan dapat mengubah permeabilitas membran dan membantu proses masuknya DNA plasmid ke dalam sistem bakteri dengan cepat. Panja *et al* (2008) mengungkapkan bahwa kompleks lipopolisakarida-DNA plasmid secara efisien dapat meningkatkan proses pemasukan DNA plasmid ke dalam bakteri dibandingkan dengan DNA plasmid sendiri tanpa adanya interaksi dengan lipopolisakarida.

Beberapa studi mengungkapkan bahwa penggunaan suhu 42°C dengan lama paparan 30 detik menjadi suhu optimum efisiensi transformasi (Sing *et al.*, 2010, Lim *et al.*, 2015). Tabel 3 memberikan informasi bahwa suhu 55°C dengan lama paparan 60 detik menghasilkan efisiensi transformasi sebesar 10.989 cfu/µg dibandingkan dengan pemaparan pada 42°C selama 30 detik. Efisiensi transformasi berkisar antara 10⁸-10¹⁰

untuk plasmid dengan ukuran relatif lebih kecil yaitu 4,4 kb sampai 7,3 kb (Hanahan, 1983; Inoue *et al.*, 1990). Ukuran plasmid yang lebih besar diatas 10 kb, efisiensi transformasinya relatif mengalami penurunan hingga 46% (Inoue *et al.*, 1990). Efisiensi transformasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya yaitu ukuran plasmid yang digunakan, Hanahan (1983) menyatakan efisiensi transformasi menurun bersamaan dengan peningkatan ukuran plasmid. Faktor yang mempengaruhi efisiensi transformasi yang selanjutnya adalah metode transformasi. Transformasi menggunakan bahan kimiawi memberikan efisiensi transformasi yang lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan medan listrik seperti elektroporasi (Inoue *et al.*, 1990). Pemberian suhu 55°C diperkirakan akan membentuk pori membran yang lebih besar dan atau pori membran yang lebih banyak untuk dapat mendorong masuk plasmid ke dalam sistem bakteri. *Heat shock* mengakibatkan terlepasnya lipid dari *outer* membran dan menurunkan

potensial *inner* membran sehingga DNA plasmid dapat masuk ke dalam bakteri *E. coli* (Panja *et al.*, 2009). Selain itu, inkubasi 40 menit dalam es setelah DNA plasmid pRGEB32 dimasukkan ke dalam sel kompeten dan sebelum diberi perlakuan *heat-shock* memediasi DNA plasmid untuk dapat menempel pada *outer* membran *E. coli*, hal ini bertujuan untuk meningkatkan frekuensi penempelan DNA plasmid pada permukaan membran sehingga tepat setelah diberi *heat shock*, dengan cepat DNA plasmid akan masuk ke dalam bakteri.

Deteksi molekuler dilakukan menggunakan primer gen *HPT* dan *Cas9* dengan tujuan untuk mengkonfirmasi benar bahwa bakteri *E. coli* positif membawa plasmid pRGEB32. Amplifikasi menggunakan mesin PCR mengungkapkan bahwa bakteri *E. coli* positif membawa gen *HPT* dengan produk amplifikasi 455 bp dan gen *Cas9* dengan produk amplifikasi 402 bp (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa proses transformasi berhasil dilakukan dengan variasi suhu *heat shock*.



Gambar 3. Deteksi molekuler bakteri transforman. M= DNA Ladder 100 bp; gen *HPT* pada 455 bp dan *Cas9* pada 402 bp

Gen *HPT* secara luas digunakan dalam rekayasa genetik untuk menciptakan tanaman yang dapat menyekresikan protein *HPT* (Lu *et al.*, 2007). Gen *HPT* merupakan *selectable marker* yang dinilai aman, dan diekspresikan dalam jumlah yang kecil/cukup dalam bakteri *E. coli* (Li & Charng, 2014). Gen *Cas9* merupakan gen yang mengekspresikan enzim endonuklease Cas9 (CRISPR associated 9), bertindak sebagai gunting untuk memotong sekuens DNA pada lokasi spesifik yang diarahkan *guide RNA*. pRGEB32 merupakan plasmid vektor yang banyak digunakan dalam teknologi genome editing yaitu CRISPR/Cas9. Transformasi pRGEB32 ke dalam bakteri *Escherichia coli* menjadi langkah awal yang penting dalam mendukung keberhasilan teknologi CRISPR/Cas9. Optimasi suhu dan waktu transformasi pRGEB32 ke dalam *E. coli* belum pernah dilaporkan, sehingga hasil penelitian ini diharapkan menjadi referensi bagi penelitian

selanjutnya dibidang molekuler khususnya genome editing.

Kesimpulan

Hasil penelitian optimasi suhu dan waktu *heat-shock* untuk transformasi pRGEB32 ke dalam *E. coli* menunjukkan suhu yang optimum untuk transformasi yaitu 55°C dengan lama waktu 60 detik.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan bagian penelitian yang didanai oleh program Penelitian Tesis Magister (PTM) Kemenristekdikti dengan no kontrak 2017/UN1/DITLIT/DIT-LIT/PT/2020. Terimakasih kepada teman-teman grup riset *Pigmented Rice* atas masukan dan diskusi selama penelitian berlangsung.

Referensi

- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R. & Rehman, Y. (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1-5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02169>.
- Berges, T. & Barreau, C. (1989). Heat Shock at an Elevated Temperatures Improves Transformation Efficiency of Protoplast from *Podospira anserina*. *Journal of General Microbiology*. 135(1), 601-604. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-3-601>.
- Chan, W., Verma, C. S., Lane, D. P. & Gan, S. K. (2013). A Comparison and Optimization of Methods and Factors Affecting the Transformation of *Escherichia coli*. *Bioscience Report*. 33, 931-943. Doi: 10.1042/BSR20130098.
- Curtiss, R., Inoue, M., Pereira, D., Hsu, J. C., Alexander, L., & Rock, L. (1977). Construction and use of safer bacterial host strains for recombinant DNA research in *Molecular Cloning of Recombinant DNA*, eds W. A. Scott and R. Werner. *Academic Press Inch*. New York. 99–114. ISBN 0-12-634250-4.
- Das, S. & Dash, H. R. (2015). Microbial Biotechnology – A laboratory Manual for Bacterial System. *Springer*. New Delhi. Doi: 10.1007/978-81-322-2095-4.
- Fauzia, A. N. (2017). Overekspresi Gen *OsRKD4* Pada Padi Hitam (*Oryza sativa* L. ‘Cempo Ireng’) Untuk Induksi Embriogenesis Somatik. Unpublished Thesis in partial fulfilment of the requirements for the degree of Magister of Science. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Greenwood, N. N. & Earnshaw, A. (1997). Chemistry of the Elements: Lithium, Sodium, Potassium, Rubidium, Caesium and Francium. *Chemistry of Elements (Second Edition)*. Butterworth-Heinemann. US. ISBN: 978-0-7506-3365-9, pp: 68-106.
- Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166(1), 557-580. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
- Inoue H., Nojima, H. & Okayama H. (1990). High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Gene*. 96, 23-28. Doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G, Polard, P. & Claverys, J. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*. 12(3), 181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>.
- Li, K. & Charng, Y. (2012). The use of hygromycin phosphotransferase gene (hpt) with an artificial intron to obtain marker-off transgenic plants. *African Journal of Biotechnology*. 11(6), 1330-1336. Doi: 10.5897/AJB11.2198.
- Lim, G., Lum, D., Ng, B. & 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 (JEMI)*. 1-6. <https://jemi.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/Lim%20et%20al.pdf>
- 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 Journal Microbial*. 58(4), 448-456. doi: 10.1007/s12088-018-0743-z.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4 th Edition. *W. H. Freeman and Company*. New York. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>.
- Lu, Y., Xu, W., Kang, A., Luo, Y., Guo, F., Yang, R., Zhang, J. & Huang, K.

- (2007). Prokaryotic Expression and Allergenicity Assessment of Hygromycin B Phosphotransferase Protein Derived from Genetically Modified Plants. *Journal of Food Science*. 72(7), 228-232. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00437.x.
- Matlock, B. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. *Technical Note 52646*. Thermo Fisher Scientific, USA. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>.
- Ohse, M., Takahashi, K., Kadowaki, Y. & Kusaoke, H. (1995) Effects of Plasmid DNA Sizes and Several Other Factors on Transformation of *Bacillus subtilis* ISW1214 with Plasmid DNA by Electroporation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 59(8), 1433-1437. DOI: 10.1271/bbb.59.1433
- Panja, S., Aich, P., Jana, B. & Basu, T. (2008). Plasmid DNA Binds to the Core Oligosaccharide Domain of LPS Molecules of *E. coli* Cell Surface in the CaCl₂-Mediated Transformation Process. *Biomacromolecules*. 9(9), 2501–2509. doi: 10.1021/bm8005215.
- Panja, S., Aich, P., Jana, B. & Basu, T. (2009). How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*?. *Molecular Membrane Biology*. 25(5), 411-422. doi: 10.1080/09687680802187765.
- Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S. S. & Mobasheri, H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular Biology Research Communications*. 5(4), 257-261. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28261629/>.
- Roychoudhury, A., Basu, S., & Sengupta, D. N. (2009). Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 46, 395-400. https://www.researchgate.net/publication/40758372_Analysis_of_comparative_efficiencies_of_different_transformation_methods_of_E_coli_using_two_common_plasmid_vectors.
- Sambrook, J and Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning, Third Edition*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. ISBN-13: 978-0879695774.
- Simanjuntak, J. G. (2021). *Transformation of Rice Calli With CRISPR-Cas9 Constructs To Edit The Yield-Related Genes*. Published An undergraduate thesis in partial fulfilment of the requirements for the degree of Bachelor of Science. IPB University. Bogor.
- Sing, M., Yadav, A., Ma, X. & Amoah, E. (2010). Plasmid DNA transformation in *Escherichia coli*: effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of CaCl₂ treated cells. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 6(4), 561-568. https://www.researchgate.net/publication/216199837_Plasmid_DNA_transformation_in_Escherichia_Coli_effect_of_heat_shock_temperature_duration_and_cold_incubation_of_CaCl2_treated_cells.
- Tjahjoleksono, A. (2021). *Teknologi DNA Rekombinan*. Institut Pertanian Bogor. <http://web.ipb.ac.id/~tpb/files/materi/genetika/dnarekombinan/textdnarekombinanpdf.pdf>.
- Walker, John M. (1984). *Nucleic Acids Volume 2: Bacterial Transformation (Kushner Method)*. Humana Press. New Jersey. ISBN 978-1-59259-489-4. Doi: 10.1385/0-89603-064-4:241
- Wiley, J. M., and Woolverton, C. J. (2008). Prescott Harley, and Klein's *Microbiology* 7 ed. The McGraw-Hill Companies. Inc. Newyork. USA. ISBN-978-0-07-337526-7.

- Xie K., Minkenberg, B. & Yang, Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 Multiplex Editing Capability with Endogenous tRNA-Processing System. *PNAS*. 12(11), 3570-3575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>.
- Yun, L. P., John, C., Chih-Yuan, H. & Hoon, K. Y. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for The Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 62, 172-173. DOI:10.3791/3923.
- Yusuf, B., Nur, A. M., Yunitasari, N. F., Widiastuti, T. A., & Puspitasari, E. (2014). Stability of *gag-ca* gene of Jembrana Virus in pCDNA-ca Recombinant Plasmid Vector in *Escherichia coli* DH5 α Which Has Been Stored fo Eight Years. *Jurnal Sain Veteriner*. 32(2), 177-184. <https://doi.org/10.22146/jsv.6551>.
- Zauqiah, A. D., Tedja, I. & Susilowati, D. N. (2006). Karakterisasi Lipopolisakarida *Bradyrhizobium japonicum* KDR 15 Toleran Logam Berat. *HAYATI Journal of Biosciences*. 13(3), 113–118. [https://doi.org/10.1016/S1978-3019\(16\)30303-5](https://doi.org/10.1016/S1978-3019(16)30303-5).