

RESEARCH ARTICLE

Perbandingan dan Optimasi Metode Pembuatan Kompeten Sel *Escherichia coli*, Media dan Suhu Transformasi pET-32-HCR-CTB sebagai Dasar Pengembangan Kandidat Vaksin COVID

Comparison and Optimatization of Methods for Manufacturing Competens Cell Escherhichiae coli, Media and Transformation Temperature pET-32-HCR-CTB as a Basis for Developing a COVID Vaccine Candidate

Soeyati Poejiani*, Suci Megasari, Valentina Yurina

Program Studi Pendidikan Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

*E-mail: ucik.fk@ub.ac.id

ABSTRAK

Vaksinasi merupakan salah satu strategi utama dalam mengatasi pandemi. Saat ini sebagian besar vaksin yang dikembangkan merupakan vaksin berbasis teknologi rekombinan. Protein rekombinan sering menggunakan bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) karena mudah dimanipulasi secara genetik dan relatif aman untuk dikembangkan. Teknologi DNA rekombinan menggunakan berbagai jenis plasmid sebagai vektor utama yang memfasilitasi masuknya DNA rekombinan ke dalam bakteri. Plasmid pET-32 merupakan plasmid yang dikembangkan untuk kloning dan ekspresi protein rekombinan pada *E. coli*. Meskipun metode transformasi plasmid pada bakteri cukup lama dikembangkan, namun sering menemui kendala dalam prosesnya. Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode pembuatan sel kompeten dan metode transformasi yang paling efektif. Metode pembuatan sel kompeten dengan menggunakan *calcium chloride* (CaCl_2) dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO), serta optimasi transformasi gen pET-32-HCR-CTB ke dalam sel kompeten BL21 dilakukan menggunakan kondisi *heat shock* pada suhu 42°C selama 45 detik dan 60 detik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan DMSO dalam pembuatan sel kompeten menghasilkan efisiensi transformasi sebesar $3,5 \times 10^3$ CFU/ μg . Klon bakteri yang tumbuh setelah proses transformasi kemudian diuji menggunakan PCR, yang mengonfirmasi keberadaan gen pET-32-HCR-CTB. Dengan demikian, variasi metode pembuatan sel kompeten BL21 dan kondisi optimum transformasi yang diperoleh dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan lebih lanjut dalam produksi vaksin COVID berbasis protein rekombinan.

Kata Kunci: Optimasi metode, sel kompeten, suhu transformasi

ABSTRACT

Vaccination is one of the main strategies in combating the pandemic. Currently, most vaccines being developed are based on recombinant technology. Recombinant protein production frequently utilizes *E. coli* due to its ease of genetic manipulation and relative safety for development. Recombinant DNA technology employs various types of plasmids as primary vectors to facilitate the insertion of recombinant DNA into bacterial cells. The pET-32 plasmid is one such vector, designed for cloning and expressing recombinant proteins in *E. coli*. Although plasmid transformation methods in bacteria have been developed for a long time, the process often encounters several challenges. This study aims to develop an effective method for preparing competent cells and optimizing the transformation process. The competent cells were prepared using *calcium chloride* (CaCl_2) and *dimethyl sulfoxide* (DMSO), and the transformation of the pET-32-HCR-CTB gene into BL21 competent cells was optimized using a heat shock at 42°C for 45 seconds and 60 seconds. The results showed that the use of DMSO in competent cell preparation resulted in a transformation efficiency of 3.5×10^3 CFU/ μg . Bacterial clones that grew after the transformation process were tested using PCR, confirming the presence of the pET-32-HCR-CTB gene. Therefore, the variation in the BL21 competent cell preparation method and the optimized transformation conditions obtained in this study can serve as a foundation for further development of recombinant protein-based COVID vaccine production.

Keywords: Method optimization, competent cells, transformation temperature

Submitted: April 17th 2025 | Revised: June 24th 2025 | Accepted: June 29th 2025 | Published: June 30th 2025

Pendahuluan

Pandemi *corona virus disease* (COVID) membuka peluang untuk melakukan penelitian tentang vaksin yang efektif, terutama yang terjangkau, mudah diproduksi dalam skala besar, dan mudah dibuat. Vaksin berbasis protein rekombinan telah muncul sebagai kandidat menjanjikan karena keamanannya dan kemampuannya beradaptasi dengan varian baru. Vaksin protein rekombinan dibuat melalui teknologi DNA rekombinan yang diover-ekspresikan menjadi protein rekombinan. Salah satu langkah penting dalam produksi vaksin rekombinan adalah transformasi plasmid yang efisien ke dalam sel inang bakteri. *Escherichia coli* banyak digunakan untuk tujuan ini karena pertumbuhannya yang cepat, genetika yang terkarakterisasi dengan baik, dan kemudahannya untuk dimanipulasi. Namun, efisiensi transformasi masih menjadi keterbatasan teknis. Plasmid besar seperti pET-32, merupakan plasmid yang dikembangkan untuk kloning dan ekspresi protein rekombinan dengan *E. coli* sebagai *host*. Plasmid pET-32 membawa *highly conserved region* (HCR) dari *protein spike severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) ke dalam sel *host E.coli* BL21(DE3) [1]. Region ini dipilih sebagai kandidat vaksin yang menjanjikan karena level mutasinya yang rendah sehingga diharapkan dapat efektif untuk berbagai *strain* virus yang baru [2]. Transformasi melibatkan banyak variabel, termasuk persiapan sel kompeten, parameter *heat shock*, dan media seleksi [3]. Meskipun ada beberapa metode untuk persiapan sel kompeten—seperti yang melibatkan kalsium klorida (CaCl_2) atau dimetil sulfoloksida (DMSO)—penelitian perbandingan tentang efektivitasnya dalam kombinasi dengan protokol *heat shock* masih terbatas. Secara khusus, pengaruh durasi *heat shock* dan sistem *buffer* terhadap efisiensi transformasi menggunakan plasmid besar masih belum banyak dieksplorasi. Selain itu, pemilihan transformasi dengan metode *heat shock* dikarenakan cukup sederhana dan dapat dilakukan di laboratorium pendidikan. Kelemahan dari metode ini memerlukan optimasi dengan pemilihan garam yang sesuai dalam pembuatan sel kompeten, media pertumbuhan, dan lama waktu *heat shock*. Transformasi berhasil bila ditandai dengan tumbuhnya bakteri *E. coli* BL21(DE3) yang membawa plasmid pET-32-HCR.

Menurut Chan *et al.* [4] ada empat macam garam yang umum digunakan untuk pembuatan sel kompeten *E. coli* yaitu DMSO, MgCl_2 - CaCl_2 , dan CaCl_2 dengan metode Hanaan. Pemakaian garam dalam penelitian ini menggunakan DMSO MgCl_2 - CaCl_2 . Penggunaan *Luria Bertani Broth* (LB) dan *Super Optimal Broth* (SOB) dalam penelitian ini dapat memberikan dampak yang berbeda pada berbagai jenis kompeten sel turunan *E. coli* [5] sedangkan Patigu *et al.* [3] hanya menggunakan LB.

Proses *heat shock* dalam rentang waktu tertentu dapat mengubah permeabilitas membran bakteri. *Heat shock* suhu 42°C dengan waktu 30 detik menjadi suhu maksimum efisiensi transformasi [6], sedangkan Chan *et al.* [4] menyatakan tidak ada perbedaan pada 45 detik atau 90 detik. Penelitian ini membatasi proses *heat shock* pada suhu 42°C dengan waktu 40, 90, dan 120 detik.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan dua protokol untuk mempersiapkan sel kompeten *E. coli* BL21(DE3) menggunakan metode berbasis CaCl_2 dan DMSO, serta untuk mengoptimalkan parameter transformasi untuk plasmid pET-32-HCR-CTB. Efisiensi transformasi dievaluasi menggunakan

unit pembentuk koloni per mikrogram DNA plasmid, dan dianalisis untuk mengkonfirmasi keberhasilan integrasi gen.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: bakteri *Escherichia coli*, BL21(DE3), dan *Escherichiae coli* DH5 α . Plasmid pET-32-HCR-CTB yang merupakan hasil kloning sebelumnya. *Transformation Storage Buffer* (TSB), media LB, SOB, dan *Super Optimal Broth with Catabolite repression* (SOC), serta reagen CaCl_2 , DMSO, MgCl_2 , MgSO_4 , dan PEG diperoleh dari Sigma-Aldrich. Antibiotik ampicilin $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ digunakan sebagai agen seleksi.

Metode

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan pendekatan kuantitatif menggunakan optimasi metode pada suhu dan pembuatan sel kompeten. Variabel bebas meliputi metode pembuatan sel kompeten (CaCl_2 vs DMSO), media pertumbuhan (LB vs SOB/SOC), dan durasi *heat shock* (45 detik vs 60 detik). Variabel terikat adalah efisiensi transformasi (CFU/ μg plasmid DNA). Kontrol negatif dilakukan tanpa penambahan plasmid. Uji hipotesis dilakukan melalui optimalisasi metode dengan media dan suhu dalam pembuatan kompeten sel sebagai dasar pengembangan pembuatan kandidat vaksin COVID. Data hasil penelitian dianalisis dengan mendeskripsikan efisiensi transformasi pada kondisi *heat shock* dengan menggunakan DMSO atau CaCl_2 .

1. Pembuatan Sel Kompeten

Suspensi bakteri baik kompeten sel dengan metode DMSO dan CaCl_2 ditanam pada medium LB dan SOB yang mengandung antibiotik ampicilin $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam, masing-masing konsentrasi dilakukan sebanyak tiga kali.

2. Metode CaCl_2 dan DMSO

Metode penggunaan CaCl_2 diadaptasi dan dimodifikasi dari metode Mandel dan Hlga, 1970. *Pellet* bakteri BL21(DE3) diresuspensi dengan CaCl_2 0,1 M dingin dan steril, diinkubasi selama 1 jam. Suspensi bakteri disentrifus 4000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. *Pellet* bakteri selanjutnya diresuspensi dengan 4 mL CaCl_2 0,1 M dalam gliserol 15%, selanjutnya dimasukkan dalam *cryo tube* dan disimpan pada suhu -80°C .

Metode penggunaan DMSO diadaptasi dan dimodifikasi dari metode Chung dan Mille, 1988. *Pellet* bakteri BL21(DE3) diresuspensi dengan 4 mL TSB dingin, LB, PEG, DMSO 5%, 10 mM MgCl_2 , dan 10 mM MgSO_4 . Larutan disaring dengan *sartorius filter* ukuran $0,45\text{ }\mu\text{m}$ kemudian diinkubasi di atas es selama 30 menit. Bakteri BL21(DE3) sebanyak $100\text{ }\mu\text{L}$ selanjutnya dimasukkan dalam *cryo tube* dan disimpan pada suhu -80°C .

3. Metode Transformasi Heat Shock dengan Kompeten Sel Perlakuan DMSO dan CaCl_2

Kompeten sel BL21(DE3) dengan metode DMSO sebanyak $100\text{ }\mu\text{L}$ ditambahkan plasmid pET-HCR $1\text{ }\mu\text{L}$ ($0,1\text{ ng}/\mu\text{L}$), kemudian diinkubasi di atas es selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan selama 45 detik dan 60 detik, kemudian diinkubasi di es selama 2 menit. Suspensi sel ditumbuhkan pada 0,9 mL TSB dengan penambahan 20 mM glukosa pada

suhu 37°C selama 60 menit.

Sel kompeten *E. coli* BL21(DE3) dengan metode CaCl₂ sebanyak 100 µL ditambahkan plasmid pET-HCR 1 µL (0,1 ng/µL), kemudian diinkubasi dalam es selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan *heat shock* dengan durasi waktu 45 detik dan 60 detik, dan diinkubasi di atas es selama 2 menit. Sebanyak 100 µL LB atau SOC ditambahkan ke dalam suspensi bakteri, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 60 menit.

Perhitungan efisien transformasi dihitung dengan formula berikut [7]:

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

(1)

$$TE\ (CFU/\mu\text{g}) = \frac{TC}{\text{Plasmid DNA}\ (\mu\text{g})}$$

(2)

4. PCR

Pemeriksaan metode PCR digunakan untuk mengamati bakteri kompeten telah berhasil membawa plasmid pET-HCR dengan primer HCR-CTB F2: 5’GTCGGTACCGATAGTCTTA3’. HCR-CTB R2: 5’GAATTCGAGCTCGAGATT3’.

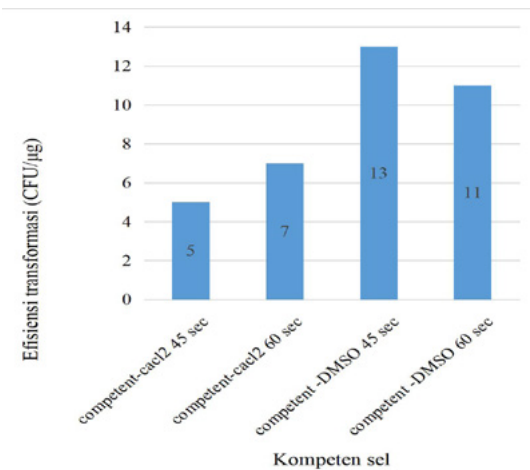
5. Analisis Data

Analisis data yang di dapat dari hasil hitung jumlah koloni dan efisiensi transformasi sel kompeten dengan perlakuan media, waktu *heat shock*, serta hasil plasmid diuji dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Hasil

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode pembuatan sel kompeten dan durasi *heat shock* berpengaruh signifikan terhadap efisiensi transformasi plasmid pET-32-HCR-CTB ke dalam *E. coli* BL21(DE3). Sel kompeten yang dibuat dengan metode DMSO menunjukkan efisiensi transformasi tertinggi yaitu 1,3 × 10⁴ CFU/µg DNA plasmid pada perlakuan *heat shock* selama 45 detik. Sebaliknya, metode CaCl₂ menghasilkan efisiensi maksimum sebesar 7 × 10³ CFU/µg pada durasi 60 detik. Hasil ini ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Jumlah koloni dan efisiensi transformasi pada berbagai variasi sel kompeten dan waktu <i>heatshock</i>					
Perlakuan transformasi kompeten	Waktu (detik)	Ulangan	Jumlah koloni	Rerata	Efisiensi transformasi (CFU/µg)
CaCl ₂	45	1	3	5	3 x 10 ³
		2	7		7 x 10 ³
		3	5		5 x 10 ³
	60	1	7	7	5 x 10 ³
		2	8		7 x 10 ³
		3	4		8 x 10 ³
		1	7	11	4 x 10 ³
		2	24		7 x 10 ³
		3	6		7 x 10 ³
DMSO	45	1	22	13	24 x 10 ³
		2	2		6 x 10 ³
		3	9		13 x 10 ³
	60	1	22	11	22 x 10 ³
		2	2		2 x 10 ³
		3	9		9 x 10 ³



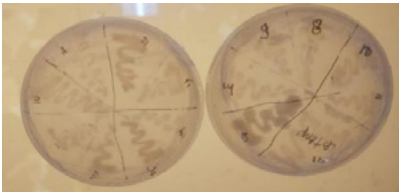
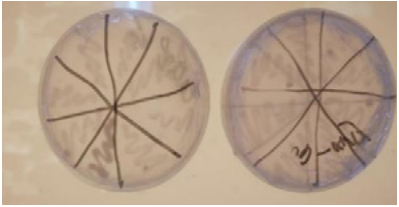
Gambar 1. Grafik variasi kompeten sel DMSO-CaCl₂ dan lama waktu *heatshock*

Plasmid pET-HCR diisolasi dari bakteri menggunakan *Presto TM Mini Plasmid* (Geneaid). Hasil isolasi plasmid diukur dengan *nanodrop* dapat diamati pada Tabel 2. Rerata konsentrasi DNA plasmid 100 ng/µL dan batas kemurnian plasmid DNA antara 1,9-2.

Tabel 2. Hasil pengukuran <i>nanodrop</i> isolasi DNA plasmid pET-HCR		
pET-HCR	Konsentrasi (ng/µL)	λ (260/280)
1	105,7	1,933
2	97,26	1,935
3	96,8	1,944
4	105,9	1,929
5	92,31	1,951

Tabel 3. Hasil PCR plasmid	
Gel Elektroforesis	Keterangan
	1. Well 1-3 Plasmid hasil transforman BL21- waktu <i>heatshock</i> 45 detik CaCl ₂
	2. Well 4-6 Plasmid hasil transforman BL21- CaCl ₂ waktu <i>heatshock</i> 60 detik
	3. Well 7 Marker
	4. Well 7-9 Plasmid hasil transforman BL21-DMSO waktu <i>heatshock</i> 45 detik
	5. Well 10-12 Plasmid hasil transforman BL21-DMSO waktu <i>heatshock</i> 60 detik

Tabel 4. *Replica plating* bakteri transforman BL21 metode CaCl_2 dan DMSO pada lama waktu *heat shock* 45 detik dan 60 detik

Waktu (detik)	Media	Gambar Koloni pada Media LB-Ampicillin
45	CaCl_2	
60	DMSO	

Pembahasan

Transformasi *heat shock* diawali dengan pembuatan sel kompeten BL21 dengan dua metode CaCl_2 dan DMSO. Bakteri kompeten *E. coli* BL21 ditumbuhkan sampai *log phase* (panjang gelombang 600 nm 0,3-0,5) (**Tabel 1**). *Log phase* adalah fase yang ideal untuk pembuatan kompeten karena merupakan titik panen optimal sel kompeten *E. coli*, sel juga efisien dalam menyerap dan memperbaiki DNA [5].

Tabel 1 menunjukkan bahwa variasi waktu *heat shock* yang berbeda memberikan efisiensi transformasi yang berbeda. Sel kompeten variasi CaCl_2 mempunyai efisien transformasi tertinggi pada perlakuan waktu *heat shock* 60 detik dibandingkan waktu *heat shock* 45 detik dengan efisiensi transformasi 7×10^3 CFU/ μg . Efisiensi transformasi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti ukuran plasmid. Semakin besar ukuran plasmid, akan menurunkan efisiensi transformasi. Plasmid pET termasuk golongan plasmid yang mempunyai ukuran besar, oleh karena itu pada suhu 42°C membutuhkan waktu yg lebih lama yaitu 60 detik agar dapat masuk ke dalam kompeten sel. Menurut Panja *et al.* [8] pada kondisi *heat shock* $0-42^\circ\text{C}$ sel akan menurunkan fluiditas membrannya dengan melepas lipid ke medium, mengakibatkan banyak pori di permukaan membran. Hal ini mengakibatkan DNA dapat melalui *membrane barrier*.

Transformasi berhasil optimal menggunakan sel kompeten berbasis DMSO. Kompeten sel dengan variasi DMSO pada suhu 42°C waktu 45 detik mempunyai efisiensi tertinggi 13×10^3 CFU/ μg , dibandingkan perlakuan pada suhu 60 detik. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kombinasi PEG, ion Mg^{2+} dan DMSO yang meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri. Durasi *heat shock* yang lebih singkat (45 detik) cukup efektif karena *buffer* DMSO telah membuat sel dalam kondisi siap menerima DNA. Sebaliknya, metode CaCl_2 memerlukan durasi lebih lama karena mekanisme penetrasi DNA lebih tergantung pada gangguan fisik membran oleh suhu tinggi.

Temuan ini sejalan dengan penelitian Chan *et al.* [4] yang menyebutkan bahwa penambahan PEG dan DMSO mampu meningkatkan efisiensi transformasi. Namun demikian, hasil ini tetap memerlukan validasi lanjutan dalam skala lebih besar dan variabel DNA lain.

Data pada **Tabel 2** menunjukkan bahwa plasmid pET-HCR yang diisolasi bebas dari kontaminan RNA, protein dan fenolik [9], sehingga memenuhi syarat untuk digunakan dalam transformasi *heat shock* pada langkah selanjutnya. Dapat diamati pada **Tabel 3**, hasil PCR dengan primer spesifik HCR *spike* menunjukkan semua sample positif pada 950 bp, menyatakan bahwa koloni bakteri membawa plasmid positif pET-HCR. **Tabel 4** menunjukkan hasil konfirmasi *cloning* dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik yang mengenali gen pengkode HCR *spike*. Koloni transforman yang diduga mengandung plasmid pET-HCR diinokulasi ke media *agar plate* yang mengandung antibiotik ampicilin dengan metode *replica plating*. Bakteri yang tumbuh diisolasi plasmid menggunakan metode PCR menunjukkan hasil positif membawa plasmid pET-HCR.

Kesimpulan

Penelitian ini berhasil menunjukkan bahwa metode pembuatan sel kompeten menggunakan DMSO lebih efektif dibandingkan metode CaCl_2 dalam mentransformasi plasmid pET-32-HCR-CTB ke dalam *E. coli* BL21(DE3). Efisiensi tertinggi sebesar $1,3 \times 10^4$ CFU/ μg diperoleh pada perlakuan *heat shock* selama 45 detik pada suhu 42°C menggunakan sel kompeten DMSO. Uji PCR mengonfirmasi keberhasilan integrasi plasmid ke dalam genom bakteri. Optimasi protokol ini memberikan pendekatan efisien dan dapat direkomendasikan sebagai prosedur standar untuk produksi protein rekombinan berbasis *E. coli* dalam pengembangan kandidat vaksin subunit COVID. Ke depan, metode ini dapat diadaptasi untuk berbagai aplikasi bioteknologi lainnya yang melibatkan manipulasi genetik melalui transformasi bakteri. Variasi metode pembuatan sel kompeten BL21 dan kondisi optimum transformasi gen pET-32-HCR-CTB dapat digunakan untuk penelitian lanjutan guna mengembangkan vaksin COVID maupun penelitian bioteknologi lain yang menggunakan teknik transformasi *heat-shock*.

Referensi

- [1] Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Mar 10;12(3):181–96. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
- [2] Yurina V. Coronavirus epitope prediction from highly conserved region of spike protein. *Clin Exp Vaccine Res.* 2020;9(2):169. doi: <https://doi.org/10.7774/cevr.2020.9.2.169>
- [3] Patigu RF, Wijayanti P, Sebastian A, Purwestri YA. Optimization of heat shock temperature and time on the transformation of pRGE32 into *Escherichia coli* DH5 α . *J Biol Trop.* 2021 Sep 13;21(3):632–40. doi: <http://dx.doi.org/10.29303/jbt.v21i3.2811>
- [4] Chan WT, Verma CS, Lane DP, Gan SKE. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Biosci Rep.* 2013 Dec 1;33(6). doi: <https://doi.org/10.1042/bsr20130098>
- [5] Hans S, Gimpel M, Glauche F, Neubauer P, Cruz-Bournazou MN. Automated Cell Treatment for Competence and Transformation of *Escherichia coli* in a High-Throughput Quasi-Turbidostat Using Microtiter

- Plates. *Microorganisms*. 2018 Jun 25;6(3):60. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030060>
- [6] Lim G, Lum D, Ng B, Sam C. Differential Transformation Efficiencies Observed for PUC19 and pBR322 in *E. coli* May Be Related to Calcium Chloride Concentration. *J Exp Microbiol Immunol (JEMI)*. 2015;1–6.
- [7] Liu J, Chang W, Pan L, Liu X, Su L, Zhang W, et al. An Improved Method of Preparing High Efficiency Transformation *Escherichia coli* with Both Plasmids and Larger DNA Fragments. *Indian J Microbiol*. 2018 Dec 29;58(4):448–56. doi: <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0743-z>
- [8] Panja S, Aich P, Jana B, Basu T. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Mol Membr Bio*. 2008 Jan 9;25(5):411–22. doi: <https://doi.org/10.1080/09687680802187765>
- [9] Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. Technical Note 52646. Wilmington, MA, USA: Thermo Fisher Scientific; 2015.