

Respon Immunogenitas Protein Permukaan 19 kDa *Streptococcus pneumoniae*

(Immunogenicity Response of *Streptococcus pneumoniae* 19 kDa Surface Protein)

Muhammad Dimas Arya Candra Permana, Dini Agustina, Bagus Hermansyah
Fakultas Kedokteran, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: drdimasarya@gmail.com

Abstract

Pneumonia is the main common cause of children death in the world. Microbiological studies found the major causes of pneumonia is Streptococcus pneumoniae. Infection of S.pneumoniae influenced by several virulence factors, one of which is surface protein. The purpose of this study was to determine the immunogenicity of 19 kDa S.pneumoniae surface protein through hemagglutination inhibition and adhesion inhibition test. Adhesion inhibition test used antibodies that is formed from surface protein, to inhibit bacterial adhesion to the enterocytes. Hemagglutination inhibition test also used antibodies that formed from surface protein, to inhibit the agglutination of erythrocytes caused by S.pneumoniae. The results showed that antibodies, which was formed from 19 kDa S.pneumoniae surface protein, were able to inhibit hemagglutination process up to 1X dilution. Adhesion inhibition test showed that the higher antibody dilution, the greater the adhesion index. Pearson correlation analysis of the adhesion test showed that there was a significant correlation between antibody dilution with bacterial adhesion index ($R= -0,787$; $p=0,036$). It can be concluded that the 19 kDa surface protein of S.pneumoniae was immunogenic.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae, surface protein, antibody*

Abstrak

Pneumonia merupakan penyebab utama kematian bayi dan balita di seluruh dunia. Studi mikrobiologi menemukan penyebab utama pneumonia pada balita adalah *Streptococcus pneumoniae*. Infeksi oleh *S.pneumoniae* dipengaruhi oleh beberapa faktor virulensi, salah satunya adalah protein permukaan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui immunogenitas protein permukaan *S.pneumoniae* dengan berat molekul 19 kDa melalui uji hambat hemaglutinasi dan uji hambat adhesi. Uji hambat adhesi menggunakan antibodi yang terbentuk dari protein permukaan, untuk menghambat adhesi bakteri ke enterosit mencit. Uji hambat hemaglutinasi juga menggunakan antibodi yang terbentuk dari protein permukaan, untuk menghambat aglutinasi eritrosit yang disebabkan oleh *S.pneumoniae*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi yang berasal dari protein permukaan 19 kDa *S.pneumoniae* mampu menghambat proses hemaglutinasi hingga pengenceran 1X. Hasil uji hambat adhesi menunjukkan bahwa semakin tinggi pengenceran antibodi, semakin besar indeks adhesi. Uji korelasi pearson menunjukkan hubungan yang sangat kuat antara pengenceran antibodi dengan indeks adhesi bakteri ($R= -0,787$; $p=0,036$). Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein permukaan 19 kDa *S.pneumoniae* bersifat imunogenik.

Kata kunci: *Streptococcus pneumoniae, protein permukaan, antibodi*

Pendahuluan

Pneumonia merupakan penyebab utama kematian bayi dan balita di seluruh dunia, sekitar 18% dari seluruh kasus kematian. Pada tahun 2011, diperkirakan terjadi 1,3 juta kematian [1]. Hampir semuanya terjadi di negara berkembang, 75% terjadi hanya di 15 negara. Indonesia berada di urutan ke-11 negara dengan angka kematian tertinggi akibat pneumonia pada balita, sebesar 21,9 [2]. Studi mikrobiologik menemukan penyebab utama pneumonia pada balita adalah *Streptococcus pneumoniae* (30-50% kasus pneumonia) [3].

Streptococcus pneumoniae memiliki beberapa faktor virulensi yang terlibat dalam proses infeksi, diantaranya adalah protein permukaan yang merupakan protein adhesi. Beberapa protein permukaan berperan dalam perlekatan dan kolonisasi di nasofaring, menghambat aktivasi komplemen, dan merusak pertahanan mukosa saluran pernapasan [4]. Kolonisasi atau infeksi oleh *S.pneumoniae* akan meningkatkan respon imun terhadap masing-masing struktur yang berperan dalam patogenesis [5].

Molekul adhesi pada setiap bakteri mempunyai berat molekul yang berbeda-beda. Pada penelitian pendahuluan telah diperoleh protein permukaan *S. pneumoniae* dengan berat molekul 19 kDa dari hasil SDS-PAGE. Protein permukaan tersebut terbukti berfungsi sebagai molekul adhesi.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan protein adhesi yang berasal dari protein permukaan *S.pneumoniae* dengan berat molekul 19 kDa bersifat imunogenik melalui uji hambat hemaglutinasi dan uji hambat adhesi.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *true experimental laboratories* yang dilaksanakan di laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada bulan September 2013. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah eritrosit dan enterosit dari mencit jantan galur Balb/c dengan berat 20-30 gram yang berumur 2-3 bulan.

Untuk mendapatkan antibodi yang akan digunakan pada uji hambat adhesi dan hambat hemaglutinasi, terlebih dahulu mencit diinjeksi

protein permukaan dan adjuvant. Pada hari ke-1, mencit diinjeksi protein permukaan dan *complete Freund's adjuvant* (CFA), yang sebelumnya dicampur terlebih dahulu dan divortex selama 5 menit, dengan perbandingan 1:1 masing-masing sebanyak 50 µl secara intraperitoneal. Pada hari ke-8, 15, dan 22, mencit mendapatkan booster berupa protein *incomplete Freund's adjuvant* sebanyak 50 µl [6].

Isolasi serum mencit pada penelitian ini dilakukan dengan cara mengambil darah mencit dari jantung. Sampel darah mencit dimasukkan ke tabung tanpa EDTA. Selanjutnya, sampel darah didiamkan selama 20-30 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit agar supernatan terpisah dari pelet. Supernatan disimpan dalam tabung steril [7].

Metode isolasi eritrosit mencit pada penelitian ini menggunakan petunjuk dari Li (1999). Darah mencit diambil dari jantung dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang berisi EDTA. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pellet yang dihasilkan ditambah dengan PBS pH 7,4 sebanyak 2 ml kemudian disentrifugasi lagi. Langkah tersebut di atas dilakukan sebanyak 3 kali hingga diperoleh eritrosit murni [8].

Uji hambat hemaglutinasi dikerjakan sesuai petunjuk Jones & Freter (dalam Satwikaputra, 2010). Serum diencerkan 0,5 kali pada mikroplate V dengan volume masing-masing 50 µl dengan larutan pengencer PBS pH 7,4. Pada masing-masing sumuran ditambahkan protein hemaglutinin kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, ditambahkan 50 µl eritrosit mencit konsentrasi 0,5 % pada masing-masing sumuran. Pembacaan dilakukan setelah inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar [9].

Isolasi sel enterosit dilakukan berdasarkan cara Weisser (Nagayama *et al.*, 1995). Usus dicuci dengan PBS yang mengandung 1mM *dithiothretinol* pada suhu 4°C dalam pH 7,4 sampai tampak bersih. Setelah itu, usus halus dimasukkan dalam cairan yang

mengandung 1,5 mM KCL, 9,6 mM NaCl, 27 mM Natrium Sitrat, 8 mM KH₂PO₄ dan 5,6 mM Na₂HPO₄ dengan pH 7,3. Selanjutnya, jaringan diinkubasi pada *shaking incubator*. Supernatan dibuang dan jaringan dipindahkan dalam cairan PBS Ph 7,4 yang mengandung 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM *dithiothretinol*, inkubasi selama 15 menit pada suhu 37⁰C. Selanjutnya, disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm dan diulang 3 kali. Supernatan dibuang, dan jaringan dicuci dengan PBS kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 4000 rpm dan diulang sebanyak 3 kali. Jaringan usus disuspensikan dalam cairan PBS dengan pH 7,4 [10].

Uji hambat adhesi dilakukan dengan cara menginkubasi sel enterosit dengan serum. Pengenceran setengah kali secara seri pada ependorf, dengan menggunakan larutan pengencer PBS steril pH 7,4 sebanyak 100µl. Hasil pengenceran kemudian ditambahkan enterosit mencit 100µl. Setelah itu, dilakukan inkubasi pada water bath dengan suhu 37⁰C, shaking sebanyak 80 kali selama 30 menit kemudian kemudian disentrifugasi 1000 rpm selama 5 menit, pellet yang terbentuk kemudian ditambahkan bakteri sebanyak 100 µl. Selanjutnya, dilakukan inkubasi pada shaking waterbath dengan suhu 37⁰C selama 30 menit sebanyak 80 kali. Hasil ini disentrifugasi pada 1000 rpm selama 5 menit dan pellet yang terbentuk dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali. Pellet yang telah dicuci ditambah PBS 50 µl. Selanjutnya masing-masing diambil 20 µl untuk hapusan pada obyek glass [10].

Pewarnaan gram dilakukan dengan cara mengambil 1 tetes endapan dari masing-masing tabung ependorf kelompok perlakuan dan kontrol kemudian memfiksasinya dengan api bunsen. Preparat ditetesi dengan cat gram A yang berisi kristal violet selama 1 menit. Setelah 1 menit, preparat dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya preparat ditetesi cat gram B yang berisi lugol dan didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, genangan air pada preparat dibuang dan preparat dibilas dengan air mengalir. Preparat selanjutnya ditetesi cat gram C yang mengandung alkohol 96% selama 5-10

detik hingga cat yang masih menempel pada preparat terlihat luntur. Setelah luntur, teteskan cat gram D yang berisi safranin dan diamkan selama 30 detik, lalu cat yang tersisa di preparat dibuang dan dibilas dengan air mengalir. Preparat dikeringkan dengan tisu [11].

Preparat diletakkan di mikroskop dengan pembesaran 1000 kali kemudian diatas preparat ditetesi 1 tetes minyak emersi. Penghitungan indeks adhesi dengan menghitung jumlah perlekatan bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada sel enterosit mencit Balb/c sebanyak 100 sel yang dihitung dengan 3 kali pengulangan [10].

Metode analisis yang digunakan yaitu uji korelasi dan analisis Regresi Linier untuk indeks adhesi yang dihubungkan dengan antibodi yang disalutkan ke enterosit dan juga metode deskriptif untuk uji hambat hemaglutinasi.

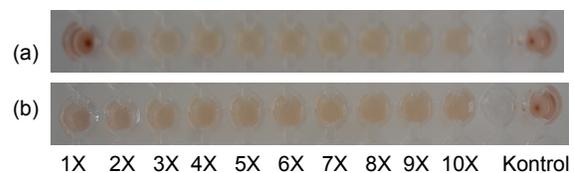
Hasil Penelitian

Uji Hambat Hemaglutinasi. Hasil uji hambat hemaglutinasi menunjukkan bahwa pada serum kontrol didapatkan hasil (-) dan serum perlakuan didapatkan hasil (+).

Tabel 1 Hasil uji hambat hemaglutinasi

| | Pengenceran | | | | | | | | | | Kontrol | |
|-----------------|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|---------|---|
| | 1X | 2X | 3X | 4X | 5X | 6X | 7X | 8X | 9X | 10X | | |
| Serum Perlakuan | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Serum Kontrol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

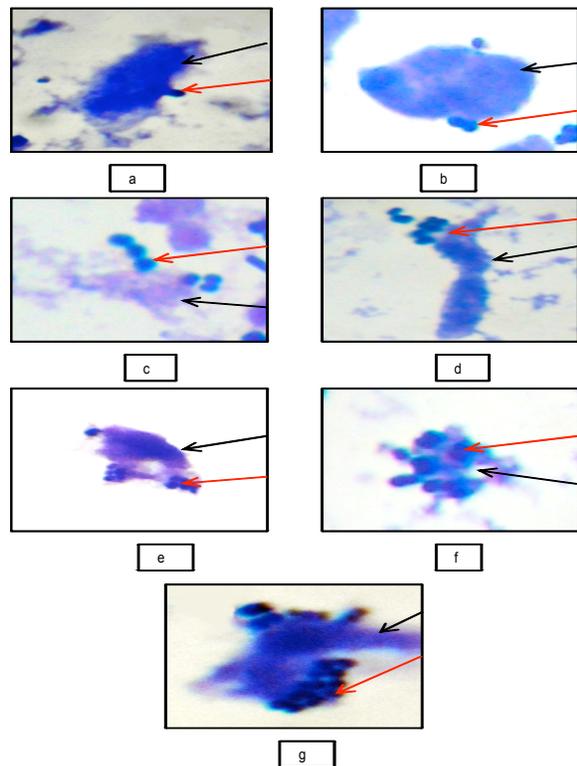
Dari tabel dan gambar 1 dapat diketahui bahwa antibodi dari protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa mampu menghambat proses hemaglutinasi hingga pengenceran 1X.



Gambar 1 Hasil uji hambat hemaglutinasi. (a) Hasil uji hambat hemaglutinasi serum dari protein permukaan 19 kDa *S.pneumoniae*, (b) Menggunakan serum kontrol. Angka di

bawah gambar menunjukkan pengenceran serum. Kontrol : menunjukkan hasil hambat hemaglutinasi positif.

Uji Hambat Adhesi. Hasil uji hambat adhesi *S.pneumoniae* pada enterosit balb/c, dilakukan mulai dengan volume serum 0 µl sebagai kontrol negatif ditunjukkan dalam Gambar 2g dan dilanjutkan dengan pengenceran terbesar sampai terkecil yang tampak pada gambar 2a-f.



—→ = enterosit
 —→ = bakteri *S.pneumoniae*

Gambar 2 Uji hambat adhesi *S.pneumoniae* pada epitel enterosit mencit difoto dengan perbesaran obyektif mikroskop 100 kali. (a) Hambat adhesi dengan pengenceran 0 (b) Hambat adhesi dengan pengenceran 1X (c) Hambat adhesi dengan pengenceran 2X (d) Hambat adhesi dengan pengenceran 3X (e) Hambat adhesi dengan pengenceran 4X (f) Hambat adhesi dengan pengenceran 5X (g) Hambat adhesi dengan volume serum 0 µl sebagai kontrol

Keterlibatan antibodi dari protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa *S.pneumoniae* dalam menghambat adhesi dengan sel epitel enterosit terlihat pada gambar 2. Hasil perhitungan indeks adhesi *S.pneumoniae* pada sel epitel enterosit dapat dilihat pada Tabel 2.

Perhitungan indeks adhesi menunjukkan bahwa besarnya pengenceran mempengaruhi indeks adhesi seperti tampak pada Tabel 2. Pada tabel 2 terlihat kecenderungan bahwa semakin tinggi pengenceran serum, semakin tinggi jumlah perlekatan bakteri pada enterosit mencit.

Tabel 2 Hasil perhitungan indeks adhesi *S.pneumoniae* pada sel epitel enterosit menggunakan antibodi dari protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa.

| | Indeks Adhesi | | | | | | Kontrol |
|-----------|---------------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|
| | Pengenceran | | | | | | |
| Ulangan | 0 | 1X | 2X | 3X | 4X | 5X | |
| I | 283 | 301 | 342 | 378 | 416 | 454 | 564 |
| II | 279 | 304 | 355 | 373 | 411 | 465 | 552 |
| III | 276 | 297 | 349 | 369 | 418 | 459 | 572 |
| Rata-rata | 279.33 | 300.67 | 348.67 | 373.33 | 415.415 | 459.33 | 562.67 |

Analisis Statistik. Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk didapatkan nilai Sig.= 0.757 ($p > 0,05$). Uji korelasi Pearson didapatkan nilai -0,787 yang berarti terdapat hubungan yang sangat kuat antara pengenceran serum dengan indeks adhesi. Nilai Sig.=0,036 ($p < 0,05$), yang berarti H_0 ditolak dan H_a diterima. Hasil analisis regresi linier didapatkan nilai R 0,787 dan R square 0,62, yang artinya 62% indeks adhesi dipengaruhi oleh pengenceran serum. Tabel *coefficients* regresi linier sederhana didapatkan nilai B = 451,395 dan -213,723. Jika dibuat dalam persamaan regresi, $Y = 451,395 - 213,723 X$. Nilai Y merupakan indeks adhesi dan nilai X adalah jumlah serum.

Pembahasan

Hasil yang diperoleh dari uji hambat hemaglutinasi ditunjukkan pada Tabel 1. Berdasarkan tabel tersebut diketahui bahwa

antibodi mencit kontrol tidak dapat menghambat hemaglutinasi sedangkan antibodi mencit perlakuan dapat menghambat hemaglutinasi hingga pengenceran 1X. Hasil yang serupa juga didapatkan pada penelitian yang dilakukan menggunakan OMP dengan berat molekul 90 kDa bakteri *S.dysentri*. Uji hambat hemaglutinasi menunjukkan hasil positif hingga pengenceran 2X [12].

Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian McCool (2002) yang menunjukkan bahwa protein permukaan *S.pneumoniae* dengan berat molekul 22 kDa bersifat imunogenik. Penelitian tersebut menggunakan manusia sebagai sampel. Titer IgG dan sIgA diamati sebelum dan sesudah kolonisasi bakteri *S.pneumoniae* di nasofaring. Hasil ELISA didapatkan peningkatan kadar titer IgG dan sIgA yang cukup signifikan setelah kolonisasi. Serum yang digunakan pada penelitian ini mampu menghambat hemaglutinasi, dapat dikatakan bahwa dalam serum tersebut terdapat IgG yang cukup tinggi. Hasil yang didapatkan tidak terjadi hemaglutinasi karena antibodi berikatan dengan reseptor yang ada pada bakteri sehingga tidak berikatan dengan eritrosit dan akhirnya hemaglutinasi tidak terjadi [13].

Pada penelitian sebelumnya, telah dibuktikan bahwa *S.pneumoniae* memiliki protein hemaglutinin melalui uji hemaglutinasi [14]. Peran penting protein hemaglutinin dalam proses infeksi adalah pada tahap awal karena memperantarai proses perlekatan dengan eritrosit. Setelah berikatan, eritrosit akan teraglutinasi. Jumlah eritrosit yang teraglutinasi berbanding lurus dengan penurunan jumlah Hb. Semakin banyak eritrosit yang rusak, semakin besar pula penurunan kadar Hb. Oleh karena itu, salah satu tujuan dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan serum hasil mencit yang telah diinduksi protein hemaglutinin dalam menghambat proses hemaglutinasi melalui uji hambat hemaglutinasi.

Hasil yang didapatkan membuktikan bahwa protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa *S.pneumoniae* bersifat imunogenik dan dapat menghambat hemaglutinasi.

Pada uji hambat adhesi, dilakukan 7 perlakuan. Tanpa serum (sebagai kontrol), dan

pengenceran 0-5X secara serial yang kemudian disalutkan pada sel epitel enterosit mencit sebelum direaksikan dengan bakteri *S.pneumoniae*. Penyalutan ini bertujuan untuk menjadikan reseptor pada enterosit jenuh berikatan dengan antibodi sehingga reseptor bakteri tidak bisa berikatan dengan enterosit. Sel enterosit berbentuk persegi panjang *amoeboid*, memiliki ukuran yang bervariasi dan menyerupai cat gram.

Hasil uji hambat adhesi sebagaimana yang tampak pada gambar 2a-f mulai dari konsentrasi antibodi terbesar sampai terkecil. Pada Gambar 2a tampak tidak banyak bakteri yang menempel pada enterosit, hal ini dikarenakan sebagian besar reseptor enterosit dienuhi oleh antibodi dari mencit perlakuan sehingga bakteri tidak bisa melakukan adhesi ke enterosit. Pengenceran semakin tinggi atau konsentrasi antibodi yang disalutkan pada enterosit semakin sedikit, reseptor enterosit yang dienuhi antibodi semakin sedikit sehingga bakteri yang menempel semakin banyak. Bakteri yang menempel pada Gambar 2b lebih banyak daripada Gambar 2a, sedangkan pada Gambar 2c lebih banyak daripada 2b, dan seterusnya. Pada perlakuan tanpa disalut antibodi, enterosit langsung direaksikan dengan bakteri *S.pneumoniae*. Tampak pada Gambar 2g banyak bakteri *S.pneumoniae* yang menempel dan mengelilingi permukaan enterosit. Hasil yang didapatkan serupa pada penelitian menggunakan OMP 35 kDa *P.mirabilis*, indeks adhesi berbanding terbalik dengan jumlah serum yang disalutkan pada enterosit mencit [15].

Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa *S.pneumoniae* merupakan molekul adhesin. Dengan demikian, apabila adanya antibodi dari protein tersebut mampu menurunkan indeks adhesi *S.pneumoniae*, hal ini membuktikan bahwa antibodi tersebut mampu sebagai anti adhesi *S.pneumoniae*.

Hasil uji regresi linier didapatkan nilai $R = 0,787$. Oleh karena nilai $R > 0,5$, dapat dikatakan hubungan antar variabel yang diteliti adalah kuat. Nilai R square disebut juga sebagai koefisien determinasi, yaitu nilai relatif yang

menunjukkan seberapa besar pengaruh perubahan variabel bebas (konsentrasi antibodi) terhadap variabel terikat (indeks adhesi bakteri). Nilai *R square* didapatkan sebesar 0,62 atau 62%. Angka tersebut menunjukkan bahwa sebesar 62% dari ilai indeks adhesi dipengaruhi oleh besarnya pengenceran serum dari protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa *S.pneumoniae* yang disalutkan.

Hasil uji regresi linier menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara besarnya pengenceran serum dari protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa *S.pneumoniae* dengan indeks adhesi *S.pneumoniae* pada enterosit mencit, yaitu semakin besar tingkat pengenceran semakin besar indeks adhesi. Fenomena ini menunjukkan bahwa isolat antibodi mampu menghambat adhesi *S.pneumoniae* pada enterosit. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa *S.pneumoniae* bersifat imunogenik sehingga mampu menginduksi mencit menghasilkan antibodi.

Protein bersifat imunogenik biasanya memiliki berat molekul lebih dari 8 kDa. Pada tahap awal, protein akan ditangkap oleh *Antigen-Presenting Cell* (makrofag, limfosit, dan sel dendritik). Protein akan diproses dalam APC dan dibawa ke permukaan sel untuk kemudian diperkenalkan oleh MHC pada sel T. MHC I akan mengaktifkan sel T *cytotoxic*, sedangkan MHC II mengaktifkan sel Th. Sel Th melepaskan beberapa limfokin yang meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel B. Sel B akan berubah menjadi sel plasma yang mensekresikan antibodi (IgG, IgA, IgM, IgD, dan IgE).

Simpulan dan Saran

Dapat disimpulkan bahwa protein permukaan dengan berat molekul 19 kDa *S.pneumoniae* bersifat imunogenik. Antibodi yang dihasilkan terhadap protein tersebut mampu menghambat hemaglutinasi eritrosit dan adhesi bakteri terhadap enterosit.

Masih diperlukan penelitian lanjutan mengenai potensi protein permukaan sebagai kandidat vaksin dalam upaya pencegahan infeksi.

Daftar Pustaka

- [1] UNICEF. *Committing to Child Survival: A Promise Renewed*. Progress Report 2012; 2012 [cited 2013 november 13]. http://www.unicef.org/publications/index_65820.html
- [2] WHO. Global Action Plan for Prevention and Control of Pneumonia (GAPP); 2009 [cited 2013 november 13]. http://www.unicef.org/media/files/GAPP3_web.pdf
- [3] Rudan I, Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008; 86 (5): 408-416.
- [4] Nomark BH, Tuomanen EI. The Pneumococcus : Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3:a010215.
- [5] De Velasco E, Alonso, Verheul AFM, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines*. *Microbiol. Rev.* 1995; 59 (4): 591–603.
- [6] Jackson LR, Fox JG. Institutional Policies and Guidelines on Adjuvants and Antibody Production. *ILAR Journal*. 1995; 37(3): 141-150.
- [7] Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998.
- [8] Li Xin, Johnson ED, Mobley TLH. Requirement of MrpH for Mannosa Resistent Proteus Like Fimbriae Mediated Hemagglutination by Proteus Mirabilis. *Infect. Immun.* 1999; 67: 2822-2833.
- [9] Satwakaripura B D. Skripsi: “Respon Immunogenitas Poliklonal Antibodi IgY Terhadap Protein Adhesi Pili 45 kDa Proteus Mirabilis”. Tidak Dipublikasikan. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember; 2010.
- [10] Nagayama K, Oguchi T, Arita, Honda T. Purification and Characterizations of a Cell-Associated Hemagglutinin of *Vibrio parahaemoliticus*, *Infect. Immun.* 1995; 63: 1987-1992.
- [11] Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC; 2008.
- [12] Pratiwi F K. Skripsi: “Respon Immunogenitas Antibodi Poliklonal IgY terhadap Protein Adhesi OMP 90 kDa Shygella dysenteriae”. Tidak Dipublikasikan. Jember: Fakultas

- Kedokteran Universitas Jember; 2013.
- [13] McCool TL, Cate TR, Moy G, Weiser JN. The Immune Response to Pneumococcal Proteins during Experimental Human Carriage. *J.Exp.Med.* 2002; 195: 359-365.
- [14] Mufida DC, Suswati E. Karakterisasi Protein Adhesin *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus) sebagai Target Pengembangan Vaksin Berbasis Protein. Tidak Dipublikasikan. Laporan Penelitian Fundamental. Jember: Fakultas kedokteran Universitas Jember; 2013.
- [15] Purwanto BS. Skripsi: "Respon Immunogenik Protein Adhesi Outer Membran Protein (OMP) 35 kDa *Proteus mirabilis*". Tidak Dipublikasikan. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember; 2012.