

Deteksi Immunoglobulin G dengan *Immunoblotting* Pasca Imunisasi Subkutan Protein Hemaglutinin Pili *Klebsiella pneumoniae* 12,8 kDa pada Mencit BALB/C

Immunoblotting Detection of Immunoglobulin G Post Subcutaneous Immunization Of Protein Hemagglutinin Pili Klebsiella pneumoniae 12,8 kDa on Mice BALB / C

Dini Agustina

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jalan Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto, Jember 68121

dini.agustina83@gmail.com

Abstrak

Klebsiella pneumoniae menjadi penyebab kedua terbanyak dari Infeksi komunitas dan infeksi nosokomial akibat bakteri Gram negatif. Bakteri ini mampu menginduksi timbulnya respon imun, terutama respon imun humoral, imunitas humoral berperan melalui aktifnya sel B yang menghasilkan antibodi. Antibodi, terutama IgG akan menyebabkan bakteri berkapsul seperti *Klebsiella pneumoniae* dapat difagositosis dengan lebih baik. Tujuan penelitian ini adalah Untuk mengetahui respons IgG terhadap protein hemaglutinin pili *K. pneumoniae* 12,8 kDa. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *Immunoblotting* dengan *western blot* dan *dot blot*. Antibodi primer yang digunakan untuk uji *western blot* dan *dot blot* diisolasi dari serum mencit BALB/C yang telah diinduksi dengan protein hemaglutinin pili *K. pneumoniae* 12,8 kDa secara subkutan. Untuk mendapatkan standard dalam menilai hasil *dot blot* digunakan program *Corel Photo-paint X6*. Hasil penghitungan *dot blot* secara semi kuantitatif didapatkan titer pengenceran antibodi dengan reaksi terkuat adalah pada 1/100 sedangkan titer pengenceran antigen pada 1/10.000. Hasil dari *western blotting* menunjukkan reaksi positif dari subunit protein pili dengan berat molekul 128,1 kDa, 114,4 kDa, 64,9 kDa, 31,1 kDa, 27,7 kDa, 24,8 kDa, 20,9 kDa, 12,8 kDa, dan 10 kDa. Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian imunisasi protein hemaglutinin pili *K. pneumoniae* 12,8 kDa secara subkutan mampu menginduksi pembentukan Immunoglobulin G pada mencit BALB/C

Kata kunci: *K. Pneumoniae*, IgG, protein hemaglutinin 12,8 kDa

Abstract

Klebsiella pneumoniae is the second most common cause of community infection and nosocomial infections due to Gram-negative bacteria. These bacteria are able to induce the onset of immune response, especially humoral immune response. Humoral immunity acts through the activation of B cells that produce antibodies. Antibodies, especially IgG, will cause encapsulated bacteria such as *Klebsiella pneumoniae* to be better phagocytosed. The purpose of this study was to determine the IgG response to hemagglutinin protein pili *K. pneumoniae* 12.8 kDa. The method used in this research is Immunoblotting method with western blot and dot blot. The primary antibodies used for the western blot and dot blot tests were isolated from BALB / C mice serum induced with the subcutaneous pili *K. pneumoniae* 12.8 kDa protein. To get the standard in assessing the results of dot blot were used Corel Photo-paint X6. The semi-quantitative result of dot blot was obtained with the strongest reaction of the antibody dilution at 1/100 while the antigen dilution titer at 1 / 10.000. Results from western blotting showed a positive reaction of the pili protein subunit with a molecular weight of 128.1 kDa, 114.4 kDa, 64.9 kDa, 31.1 kDa, 27.7 kDa, 24.8 kDa, 20.9 kDa, 12.8 kDa, and 10 kDa. The conclusion of this study is the immunization of hemagglutinin pili *K. pneumoniae* 12.8 kDa subcutaneously capable of inducing the formation of Immunoglobulin G in BALB / C mice.

Keywords: *K. Pneumoniae*, IgG, hemagglutinin protein 12,8 kDa

Pendahuluan

Klebsiella pneumoniae adalah bakteri yang masuk dalam famili Enterobacteriaceae yang merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, non-motil, berkapsul dan bersifat fakultatif anaerob (Janda et al, 2006; Murray et al, 2007). *K.pneumoniae* menjadi penyebab kedua terbanyak dari Infeksi komunitas dan infeksi nosokomial akibat bakteri Gram negatif dengan insiden 27% merupakan infeksi nosokomial, 43% *healthcare-associated community onset*, and 30% komunitas dengan angka morbiditas 20% dan mortalitas 1.3 per 100,000 (Meatherall et al, 2009). *K.pneumoniae* ini juga banyak dilaporkan mengalami resistensi antibiotik sehingga pengobatan untuk infeksi oleh bakteri ini sangat terbatas (Carratoli, 2009; Brisse et al, 2009). Faktor penentu patogenitas dari *K.pneumoniae* diantaranya faktor adhesi yang diperankan oleh protein hemaglutinin baik dari pili maupun OMP (*Outer Membrane Protein*). Protein hemaglutinin pada *K.pneumoniae* yang sudah dibuktikan memiliki adhesin adalah protein pili 12,8 kDa dan OMP 20 kDa. Adanya adhesin sebagai faktor virulensi secara dapat menginduksi respon imun dari tubuh (Limbago et al, 2011; Pertiwi et al, 2009; Agustina et al, 2014).

Respon imun yang berperan terhadap patogenesis dari bakteri *K.pneumoniae* yang merupakan bakteri ekstraseluler adalah respon imun humoral dengan produk berupa antibodi yang berfungsi menetralkan dan mengeliminasi mikroba (Abbas et al, 2003; Mortellaro et al, 2011). Salah satu antibodi yang berperan penting adalah immunoglobulin G (IgG) karena IgG merupakan isotope antibodi utama dalam darah dan cairan ekstraseluler yang mengontrol terjadinya infeksi pada jaringan tubuh dan memiliki mekanisme perlindungan yang diperankan melalui beberapa cara, yaitu proses aglutinasi yang menyebabkan imobilisasi patogen, proses *coating* permukaan patogen (opsonisasi) oleh IgG membuat patogen tersebut mampu dikenali dan difagosit oleh makrofag terutama untuk eliminasi bakteri yang berkapsul dalam hal ini *K.pneumoniae*, mengaktifkan jalur klasik sistem komplemen, serta mampu mengikat dan menetralkan toksin. IgG juga berperan penting pada proses *antibodi dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) dan proteolisis intraseluler yang diperantarai antibodi (Meduri et al, 1995; Young et al, 1999; Mayer, 2009).

Penelitian tentang respons IgG terhadap protein hemaglutinin pili *K.pneumoniae* 12,8 kDa adhesi belum ada yang melaporkan. Oleh karena itu,

penelitian ini dilakukan untuk mengetahui respons IgG terhadap protein hemaglutinin pili *K.pneumoniae* 12,8 kDa.

Metode Penelitian

Strain Bakteri

Bakteri didapat dari isolat klinik pasien di ruang ICU RSSA Malang yang diperiksa karakterisasi morfologi koloni pada nutrient agar, *Brain Heart Infusion* (BHI) *Broth* dan MacConkey agar kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dilanjutkan dengan pewarnaan Gram. Identifikasi bakteri dilakukan dengan *microbact system* (Sikarwar et al, 2011; Ling et al, 1988).

Bahan dan Reagen

Medium *MacConkey*, medium BHI, kit *Microbact system*, medium TCG, TCA, PBS, Tris HCl 5 mM pH 6,8, *2-mercapto etanol* 5%, *Sodium Dodecyl Sulfate* 2,5%, gliserol 10%, *Bromophenolblue*, *Commassie Brilliant Blue R-250*, etanol absolut, membran nitroselulosa, ponco 2%, TBE pH 7,4, TBE pH 7,4-Tween 20 0,05%, H₂O, BSA 1%, TBS pH 7,4, TBS pH 7,4-Tween 20 0,05%, TBS-Skim 5%, antibodi primer, antibodi sekunder, BCIP-NBT (substrat kromogen).

Hewan coba

Mencit strain BALB/C, betina, usia 6-8 minggu (6 ekor) dengan berat badan rata-rata 25g.

Alat

Tabung reaksi, *plate*, obyek *glass*, *cover glass*, mikroskop, inkubator, sentrifus, SDS-PAGE elektroforesis, *dialisa tube*, *Electroelusion chamber*, *beaker glass*, *magnetic stirer*, *refrigerator*, eppendorf, gunting pinset, *shaker*, pili *cutter*, *semi dry blotter* Biorad.

Kultur Bakteri

Biakan yang tumbuh pada *MacConkey* diambil dengan cara dikerok, sebelumnya dituangkan PBS steril pH 7,4 secukupnya. Suspensi bakteri tersebut dimasukkan ke dalam botol yang berisi 1000 ml BHI *Broth*. Suspensi tersebut dikocok kuat selama 30 menit pada penangas air 37°C. Suspensi bakteri diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam media agar bifasik TCG dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C (Ehara et al, 1987).

Isolasi Pili

Metode isolasi pili bakteri ini merujuk dari Ehara, 1987. Bakteri yang dipanen ditambahkan *Tri Chloroacetic Acid* (TCA) sampai konsentrasi 3% dan dihomogenasi, dilanjutkan dengan sentrifugasi kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pelet diambil dan diresuspensi dengan cairan PBS pH 7,4 disentrifus kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pellet diambil ditambah cairan PBS pH 7,4 kemudian dicukur menggunakan *mixer (pili cuter)* dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 detik 4°C, diulang sampai empat kali. Hasilnya kemudian disentrifugasi selama 30 menit, kecepatan 12.000 rpm, pada suhu 4°C. Pili yang terletak pada bagian supernatan diambil (Ehara et al, 1987).

Isolasi Protein Pili *K.pneumoniae*

Penentuan berat molekul dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE. Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit di dalam larutan penyangga yang mengandung Tris HCl 5 mM pH 6,8, *2-mercapto etanol* 5%, *Sodium Dodecyl Sulfate* 2,5% w/v, gliserol 10% v/v dengan warna pelacak *Bromophenolblue*. Konsentrasi *separating gel* yang dipilih adalah 12,5% *mini slabgel* dengan *stacking gel* 3%. Voltase yang digunakan 120 mV, 400 mA, dengan waktu *running* selama 90 menit. *Commassie Brilliant Blue R-250* dipilih sebagai bahan pewarna dan digunakan *pre-stained broad range* sebagai protein marker (Laemli, 1970). Selanjutnya dilakukan elektroelusi sehingga diperoleh endapan kering protein yang dimaksud.

Induksi Mencit Protein Pili *K.pneumoniae*

Untuk imunisasi dilakukan secara subkutan dengan dosis 50 µg dari protein adhesin pili yang dilarutkan dengan larutan normal saline dan *Freund's complete adjuvant*. Interval antar dosis adalah 7 hari selama 4 minggu, serum dipanen 10 hari setelah pemberian dosis terakhir (Goetsch et al, 2001; DiGiandomenico et al, 2007; Horzempa et al, 2008).

Isolasi Antibodi

Darah diambil dari jantung mencit. Darah dikumpulkan dari 5 mencit kedalam tabung steril dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C dengan posisi miring selama 30 menit. Darah kemudian disimpan dalam kulkas dengan suhu 4°C selama 10 menit, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. supernatan yang terbentuk diambil dan dimasukkan kedalam tabung steril kemudian disimpan pada suhu -20°C (Harlow et al, 1988).

Metode *Dot Blot*

Metode ini dilakukan dengan merujuk pada Harlow & Lane, 1988. Membran nitroselulose direndam terlebih dahulu dalam H₂O steril selama 30 menit. Kemudian dipasang pada alat *dot blot*. Melalui lubang alat, membran yang telah dibasahi dengan TBS, ditetesi dengan antigen 50 µl, diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan *blocking* dengan *blocking buffer* TBS, diinkubasi semalam pada suhu 4°C, larutan *blocking* dibuang. Membran ditetesi antibodi primer sebanyak 50 µl, diinkubasikan selama 2 jam pada suhu ruang dan diletakkan di atas shaker. Larutan dibuang, kemudian dicuci 3 kali dengan TBS-Tween-20 0,05 %. Ditambahkan antibodi sekunder dengan pengenceran 1:500 dalam larutan TBS, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, diatas shaker. Dicuci lagi 3 kali dengan TBS Tween-20 0,05 %. Selanjutnya ditambahkan substrat berkromogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan H₂O. Hasil positif apabila terbentuk dot-dot pada membran nitroselulose. Kualitas hasil dilihat berdasarkan gradasi warna (21).

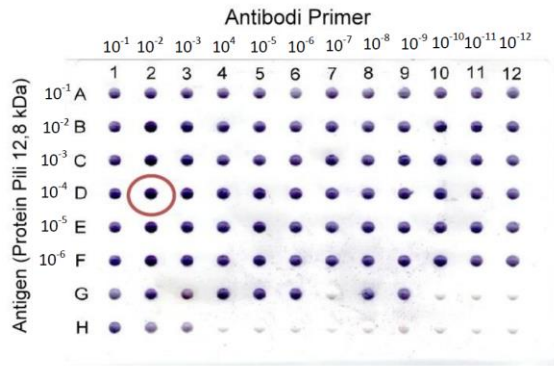
Metode *Western Blot*

Pemeriksaan *western blot* menggunakan metode dari Towbin, 1979. Lembaran gel hasil SDS-PAGE yang mengandung pita protein dipindahkan pada kertas nitroselulosa menggunakan alat *semi dry blotter* buatan Biorad. Cara memindahkan pita protein kepada kertas nitroselulose adalah menggunakan aliran listrik sebesar 100 mA pada kurun waktu 120 menit (Towbin et al, 1979).

Hasil Penelitian

Reaksi Antigen-Antibodi dengan Menggunakan Metode *Dot Blot*

Hasil reaksi antigen-antibodi dengan menggunakan metode *dot blot* dengan tujuan untuk mengetahui titer pengenceran dengan reaksi terkuat dapat dilihat pada Gambar 1 Protein yang berfungsi sebagai antigen adalah protein pili *K.pneumoniae* dengan berat molekul 12,8 kDa sedangkan yang berfungsi sebagai antibodi primer adalah serum yang diambil dari mencit yang telah diimunisasi secara intraperitoneal dengan antigen protein pili 12,8 kDa (IgG terhadap protein pili 12,8 kDa).

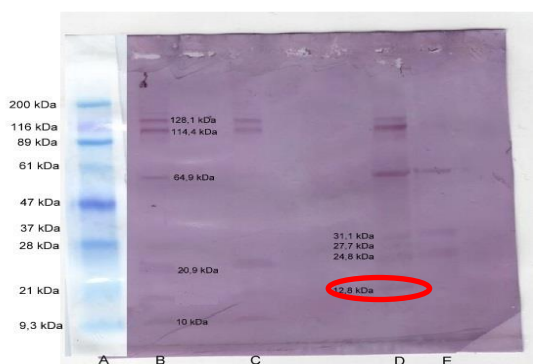


Gambar 1. Hasil DotBlot antara Protein Pili 12,8 kDa dengan antibodi primer (IgG) terhadap Protein Pili 12,8 kDa.

G1 dan H1 = protein tanpa pengenceran; G2 dan H2 = antibodi tanpa pengenceran; G3 dan H3 = protein dan antibodi tanpa pengenceran; G4-G6 = TBS dengan pengenceran 10^{-1} – 10^{-6} . Lingkaran merah (D2) menunjukkan reaksi antigen antibodi terkuat pada pengenceran terendah (antigen=1/10000, antibodi 1/100)

Penghitungan semi kuantitatif dari reaksi antigen-antibodi dilakukan dengan *Corel Photo Paint*, berdasarkan penghitungan semi kuantitatif didapatkan titer pengenceran antibodi dengan reaksi terkuat adalah pada 1/100 sedangkan titer pengenceran antigen pada 1/10.000. titer pengenceran tersebut yang akan digunakan pada metode *western blot*.

Reaksi Antigen-Antibodi dengan Menggunakan Metode Western Blot



Gambar 2. Hasil Western Blot dengan antibodi primer terhadap protein pili 12,8 kDa

A: protein marker *prestained broad range nacalai tesque*; B: *whole cell* 10^8 ; C: sel gundul 10^8 ; D: potongan pili pertama; E: potongan pili keempat. Lingkaran merah menunjukkan band protein pili berat molekul 12,8 kDa

Untuk mengetahui respon antigen-antibodi selain menggunakan metode *DotBlot* dapat juga menggunakan metode *westernblot*. Profil protein seperti pada Gambar 2 menunjukkan bahwa pili terdiri dari beberapa subunit protein. Diharapkan dengan menggunakan metode *westernblot* ini akan tampak subunit protein pili mana yang bereaksi dengan antibodi terhadap protein pili 12,8 kDa.

Hasil dari *western blotting* pada Gambar 2 diatas menunjukkan reaksi positif dari subunit protein pili dengan berat molekul 128,1 kDa, 114,4 kDa, 64,9 kDa, 31,1 kDa, 27,7 kDa, 24,8 kDa, 20,9 kDa, 12,8 kDa, dan 10 kDa.

Pembahasan

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa *K. pneumoniae* memiliki protein adhesin yaitu protein hemaglutinin pili dengan berat molekul 12,8 kDa yang menginduksi timbulnya respon dari IgG. Protein tersebut merupakan salah satu faktor virulensi untuk melawan pertahanan tubuh hospes selain kapsul polisakarida, lipopolisakarida (LPS), resistensi serum dan siderophore (Limbago et al, 2011). Protein pili tersebut adalah salah satu faktor virulensi yang berperan penting dalam infeksi terutama pada proses adhesi/perlekatan. Setelah terjadi adhesi kemudian bakteri mengadakan kolonisasi yang akhirnya terjadilah infeksi, sebagai contoh jika terjadi pada pasien yang mendapatkan intervensi secara medis seperti pemasangan intubasi dan kateter urin, yang umumnya disebut dengan *ventilator-associated bacterial pneumonias* (VABPs/VAP) dan *catheter-associated urinary tract infections* (CAUTIs) (Frank et al, 2009; Jones et al, 2010). Akibat terjadinya infeksi tersebut terjadi respon imun dari tubuh hospes. Respon imun tersebut meliputi imunitas alami dan imunitas adaptif. Oleh karena *K.pneumoniae* merupakan bakteri ekstraseluler, maka imunitas humoral adalah perlindungan yang utama. Imunitas humoral berfungsi untuk mengeliminasi bakteri dan menetralsasi toksinnya, melalui mekanisme efektor oleh antibodi (Abbas et al, 2003).

Respon imun humoral dimulai ketika sel B dirangsang melalui *B-cell reseptor* (BCR) oleh antigen tertentu (Ag), diikuti oleh diferensiasi ke dalam sel plasma. Sel plasma melepaskan antibodi afinitas tinggi yang mengopsonisasi antigen dan menginisiasi penghancurannya oleh makrofag. Profesional

Antigen-Presenting Cells(APC), sel dendritik yaitu (DC), diaktifkan oleh antigen yang terkait mikroba melalui keterlibatan *Pattern Recognition Receptors*(PRR). Antigen intraseluler dan ekstraseluler diproses menjadi peptida oleh APC dan dipresentasikan pada *Major Histocompatibility Complex Class I* (MHC I) dan *class II* (MHC II) masing-masing antigen disajikan kepada CD8⁺ dan CD4⁺ T sel,. Aktivasi DC juga menyebabkan produksi sitokin dan kostimulasi sel T. Sel *T-helper* menghasilkan beberapa sitokin yang mempromosikan proliferasi dan aktivasi limfosit lain dan makrofag. Ada tiga jenis sel *T-helper*: sel Th1, Th2 dan Th17. Sel Th1 menghasilkan sitokin seperti IFN γ yang mengaktifkan makrofag untuk membunuh sel yang mengandung antigen. Sel Th2 mengaktifkan sel B untuk memproduksi antibodi. Sel Th17 mensekresikan IL-17 yang mengaktifkan neutrofil dan IL-22 yang menginduksi sekresi peptida antimikroba oleh sel epitel. Sedangkan peranan CD8⁺ sel T sitotoksik (CTL) adalah pengrusakan antigen dengan cara membunuh sel secara langsung (Mortellaro et al, 2011).

Protein dengan berat molekul antara 10 - 100kDa memiliki sifat imunogenik (Parslow et al, 2001), maka protein adhesin pili 12,8 kDa tersebut selanjutnya diuji kemampuannya dalam menginduksi respon antibodi (IgG) dengan menggunakan metode *dot blot* dan *western blot* (Gambar 1 dan 2). Serum yang mengandung antibodi diperoleh dari hasil injeksi protein pada mencit selama kurang lebih 1 bulan. Hasil dari *dot blot* dilakukan kuantifikasi dengan program *software Corel Photo-Paint X6*. Intensitas warna yang terlihat menunjukkan kuatnya ikatan antara reaksi antigen dan antibodi. Analisis warna dari *dot blot* dapat menunjukkan nilai rata-rata reaksi antigen-antibodi tersebut secara kuantitatif. Semakin tebal warnanya menunjukkan nilai rata-rata yang lebih rendah, demikian sebaliknya. Berdasarkan kuantifikasi tersebut diperoleh hasil bahwa protein pili *K.pneumoniae* dengan BM 12,8 kDa mampu menginduksi pembentukan antibodi (Immunoglobulin G) dengan titer pengenceran antibodi yang memiliki reaksi terkuat pada 1/100. Sedangkan titer pengenceran antigen yang memiliki reaksi terkuat pada 1/10000. Kemampuan protein pili 12,8 kDa ini dalam menginduksi pembentukan antibodi selanjutnya dapat dikembangkan sebagai alat diagnostik atau sebagai kandidat vaksin untuk mencegah infeksi bakteri *K.pneumoniae*. Kemampuan pili bakteri *K.pneumoniae* ini dalam menginduksi pembentukan

antibodi serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Agustina tahun 2012 yang membuktikan peranan pili bakteri *Shigella dysenteriae* dalam menginduksi pembentukan antibodi (Agustina et al, 2012). Komponen OMP 20 kDa dari *K.pneumoniae* ini telah dibuktikan mampu menginduksi pembentukan antibodi immunoglobulin A (Pertiwi et al, 2009). Pada penelitian ini, telah ditemukan karakterisasi protein adhesin pili *K.pneumoniae* 12,8 kDa serta kemampuannya menginduksi pembentukan antibodi immunoglobulin G pada mencit. Dengan melihat hasil tersebut dan mengacu pada penelitian Pertiwi *et al*, perlu penelitian lebih lanjut untuk membuktikan apakah protein pili 12,8 kDa ini dapat pula menginduksi pembentukan antibodi immunoglobulin A pada mencit (Pertiwi et al, 2009).

Hasil dari *western blot* didapatkan reaksi positif dari subunit protein pili dengan berat molekul 128,1 kDa, 114,4 kDa, 64,9 kDa, 31,1 kDa, 27,7 kDa, 24,8 kDa, 20,9 kDa, 12,8 kDa, dan 10 kDa. Subunit protein pili 12,8 kDa sebagai protein HA, Subunit protein pili 24,8 kDa sebagai dimer HA, Subunit protein pili 64,9 kDa sebagai pentamer HA yang hanya muncul pada *whole cell*, potongan pili pertama dan keempat, sedangkan pada sel gundul tidak muncul. Hasil ini semakin memperkuat prediksi SDS-PAGE bahwa yang diisolasi adalah benar-benar pili bakteri *K.pneumoniae* (Huang et al, 2006). Selain itu hasil ini juga menunjukkan bahwa protein pili 12,8 kDa memiliki sifat imunogenik. Munculnya banyak band protein pada hasil *western blot* dapat disebabkan karena beberapa hal. Jika yang muncul adalah protein dengan berat molekul yang lebih tinggi penyebabnya kemungkinan adalah proses glikosilasi dan *multimer formation*, sedangkan jika yang muncul adalah protein dengan berat molekul yang lebih rendah mungkin terjadi degradasi protein, proses *cleavage*, atau karena protein tersebut memiliki epitope yang sama. Penyebab lain yang paling mungkin adalah penggunaan antibodi poliklonal sebagai antibodi primer. Untuk menghindari kejadian tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan sampel segar yang telah disimpan di atas es, menggunakan *fresh loading buffer*, melakukan pemanasan sampel yang dapat membantu untuk memecahkan struktur protein yang multimer, serta menggunakan antibodi monoklonal sebagai antibodi primer (Moore, 2009; Mahmood et al, 2012).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Pemberian imunisasi protein hemagglutinin pili *Klebsiella pneumoniae* dengan berat molekul 12,8 kDa secara subkutan mampu menginduksi pembentukan Immunoglobulin G pada mencit BALB/C sebagai antibodi poliklonal terhadap protein pili tersebut.

Daftar Pustaka

- Abbas, A.K., and Lichtman, A.H., 2003. Cellular and Molecular Immunology, fifth edition. Saunders. Philadelphia. p.345-356.
- Agustina, D., Sumarno., Noorhamdani. 2014. Inhibition of Bacterial Adhesion on Mice Enterocyte by the Hemagglutinin Pili Protein 12,8 kDa *Klebsiella Pneumoniae* Antibody. Journal of Tropical Life Sciences. 4(1): 19-25
- Agustina, W., Fitri, L.E., Raras, T.Y.M., Siswanto, B. and Sumarno. 2012. Antibody protein hemagglutinin subunit pili with MW 49,8 kDa *Shigella dysenteriae* adhesion on mice enterocyte. IOSR Journal of Pharmacy. 2(5):13-20
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., et al. 2009. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. Plos One. 4(3): e4982
- Carratoli, A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53(6):2227-2238.
- DiGiandomenico, A., Rao, J., Harcher, K., Zaidi, T.S., Gardner, J., Neely, A.N., et al., 2007. Intranasal immunization with heterologously expressed polysaccharide protects against multiple *Pseudomonas aeruginosa* infections. PNAS. 104(11):4624-4629.
- Ehara, M., M. Ishibashi, Y., Ichinose, M., Iwanaga, S., and Shimotori, T.N., 1987. Purification and Partial Characterization of Pili of *Vibrio cholerae* O1. Vaccine. 5(4):283-288.
- Frank, D. N., Wilson, S. S., St Amand, A. L., and Pace, N. R., 2009. Culture independent microbiological analysis of foley urinary catheter biofilms. PloS One. 4(11):e7811.
- Goetsch, L., Plotnicky-Gilquin, A.G.H., Haeuw, J.F., Beck, A., Bonnefoy, J.Y., and Corvaia, N., 2001. Targeting of Nasal Mucosa-Associated Antigen-Presenting Cells In Vivo with an Outer Membrane Protein A Derived from *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity. 69(10):6434-6444.
- Harlow, E. and Lane, D., 1988. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. New York. p: 386.
- Horzempa, J., Held, T.K., Cross, A.S., Furst, D., Qutyan, M., Neely, A.N., et al., 2008. Immunization with a *Pseudomonas aeruginosa* 1244 Pilin Provides O-Antigen-Specific Protection. Clinical And Vaccine Immunology. 15(4):590-597
- Huang J., and Honda W. 2006. CED: a Conformational Epitope Database. BMC Immunology. 7(7):1471-2172
- Janda, J. M., and Abbott, S. L., 2006. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria. 2nd ed. ASM Press. Washington, USA. Abbott, S. L., 2007. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and Other Enterobacteriaceae. In P. R.
- Jones, R.N., 2010. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. Clinical Infectious Disease. 51(9):81-87
- Jones, R.N., 2010. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. Clinical Infectious Disease. 51(9):81-87
- Laemli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259):680-685
- Limbago, B.M., Rasheed, J.K., Anderson, K.F., Zhu, W., Kitchel, B., Watz, N., et al., 2011. IMP-Producing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. Journal of Clinical Microbiology. 49(12):4239-4245.
- Ling, J.M., Hui, Y-W., and French, G.L., 1988. Evaluation of the Microbact-24E bacterial identification system. J Clin Pathol. 41(8):910-914
- Mahmood, T., and Ping-Chang, Y. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. N Am J Med Sci., 4(9):429-434

- Mayer, G., 2009. Immunoglobulin-Structure and Function. In *Microbiology and Immunology Online*. University Of South Carolina. USA. <http://pathmicro.med.sc.edu/book/immunol-sta.htm>. html. downloaded on Jan, 10, 2013.
- Meatherall, B.L., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J.D., and Laupland, K.B., 2009. Incidence, Risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *The American journal of medicine*. 122; 866-873.
- Meduri G.U., and Estes R.J., 1995. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: II. The lower respiratory tract. *Intensive Care Med*. 21(5):452-61
- Moore C. 2009. Introduction to western blotting. www.abdserotec.com/westernblot.html. downloaded on Nov, 5, 2012.
- Mortellaro, A., and Ricciardi-Castagnoli, P., 2011. From vaccine practice to vaccine science: the contribution of human immunology to the prevention of infectious disease. *Immunology and Cell Biology* 89(3):332-339
- Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller. *Manual of Clinical Microbiology* 9th ed. ASM Press. Washington, USA. p.698-711
- Parslow, T.G., Stites, D.P., Terr, A.I., and Imboden, J.B., 2001. *Medical Immunology*. 10th ed. Mc Graw Hill. USA
- Pertiwi, W., Sartono, T.R., Sumarno, dan Adi, S., 2009. Sensitivitas dan spesifisitas metode Dot Blot menggunakan antigen outer membrane protein *Klebsiella pneumoniae* yang direpson Secretary-Immunoglobulin A Sputum Penderita Terinfeksi *Klebsiella pneumoniae*. *J Respir Indones*. 29(3). 1-15.
- Sikarwar, A.S., and Batra, H.V., 2011. Identification of *Klebsiella Pneumoniae* by Capsular Polysaccharide Polyclonal Antibodies. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2(2):130-134.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 76(9):4350-4354.
- Young P.J, and Ridley S.A., 1999. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, pathogenesis and prevention. *Anaesthesia*. 54(12): 1183-97.