

## PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ANTIBODI ANTI FIM-C *Salmonella Typhi* PADA MENCIT DDY

Umar Hasan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Anggota Peneliti Muda Utama

Kelompok Peneliti Muda Universitas Negeri Jakarta

Email : realism\_painter@yahoo.com

### ABSTRAK

*Tifus merupakan penyakit yang banyak diderita oleh masyarakat di negara berkembang termasuk Indonesia. Sampai saat ini vaksin tifus masih terus dikembangkan. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi dan mengkarakterisasi antibodi anti Fim-C S. typhi secara in vivo sebagai kandidat vaksin pada mencit galur ddY. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode eksperimen. Antigen yang digunakan adalah Protein rekombinan Fim-C S. typhi dalam bentuk murni hasil penelitian sebelumnya. Mencit ddY sebagai hewan coba dikelompokkan menjadi 4, yaitu: Kelompok uji 1 (protein Fim-C+Freund's Complete/incomplete Adjuvant), Kelompok uji 2 (protein Fim-C S. typhi), kelompok kontrol sakit 1 (FCA/FIA adjuvant), kelompok kontrol sakit 2 (PBS1x). Hasil penelitian dengan metode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) menunjukkan adanya respon antibodi yang diproduksi oleh mencit ddY setelah injeksi subkutan dengan protein Fim-C+adjuvant maupun tanpa adjuvant. Respon antibodi dengan antigen Fim-C+adjuvant memberikan nilai yang lebih tinggi dibandingkan antigen Fim-C tanpa adjuvant. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya kenaikan titer antibodi dari penyuntikan ke-1 hingga penyuntikan ke-4. Pada hasil penelitian dengan metode Western Blot menunjukkan terjadinya interaksi antigen spesifik Fim-C terhadap Antibodi anti Fim-C. Dari kedua metode tersebut, data ini mengkonfirmasi bahwa Protein Fim-C S. typhi memiliki imunogenisitas yang tinggi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa protein Fim-C S. typhi dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin rekombinan yang potensial untuk melawan penyakit tifus.*

### Kata Kunci

*Salmonella typhi, Penyakit tifus, Protein Fim-C, Antibodi, Vaksin Rekombinan.*

### ABSTRACT

*Typhus is a disease that affect many people in developing countries including Indonesia. Until now typhoid vaccine is still being developed. This research is doing to produce and characterize anti fim-C antibodies of Salmonella typhi in vivo as a vaccine candidate strain ddY mice. The method used in the research is experimental method. The antigen used is a fim-C recombinant protein in its pure form the results of previous research. The ddY mice as experimental animals were grouped into four, namely: experiment group 1 (Fim-C protein+Freund's Complete/Incomplete Adjuvant), experiment group 2 (Fim-C protein S. typhi), ill control group 1 (FCA/FIA adjuvants), ill control group 2 (PBS1x). The results with ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) method showed that the antibody response produced by ddY mice after subcutaneous injection of the protein Fim-C+adjuvant or without adjuvant. Antibody responses with Fim-C Antigen+adjuvant gives a higher value than the Fim-C antigen without adjuvant. This is evidenced by the increase in antibody titer from the first injection until the fourth injection. The results with western blot method showed an interaction between antigen spesific Fim-C and antibodi anti Fim-C. These data confirm that fim-C protein S. typhi has a high immunogenicity of both methods. It can be*

*concluded that the Fim-C protein S. typhi can be used as a potential recombinant vaccine candidate against typhoid fever.*

**Keywords**

*Salmonella typhi, Typhus Disease, Fim-C Protein, Antibody, Recombinant vacci*

**Pendahuluan**

Tifus merupakan salah satu penyakit yang banyak diderita oleh masyarakat di negara-negara berkembang termasuk Indonesia, khususnya terjadi pada usia-usia muda dan menjadi masalah kesehatan yang sangat penting dan membutuhkan penanganan lebih. Angka kejadian penyakit tifus di Indonesia rata-rata sekitar 900.000 kasus/tahun dengan angka kematian lebih dari 20.000 dan 91% dari kasus tersebut terjadi pada usia 3-19 tahun, hingga menunjukkan terjadinya peningkatan angka kematian setiap tahunnya [1]. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*.

*Salmonella typhi* memiliki Protein Fim-C atau yang disebut fimbriae sebagai faktor virulensi yang berpotensi imunogenik untuk mencegah infeksi tifus. Protein Fim-C merupakan protein polimer pada permukaan sel bakteri sebagai mediator penting yang digunakan untuk interaksi atau penempelan dirinya terhadap sel inang [2]. Protein-protein yang ada pada permukaan seperti Fim-C ini dapat dijadikan sebagai antigen dan menginduksi respon imun dengan baik. Sehingga telah diduga bahwa protein Fim-C pada *Salmonella typhi* dapat berpotensi untuk dijadikan vaksin rekombinan pencegah penyakit tifus.

Dalam beberapa kasus, pemberian vaksinasi merupakan salah satu cara penanganan atau pencegahan penyakit tertentu seperti tifus [3]. Penelitian ini mengarah pada vaksin rekombinan, yaitu vaksin yang dibuat dengan

teknologi rekombinan (bioteknologi) dengan memanfaatkan gen pengkode antigen dari virus atau bakteri penyebab penyakit, bukan menggunakan virus atau bakteri utuh [3]. Pemilihan vaksin rekombinan dikarenakan tingkat keamanannya lebih tinggi dibandingkan vaksin non rekombinan/konvensional yang menggunakan virus (yang telah dilemahkan). Vaksin rekombinan memiliki keuntungan yaitu tidak ada kesempatan tubuh terserang dari virus, produksi protein virus dapat dilakukan dalam jumlah besar, dan menghasilkan respon imun yang lebih spesifik.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan kloning dan subkloning gen Fim-C *Salmonella typhi* pada vektor kloning dan vektor ekspresi, serta purifikasi protein rekombinan Fim-C [4]. Oleh karena itu penelitian ini dilanjutkan untuk memproduksi dan mengkarakterisasi antibodi anti Fim-c *Salmonella typhi*, apakah dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin rekombinan untuk pencegahan penyakit tifus sehingga dapat meningkatkan kualitas kesehatan pada masyarakat.

Untuk mendukung pengujian produksi dan karakterisasi antibodi anti Fim-C tersebut, akan dilakukan menggunakan hewan uji mencit terlebih dahulu. Sehingga dari hasil tersebut diharapkan nantinya mampu menghasilkan penyediaan produk vaksin tifus yang aman untuk masyarakat.

**Metodologi Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksploratif dan eksperimen, melalui beberapa tahapan

meliputi : produksi antibodi anti Fim-C *S.typhi*, analisis titer antibodi dengan ELISA, analisis spesifikasi antibodi dengan western blot [5,6,7,8].

#### **Produksi antibodi anti Fim-C *S.typhi***

Produksi antibodi anti Fim-C *Salmonella typhi* terdiri atas, penyiapan mencit sebagai hewan produksi, penyiapan protein rekombinan Fim-C *S. typhi* sebagai antigen, proses immunisasi, dan isolasi serum mencit/antibodi anti-FimC *S. typhi* [5,6,7,8,9].

**Penyiapan hewan percobaan;** Produksi antibodi anti-Fim C *S. typhi* dilakukan pada mencit jantan, galur ddY, umur 6-8 minggu dan berat 17-24 gram. Sejumlah 32 ekor mencit digunakan untuk produksi antibodi anti-Fim C *S. typhi*. Mencit dipelihara di kandang yang ditempatkan pada ruangan dengan kondisi suhu 20-25°C selama seminggu. Selama pengkondisian dilakukan penimbangan berat badan pada hari ke 0, hari, ke 3 dan hari ke 5. Selain itu dilakukan pemantauan terhadap, pakan, kandang, kesehatan dan aktivitas mencit. Setelah proses pengkondisian, dilakukan pengambilan pre-immune serum dari mata sebanyak 100-200 mL. Sehari sebelum pengambilan pre-immune serum mencit dipuaskan tetapi tetap masih diberi minum.

Masing masing mencit dikelompokkan menjadi dua kelompok besar, yaitu kelompok eksperimen (KP) dan kelompok sakit (KS). Kelompok eksperimen memiliki dua sub kelompok yaitu kelompok yang disuntikan campuran protein Fim-C dan *Freund complete/Incomplete* adjuvan (KP1) yang terdiri dari 8 ekor mencit dan kelompok yang disuntikan oleh protein Fim-C (KP2) yang terdiri dari 8 ekor mencit. Kelompok kontrol sakit terdiri dari dua sub kelompok yaitu kelompok

yang disuntikan *Freund Complete/Incomplete* Adjuvan (KS1) terdiri dari 8 ekor mencit, dan kelompok yang disuntikan oleh Phosphate Buffer Saline (KS2) yang terdiri dari 8 ekor mencit. Kelompok eksperimen dan kelompok kontrol sakit diuji imunitas untuk dilihat pembentukan antibodinya.

**Penyiapan antigen protein rekombinan Fim C *S. typhi* untuk imunisasi;** Sebanyak 25-100 µg protein Fim-C *S. typhi* hasil pemurnian dalam bentuk inclusion bodies dilarutkan dengan bufer PBS 1x dalam *Eppendorf* 1,5 mL sehingga memiliki total volume 100 µL. Selanjutnya ditambahkan *Freund's complete adjuvant* (FCA) atau *Freund's incomplete adjuvant* (FIA) dengan perbandingan 1:1. Kemudian dilakukan homogenisasi campuran dengan vorteks sampai warna campuran berwarna putih [5,8].

**Proses imunisasi;** Imunisasi dilakukan pada bagian punggung mencit bagian depan dekat kepala secara subkutan dan sebanyak 2-3 titik untuk satu kali penyuntikan. Imunisasi awal yaitu 20 µg protein Fim C yang telah disiapkan sebagai antigen dicampur dengan *Freund's complete Adjuvant*. Satu minggu setelah penyuntikan awal dilakukan pengambilan darah dari mata dan selanjutnya darah tersebut dipreparasi untuk diambil serumnya. Setelah satu minggu dari penyuntikan awal dilakukan *boosting* dengan 40 µg Fim-C dicampur dengan *Freund's incomplete Adjuvant*. *Boosting* kedua dan ketiga dilakukan dengan 60 µg Fim-C setelah satu minggu dari penyuntikan kedua dan ke tiga sampai didapatkan jumlah antibodi yang optimal [5,7].

**Isolasi serum mencit/antibodi anti-protein rekombinan *S. typhi*;** Darah yang berasal dari mata dikumpulkan pada tabung sentrifuga steril. Darah diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit sampai terlihat

pemisahan antara serum dan *platelet*. Sentrifuga dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan 5.000 g pada suhu 4°C. Cairan bening/serum diambil dan dimasukkan dalam *Eppendorf*. Kemudian serum disimpan pada -20°C [5,9].

#### **Analisis perkembangan pembentukan antibodi anti Fim-C *S. typhi* dengan teknik ELISA**

Pada analisis jumlah pembentukan antibodi sebagai antibodi primer digunakan antibodi mencit dari *Bleed I-Bleed IV*. Berikut ini diuraikan analisis jumlah pembentukan antibodi anti-protein Fim-C *S. typhi* mulai dari hari ke-0 (*pre-immune* serum, sebelum dilakukan penyuntikan dengan antigen protein Fim-C *S. typhi*) sampai minggu ke 5 dengan teknik ELISA.

Antigen (30–300 ng protein Fim-C *S. typhi* dalam 50 µL bufer garam fosfat, PBS 1x, per sumur) diinkubasi dalam sumur *microtiter plate* (IWAKI) pada suhu ruang selama semalam. Tiap sumur dicuci masing-masing 3 kali dengan PBS 1x yang mengandung 1 mM MgCl<sub>2</sub> dan 0,05% (v/v) Tween-20 (bufer pencuci). Sesudah dicuci, ditambahkan 150 µL 5% *blotto* (5 g susu skim dalam 100 mL PBS 1x) pada tiap sumur, kemudian *microtiter plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi dilakukan pencucian lagi sebanyak 3 kali dengan bufer pencuci. Sebanyak 50 µL serum mencit (berasal dari *bleed I* (hari ke-0/*pre-immune* serum) - *bleed V* (minggu ke-5), dengan pengenceran 100x dan 300x ditambahkan pada tiap sumur sesuai dengan rancangan ELISA yang telah disiapkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Sumur *microtiter plate* dicuci kembali dengan bufer pencuci sebanyak tiga kali. Setelah proses pencucian ke dalam sumur ditambahkan masing-masing 50

µL antibodi sekunder (*anti IgG-mice-HRP* yang telah diencerkan 5000x dengan PBS 1x) (Biogen, 2013), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, sumur *microtiter plate* dicuci kembali dengan bufer pencuci sebanyak tiga kali. Sebanyak 100 µL larutan substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) ditambahkan pada tiap sumur, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam (akan menghasilkan warna biru). Kemudian reaksi dihentikan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M menghasilkan warna kuning. Sesudah inkubasi, dilakukan pembacaan absorbansi pada alat *ELISA-Reader* (*Microplate Reader*) pada panjang gelombang 450 nm [6,7,9]. Setelah diketahui pembentukan antibodi yang maksimal, selanjutnya dilakukan pengambilan serum dalam jumlah besar atau *bleeding* terminal sebanyak 10-20 mL darah.

#### **Analisis spesifikasi antibody anti protein Fim-C dengan *Western Blot***

Karakterisasi antibodi anti Fim-C *S. typhi* dilakukan dengan SDS-PAGE terhadap antibodi, dan *Western immunoblotting* untuk melihat interaksi antibodi anti Fim-C dengan antigen protein Fim-C *S. typhi*.

***Karakterisasi antibodi anti protein Fim-C dengan SDS-PAGE;*** Penyiapan gel dan proses elektroforesis yang dilakukan untuk karakterisasi protein hasil pemurnian sama dengan tahap karakterisasi protein hasil overekspresi. Sampel yang digunakan pada tahap ini adalah serum yang mengandung IgG Fim-C *S. typhi*. Sebanyak 10 µL antibodi dimasukkan dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL kemudian ditambahkan buffer sampel 5x. Campuran ditambah air steril sampai konsentrasi akhir bufer sampel menjadi 1x. Langkah proses SDS-PAGE meliputi penyiapan gel poliakrilamid,



penyiapan sampel protein Fim-C *S. typhi*, proses elektroforesis, pewarnaan gel, dan pengeringan gel. **Penyiapan gel poliakrilamid.** Jenis gel poliakrilamid pada proses ini adalah *separating* gel dan *stacking* gel. *Separating* gel berfungsi untuk pemisahan protein dan *stacking* gel berfungsi sebagai tempat sampel yang akan dipisahkan massa molekulnya. *Separating* gel dibuat dari 10% akrilamid (Amersham-Pharmacia), 0,32% N,N'-metilen-bis-akrilamid (Amersham-Pharmacia), 0,1% SDS dan buffer Tris-HCl 0,375 M pH 8,8. Campuran dihomogenkan, selanjutnya ditambahkan 0,5% N,N,N',N'-tetra-etilen-diamin (TEMED) dan 0,05% amonium persulfat sebagai inisiator polimerisasi. Campuran dituangkan dalam *casting* gel yang telah disiapkan (Miniprotean II *Bio-Rad*). Kemudian ditambahkan air pada bagian atas campuran agar permukaan *separating* gel menjadi rata. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit sampai polimerisasi terjadi dengan sempurna atau gel mengeras. Selanjutnya disiapkan *stacking gel* yang terdiri atas 4% akrilamid, 0,1% N,N'-metilen-bis-akrilamid, 0,1% SDS, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, 0,1% TEMED dan 0,05% amonium persulfat. Campuran dihomogenkan, kemudian dituangkan diatas *separating* gel yang berada dalam *casting* gel diatas. Setelah *stacking* gel dimasukkan kemudian pada *casting* gel tersebut dipasang sisir untuk tempat sampel yang akan dielektroforesis. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit sampai polimerisasi *stacking* gel sempurna. **Penyiapan sampel protein Fim-C *S. typhi*.** Sampel protein (15-25 µg) dimasukkan dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL kemudian ditambahkan buffer sampel 5x (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% gliserol, 2% SDS, 14,4 mM 2-mercaptoetanol dan 0,1% bromphenolblue). Campuran ditambah

air steril sampai konsentrasi akhir buffer sampel menjadi 1x. Kemudian didenaturasi pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah itu, dilakukan sentrifuga dengan *microcentrifuge Eppendorf* pada 10.000 g selama 30 detik. Sampel protein tersebut siap untuk proses elektroforesis. **Proses elektroforesis.** Sebelum proses elektroforesis berlangsung, gel yang telah dibuat dipasang pada bagian dari alat MiniProtean II Biorad yang memiliki kawat penghantar arus listrik. Gel yang telah terpasang dimasukkan dalam *Chamber* atau tangki elektroforesis MiniProtean II Bio-Rad. *Chamber* diisi dengan 300 mL *running buffer* 1x (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,1% SDS dan 192 mM glisin). Sampel protein dan protein marker dimasukkan dalam sumur-sumur pada bagian *stacking* gel. Selanjutnya dilakukan proses elektroforesis dengan 150 volt selama 45-60 menit pada suhu ruang. **Pewarnaan protein pada gel hasil elektroforesis.** Setelah proses elektroforesis selesai, gel dikeluarkan dan dimasukkan dalam larutan *staining* {0,1% Comassie-blue R250, 45% (v/v) metanol, dan 10% (v/v) asam asetat glacial}. Gel dalam larutan *staining* tersebut diagitasi selama satu jam sampai satu malam (sampai terlihat pita protein) pada suhu ruang. Selanjutnya gel dipindahkan pada larutan *destaining* {40% (v/v) metanol dan 10% (v/v) asam asetat glasial} sampai warna biru pita protein pada gel terlihat jelas. **Pengeringan gel hasil elektroforesis.** Pengeringan gel dilakukan dengan meletakkan gel diantara dua selopan, kemudian dikeringkan dengan *gel dryer* pada suhu 50°C selama satu jam. Gel dapat juga dikeringkan dengan meletakkan diantara dua selopan yang diapit oleh dua bingkai foto, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama satu malam.

### ***Interaksi antibodi anti Fim-C S. typhi dengan Western immunoblotting***

Western immunoblotting digunakan untuk uji spesifisitas antibodi antiprotein Fim-C. Langkah awal Western immunoblotting adalah pemisahan protein Fim-C murni dengan elektroforesis gel poliakrilamid. Proses elektroforesis dilakukan sama dengan langkah yang dilakukan pada proses-proses sebelumnya. Kemudian dilakukan transfer protein dari gel hasil elektroforesis ke membran nitrocellulose pada voltase 200 volt selama 1 jam pada suhu 4°C dalam buffer transfer yang mengandung 25 mM Tris, 192 mM glisin dan 20% metanol pada pH 8,3 (Mini transblot II, Biorad, 1999). Setelah transfer, membran nitrocellulose diblokir dengan blocking buffer selama satu jam pada suhu ruang sambil dilakukan agitasi. Antibodi anti-protein Fim-C ditambahkan kedalam larutan blocking tersebut (pengenceran 100x), diinkubasi lagi selama 1 jam dan setelah itu ditambahkan Tween-20 (konsentrasi 0,5% (v/v)). Inkubasi dan agitasi dilanjutkan 30-60 menit pada suhu ruang. Membran kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3x masing-masing 5-10 menit pada suhu ruang dan diagitasi. Selanjutnya membran dimasukkan lagi dalam larutan blocking yang baru, diinkubasi dan agitasi lagi pada suhu ruang selama satu jam. Setelah itu ditambahkan antibodi sekunder (HRP anti IgG-Mice yang telah diencerkan 5000x), dan Tween-20. Proses dilanjutkan dengan pencucian seperti langkah sebelumnya. Pewarnaan membran dilakukan dengan memasukkan membran kedalam larutan substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride)-(Thermo Scientific, 2013), sampai terlihat adanya pita protein berwarna coklat. Selanjutnya membran dikeringkan

diatas kertas tissue pada suhu ruang [5,9,10].

### **Hasil dan Pembahasan**

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan produk antibodi spesifik anti Fim-C *Salmonella typhi* pada hewan uji dan menghasilkan informasi tentang karakteristik antibodi spesifik anti Fim-C *Salmonella typhi* sebagai kandidat vaksin rekombinan yang potensial. Hasil penelitian diuraikan menjadi beberapa bagian sebagai berikut : Hasil pemantauan hewan percobaan dan pengambilan *pre-immune* serum, Pengambilan serum darah, Penyuntikan antigen, Analisis perkembangan jumlah pembentukan antibodi anti Fim-C *S.typhi*, Analisis spesifikasi antibodi anti protein Fim-C dengan *Western Blot*

### **Hasil Pemantauan Hewan Percobaan dan Pengambilan *Pre-immune* Serum**

Hasil pemantauan kesehatan mencit dilakukan dengan penimbangan berat badan, pengamatan pola makan, dan pengamatan kondisi fisik. Sedangkan pemantauan kondisi ruang pemeliharaan dilakukan dengan pengukuran suhu ruang, sirkulasi udara, kebersihan, dan kelembaban ruangan. Proses produksi antibodi anti Fim-C dilakukan di LABTIAP (laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agrikultur dan Biomedis) BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi)-Serpong.

Terjadi penurunan berat badan mencit pada hari ke-3 dari semua kelompok. Hal ini dikarenakan adaptasi awal dari mencit terhadap kondisi/lingkungan yang baru ditempati membuat mencit tersebut mengalami stress. Sedangkan hari ke-5 terjadi kenaikan berat badan lagi, karena pemberian pakan yang cukup dan proses adaptasi yang cukup.

Setelah pengkondisian, kemudian mencit diambil darahnya sebagai *pre-immune* serum. Tujuan pengambilan *pre-immune* serum adalah sebagai kontrol negatif pembentukan antibodi anti Fim-C, hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa tidak ada interaksi yang terjadi antara antigen protein Fim-C dengan antibodi mencit sebelum dilakukan imunisasi/penyuntikan antigen. Hasil pengambilan *pre-immune* serum dari *sinus orbitalis* mata menghasilkan 0,5-1 mL darah, serum yang dihasilkan adalah 0,2-0,5 mL serum dari total darah yang diambil. Hasil tersebut disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk keperluan lanjutan.

### **Pengambilan Serum Darah**

Proses pengambilan darah dilakukan untuk analisa produksi antibodi. Proses pengambilan darah dilakukan pada mata untuk mendapatkan volume darah yang lebih banyak dibandingkan dengan pengambilan darah melalui ekor. Sebelum pengambilan darah, mencit yang akan diambil darahnya dipuasakan terlebih dahulu selama satu malam agar glukosa tidak mengganggu pada saat analisa, tetapi mencit tetap diberikan minum untuk mencegah kematian.

Serum darah yang dihasilkan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk proses analisa antibodi menggunakan metode ELISA.

### **Penyuntikan Antigen**

Antigen yang digunakan adalah Protein Fim-C+Adjuvan, Protein Fim-C+PBS, Adjuvan+PBS, dan PBS aja. Fungsi dari adjuvan ini adalah untuk merangsang pembentukan antibodi dan menjaga protein dari katabolisme yang berlangsung begitu cepat, sehingga protein dapat merangsang pembentukan antibodi spesifik yang diinginkan. Kelompok perlakuan ini adalah

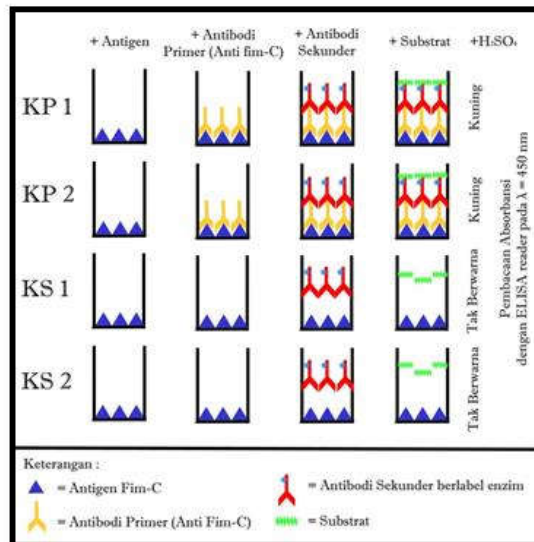
kelompok yang diberikan protein Fim-C dicampur dengan *Freund's Complete/Incomplete Adjuvan* yaitu kelompok KP1. Perlakuan lain yaitu dengan menyuntikan antigen Fim-C yang dicampur dengan PBS yaitu kelompok KP2. Kontrol dari kelompok KP1 adalah kelompok yang hanya diberikan Adjuvan yang dilarutkan dalam PBS (KS1). Sedangkan kontrol dari kelompok KP2 adalah kelompok yang hanya diberikan PBS saja (KS2).

Antigen yang dipreparasi disesuaikan dengan dosis yang dibutuhkan kemudian dicampur dengan *Freund's Complete/Incomplete Adjuvan* atau PBS (sesuai kelompok). Hasil dari percampuran protein dan *Freund's Complete/Incomplete Adjuvan* menghasilkan emulsi protein dalam *mineral oil* berwarna putih.

Proses penyuntikan dilakukan pada mencit secara subkutan, yaitu pada bagian punggung, antigen dimasukkan ke bawah kulit. Penyuntikan ke-1 dengan dosis  $20\ \mu\text{g/mL}$ , penyuntikan ke-2 dengan dosis  $40\ \mu\text{g/mL}$ , penyuntikan ke-3 dengan dosis  $60\ \mu\text{g/mL}$ . Penyuntikan ke-4, dosis hanya mencapai  $24\ \mu\text{g/mL}$ . Hal ini dikarenakan ketersediaan produksi protein yang konsentrasinya tidak cukup tinggi.

### **Analisis Perkembangan Jumlah Pembentukan Antibodi Anti Fim-C *S.typhi***

Serum antibodi Vi-spesifik telah dimonitor pada mencit secara subkutan yang diimunisasi dengan Protein Fim-C + Adjuvant (Kelompok perlakuan 1, KP1), Protein Fim-C + PBS (Kelompok Perlakuan 2, KP2), Adjuvant + PBS (Kelompok kontrol Sakit 1, KS1), dan PBS saja (Kelompok kontrol Sakit 2, KS2). Serum yang telah didapat tersebut dapat diketahui perkembangan jumlah pembentukan antibodinya dengan



**Gambar 1.** Skema Pengikatan Antibodi Pada Metode Elisa. Kelompok Perlakuan 1 (KP1), Kelompok Perlakuan 2 (KP2), Kelompok Kontrol Sakit 1 (KS1), Kelompok Kontrol Sakit 2 (KS2).

metode ELISA (*enzym-linked immunosorbent assay*).

Skema pengikatan antibodi ditunjukkan pada gambar 1. Pada Kelompok perlakuan 1 (KP1) dan kelompok perlakuan 2 (KP2) menghasilkan warna kuning diakhir reaksi, sedangkan kelompok kontrol sakit 1 dan 2 (KS1 dan KS2) tidak menghasilkan warna. Hal ini dikarenakan pada KP1 dan KP2 terjadi interaksi antara antigen Fim-C dan antibodi anti Fim-C, sedangkan

KS1 dan KS2 tidak terjadi interaksi antara antibodi spesifik Fim-C terhadap antigennya.

Desain ELISA yang digunakan adalah konsentrasi 0 ng, 100 ng, dan 300 ng, dengan pengenceran antibodi 100x dan 300x. Antigen akan berinteraksi dengan serum yang mengandung antibodi spesifik. Hasil uji ELISA dengan variasi konsentrasi antigen dari mencit disajikan pada tabel 1-4.

**Tabel 1.** Data Nilai Absorbansi Pembentukan Antibodi Anti Protein Fim-C *S. typhi* (Inclusion Bodies) dengan Antigen (Fim-C + Adjuvan).

Penyuntikan Ke-	Jumlah antigen	
	100 ng	300 ng
Bleed-0	0,0288	0,0775
Bleed-1	0,0848	0,1215
Bleed-2	0,1093	0,1508
Bleed-3	0,2043	0,278
Bleed-4	0,2373	0,501

**Tabel 2.** Data Nilai Absorbansi Pembentukan Antibodi Anti Protein Fim-C *S. typhi* (Inclusion Bodies) dengan Antigen (Fim-C + PBS).

**Tabel 3.** Data Nilai Absorbansi Pembentukan Antibodi

Hari ke	Jumlah antigen	
	100 ng	300 ng
Bleed-0	0,027	0,0288
Bleed-1	0,0183	0,0393
Bleed-2	0,0235	0,0498
Bleed-3	0,056	0,1418
Bleed-4	0,0578	0,2345

Anti Protein Fim-C *S. typhi* (Inclusion Bodies) dengan Antigen (Adjuvan + PBS).



Hari ke	Jumlah antigen	
	100 ng	300 ng
Bleed-0	0,06	0,0215
Bleed-1	0,034	0,022
Bleed-2	0,0055	0,003
Bleed-3	0,003	0,0025
Bleed-4	0,007	0,0065

**Tabel 4.** Data Nilai Absorbansi Pembentukan Antibodi Anti Protein Fim-C *S. typhi* (Inclusion Bodies) dengan Antigen (PBS).

Hari ke	Jumlah antigen	
	100 ng	300 ng
Bleed-0	0,0335	0,0105
Bleed-1	0,0465	0,0365
Bleed-2	0,0095	0,0095
Bleed-3	0,002	0,0095
Bleed-4	0,0645	0,0585

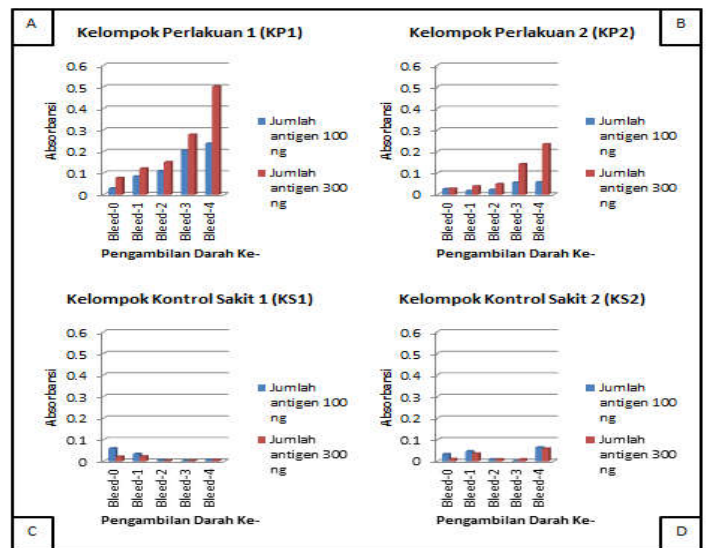
Berdasarkan hasil ELISA, pada sampel antigen (Fim-C + Adjuvan) *Salmonella typhi* secara signifikan pembentukan antibodi anti Fim-C 100x dan pengenceran antibodi sekunder 1:5000. Ketika konsentrasi antigen 300 ng terlihat kenaikan absorbansi mulai 0,0775 - 0,501. Saat konsentrasi antigen 100 ng secara umum mengalami kenaikan absorbansi 0,0288 - 0,2373. Nilai absorbansi terbesar terdapat pada pengambilan darah terakhir, yaitu hari ke-49. Grafik hasil uji ELISA sebagai penjelasan dari tabel 1 disajikan pada gambar 3 dan 4.

Sedangkan pada sampel Fim-C *Salmonella typhi* dengan antigen (Fim-C + PBS), hasil uji ELISA dengan variasi konsentrasi antigen dari mencit disajikan pada tabel 2.

Berdasarkan hasil ELISA pada sampel antigen (Fim-C + PBS) *Salmonella typhi* secara signifikan

pembentukan antibodi anti Fim-C 100x dan pengenceran antibodi sekunder 1:5000. Ketika konsentrasi antigen 300 ng, terlihat kenaikan absorbansi mulai 0,0288 - 0,2345. Saat konsentrasi antigen 100 ng, secara umum mengalami kenaikan absorbansi 0,027 - 0,0578. Grafik hasil uji ELISA sebagai penjelasan dari tabel 2. disajikan pada gambar 3 dan 4.

Sedangkan untuk Kelompok Sakit (KS1 dan KS2) untuk tiap kandang, memberikan nilai absorbansi yang rendah yaitu tidak mencapai nilai absorbansi diatas 0,1. Hal ini dikarenakan kelompok sakit tidak memiliki antibodi yang spesifik terhadap antigen Fim-C. Data disajikan



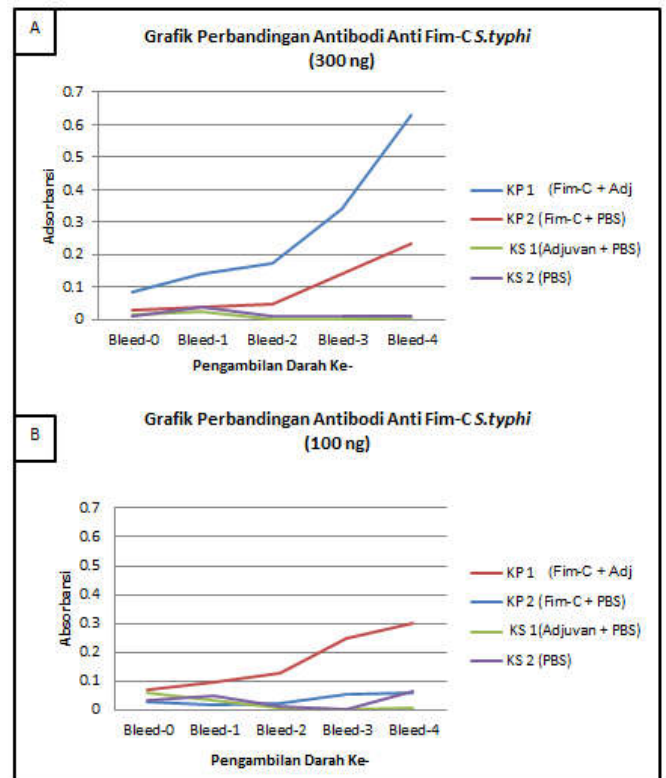
**Gambar 3.** Grafik Analisis pembentukan antibodi anti Fim-C *S. typhi* inclusion bodies pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. (A) grafik kelompok perlakuan 1. (B) grafik kelompok perlakuan 2, (C) grafik kelompok kontrol sakit 1, (D) grafik kelompok kontrol sakit 2. Sumbu X menunjukkan perkembangan hasil imunisasi pada setiap bleed 0-4. Sumbu Y menunjukkan nilai absorbansi hasil pembacaan ELISA reader. Diagram berwarna biru dan merah menunjukkan jumlah antigen 100 ng dan 300 ng.

pada tabel 3 dan 4, serta gambar 3 dan 4. Telah diketahui pada uji ELISA pembentukan warna merupakan hasil reaksi substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) dengan enzim Horse Radish Peroksidase yang terkonjugasi pada antibodi anti-IgG mouse/antibodi sekunder. Peroksidase mengkatalisis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> melalui proses oksidasi. Benzidine dan senyawa terkait sudah dikenal oleh substrat horseradish

peroksidase. Reaksi yang terjadi dapat menghasilkan produk yang mengalami kesetimbangan dengan kation radikal. Penambahan hidrogen equimolar peroksida menghasilkan diimine kuning, yang merupakan produk stabil pada pH asam [11]. Warna yang terbentuk adalah warna kuning yang terbaca pada panjang gelombang 450 nm.

Proses pembentukan warna pada ELISA ini juga terjadi karena adanya interaksi antigen dan antibodi. Ikatan antibodi dengan antigen bersifat reversibel dan ikatannya berbentuk non-kovalen. Interaksi elektrostatik terjadi antara rantai asam amino bermuatan, sebagai bentuk jembatan garam. Interaksi juga terjadi antara muatan listrik yang mempunyai dua kutub berbeda, seperti pada ikatan hidrogen, atau dapat melibatkan ikatan van der Waals.

Intensitas warna yang terbentuk setara dengan kenaikan titer antibodi primer, sehingga kenaikan absorbansi dari hasil ELISA tersebut berarti bahwa terjadi interaksi antara antigen protein Fim-C *S. typhi* dengan antibodi yang diproduksi oleh mencit. Kenaikan titer ini sesuai dengan mekanisme pembentukan antibodi yang menyatakan bahwa pada saat tubuh terinfeksi oleh zat asing atau antigen maka tubuh membentuk sel B memori. Sel ini bersifat spesifik terhadap antigen, jika antigen yang sama dimasukkan secara berulang maka dengan adanya sel B memori, tubuh akan membentuk antibodi terhadap antigen tersebut. Makin sering antigen dimasukkan ke dalam tubuh, maka IgG yang terbentuk juga semakin banyak. Peningkatan jumlah IgG ini dideteksi menggunakan antibodi sekunder anti-IgG mouse yang tercermin dari meningkatnya nilai absorbansi hasil uji ELISA. Grafik hasil



Gambar 4. Grafik hasil uji imunogenisitas antigen protein Fim-C *S. typhi*. Garis biru menunjukkan nilai absorbansi untuk kelompok mencit ddY yang diimunisasi dengan antigen Fim-C *S. typhi*+Adjuvant FCA/FIA+PBS1x. Garis merah menunjukkan nilai absorbansi kelompok mencit ddY yang diimunisasi dengan antigen Fim-C *S. typhi*+PBS1x. Garis hijau muda menunjukkan nilai absorbansi kelompok mencit ddY yang diimunisasi dengan antigen Adjuvant FCA/FIA+PBS1x. Garis ungu menunjukkan nilai absorbansi kelompok mencit ddY yang diimunisasi dengan antigen PBS1x. Kondisi ELISA dilakukan pada pengenceran serum 100x dan antibodi sekunder 5000x.

uji ELISA sebagai penjelasan dari tabel 1 sampai 4. disajikan pada gambar 4.

Gambar 3 menunjukkan bahwa grafik A (kelompok perlakuan KP1) yang disuntikkan dengan antigen Fim-C + Adjuvan memberikan hasil yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Adjuvan dapat merangsang pembentukan antibodi dan menjaga protein dari katabolisme yang berlangsung begitu cepat, sehingga protein dapat merangsang pembentukan antibodi spesifik. Kelompok perlakuan KP2 yang disuntikkan dengan antigen Fim-C+PBS tetap memberikan nilai absorbansi yang cukup pada grafik B. Hasil ini dapat memberikan data bahwa protein Fim-C terbukti dapat memproduksi antibodi spesifik pada mencit. Kelompok kontrol sakit KS1 pada grafik C dan Kelompok kontrol

sakit KS2 pada grafik D memberikan data absorbansi rendah. Data ini dijadikan sebagai kontrol karena tidak dapat memproduksi antibodi spesifik anti Fim-C.

Gambar 4 menunjukkan grafik perbandingan antibodi anti Fim-C *S.typhi* dengan konsentrasi 300 ng dan 100 ng. Konsentrasi antigen 300 ng memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan antigen konsentrasi 100 ng. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi yang lebih tinggi, ikatan antara antigen dan antibodi spesifik lebih banyak. Sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan semakin tinggi. Data tersebut menunjukkan bahwa induksi oleh antigen (Fim-C+Adjuvan) menunjukkan produksi antibodi yang lebih besar dibandingkan induksi oleh antigen (Fim-C+PBS), antigen (Adjuvan+PBS), dan PBS saja.

#### **Analisis Spesifikasi Antibodi Anti Protein Fim-C dengan *Western Blot***

Analisis menggunakan teknik *western blot* bertujuan untuk menganalisis protein spesifik pada sampel dan untuk membuktikan apakah antibodi yang diproduksi secara *in vivo* pada mencit merupakan antibodi anti Fim-C. Prinsip dasar teknik ini adalah melakukan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE (*sodium deodecyl sulphate polyacrilamid gel*) dan didapatkan protein dengan berat molekul berbeda terpisah pada area gel, kemudian ditransfer dari gel poliakrilamid ke membran nitroselulosa dengan teknik Western Blot. Hal ini dibuktikan dengan antigen dan antibodi spesifik yang akan berinteraksi, ditandai dengan warna yang muncul pada membran.

Teknik Western Blot diawali oleh elektroforesis protein dengan teknik SDS-PAGE. Pembuatan gel elektroforesis terbagi menjadi 2, yaitu

*separating gel* dan *stacking gel*. Fungsi dari *separating gel* adalah sebagai media pemisahan ukuran-ukuran molekul protein dengan berat yang berbeda-beda, sehingga dihasilkan berat molekul Fim-C yang berukuran  $\pm 31$  kDa. Fungsi dari *stacking gel* adalah sebagai media penyangga untuk memasukkan protein kedalam *well* elektroforesis.

Protein pada sampel akan memiliki muatan yang sama dengan muatan SDS yang negatif sehingga bergerak menuju elektroda positif melalui jaring-jaring akrilamid. Protein yang lebih kecil akan bergerak lebih cepat melewati jaring-jaring akrilamid. Perbedaan kecepatan pergerakan ini akan terlihat pada pita-pita yang tergambar pada tiap jalur.

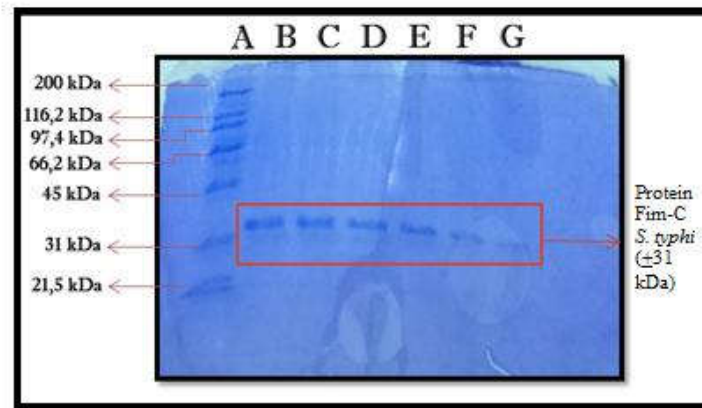
Hasil dari elektroforesis protein dengan SDS-PAGE memberikan data yang menunjukkan bahwa protein Fim-C berukuran  $\pm 31$  kDa sesuai dengan penelitian sebelumnya [4]. Untuk mendapatkan berat molekul yang tepat, diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara (6,5 - 200 kDa). Hasil elektroforesis gel protein SDS-PAGE Ditunjukkan pada gambar 5.

Berdasarkan hasil analisis dengan teknik SDS-PAGE kemudian dilanjutkan karakterisasi protein dengan teknik Western Blot dan didapatkan pita spesifik. Posisi protein antigen pada membran dapat dilihat dari ikatan protein antigen dengan antibodi anti Fim-C *S.typhi*. Setelah melalui tahap elektroforesis protein dengan SDS-PAGE, kemudian dilanjutkan pada tahap transfer protein dari gel ke membran nitroselulosa. Teknik transfer ini menggunakan larutan buffer dan arus listrik (*electroblotting*) untuk menarik protein-protein ke membran nitroselulosa.

Antigen Fim-C akan terikat pada membran nitroselulosa, kemudian antigen akan berinteraksi dengan antibodi primer yang didapatkan pertama kali dari serum mencit. Membran diinkubasi selama 1 jam.

menjadi produk dan menghasilkan warna cokelat.

Gambar 8(b) menunjukkan bahwa protein yang terdapat pada gel elektroforesis telah tertransfer pada kertas membran nitroselulosa sehingga



**Gambar 5.** Hasil elektroforesis gel protein SDS-PAGE. Lajur A 10  $\mu$ L protein marker *Biorad*. Lajur B protein Fim-C 22,5  $\mu$ L dengan konsentrasi 3  $\mu$ g/mL. Lajur C protein Fim-C 18,94  $\mu$ L dengan konsentrasi 2,5  $\mu$ g/mL. Lajur D protein fFim-C 15,16  $\mu$ L dengan konsentrasi 2  $\mu$ g/mL. Lajur E protein Fim-C 11,4  $\mu$ L dengan konsentrasi 1,5  $\mu$ g/mL. Lajur F protein Fim-C 7,58  $\mu$ L dengan konsentrasi 1  $\mu$ g/mL. Lajur G protein Fim-C 3,78  $\mu$ L dengan konsentrasi 0,5  $\mu$ g/mL.

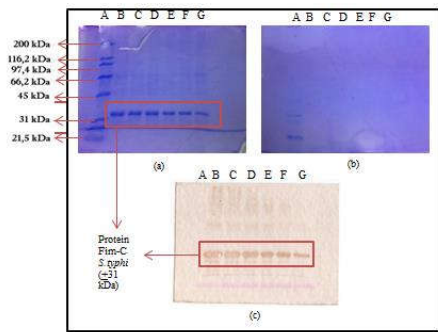
Lalu, kertas membran dibilas terlebih dahulu dengan PBS, barulah diinkubasi dengan antibodi sekunder. Antibodi anti-IgG *mouse* yang berikatan dengan enzim *horseradish peroksidase* (HRP) sebagai antibodi sekunder ini akan menguatkan sinyal yang dihasilkan oleh antibodi primer. Metode yang digunakan untuk mendeteksi interaksi yang terjadi adalah metode *colorimetric detection*. Metode ini digunakan karena substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahidroklorida) akan berikatan dengan enzim HRP (Horseradish Peroksidase) pada antibodi sekunder sehingga menghasilkan pita yang berwarna cokelat pada membran [12]. Berdasarkan reaksi tersebut dapat diketahui bahwa  $H_2O_2$  mengalami reaksi oksidasi yang dikatalisa oleh enzim HRP. Proses katalisa HRP melibatkan substrat untuk mendonorkan elektron, sehingga substrat dapat berubah

pada proses pewarnaan dengan larutan *staining* tidak terdapat pita protein berwarna biru. Gambar 8(c) menunjukkan bahwa kelompok perlakuan 1 dengan antigen Fim-C+adjuvan dapat dikenali oleh antibodi primer spesifik anti Fim-C, ditandai dengan pita hasil western blot yang berwarna cokelat pada ukuran molekul  $\pm 31$  kDa. Begitupun juga kelompok perlakuan dengan antigen Fim-C saja. Data menunjukkan bahwa terjadi proses interaksi antara antigen dan antibodi spesifik anti Fim-C yang ditandai dengan pita warna cokelat pada membran nitroselulose. Hasil Western Blot Kelompok Perlakuan 2 ditujukan pada gambar 9.

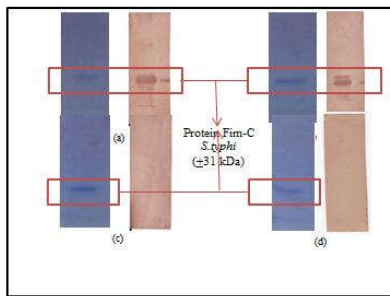
Gambar 10 digunakan untuk membandingkan kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol sakit. Terlihat bahwa terdapat perbedaan antara keempat kelompok. Kelompok perlakuan terdapat pita garis berwarna cokelat



yang menandakan terjadinya interaksi antigen dan antibodi spesifik. Namun, kelompok kontrol sakit tidak memiliki pita garis berwarna cokelat. Hal ini disebabkan pada kelompok kontrol sakit, antigen yang digunakan, bukan antigen Fim-C, sehingga tidak dapat dikenali oleh antibodi primernya.



**Gambar 8.** Hasil Western Blot Kelompok Perlakuan 1. (a) Gel elektroforesis protein sebelum di transfer ke membran. (b) Gel elektroforesis protein protein tertransfer ke membran. (c) membran nitroselulose hasil western blot. Lajur A 10 µL protein marker *Biorad*. Lajur B protein Fim-C konsentrasi 3 µg/mL. Lajur C protein Fim-C konsentrasi 2,5 µg/mL. Lajur D protein Fim-C konsentrasi 2 µg/mL. Lajur E protein Fim-C konsentrasi 1,5 µg/mL. Lajur F protein Fim-C konsentrasi 1 µg/mL. Lajur G protein Fim-C konsentrasi 0,5 µg/mL.



**Gambar 10.** Perbandingan Hasil Western Blot ke-empat kelompok pada mencit. (a) Kelompok perlakuan 1 (KP1). (b) Kelompok perlakuan 2 (KP2). (c) Kelompok kontrol sakit 1 (KS1). (d) Kelompok kontrol sakit 2 (KS2). Warna biru (gel elektroforesis). Warna cokelat (membran nitroselulosa).

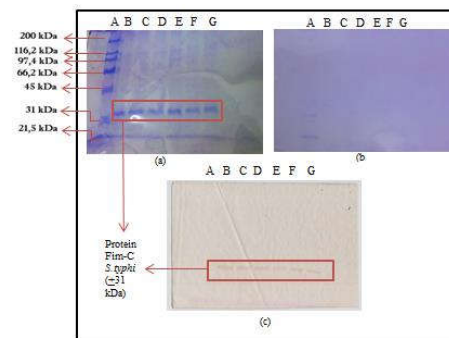
Secara keseluruhan hasil Western Blot menunjukkan bahwa antibodi anti Fim-C yang dihasilkan selama produksi dapat mengenali Fim-C sebagai antigennya. Hal ini juga menunjukkan bahwa dalam serum mencit telah dihasilkan antibodi anti Fim-C sebagai respon imun terhadap protein Fim-C yang diinduksikan ke mencit.

**Kesimpulan**

Hasil penelitian telah menunjukkan antibodi anti Fim-C dapat diproduksi secara in vivo dalam tubuh

mencit sehingga memberikan beberapa informasi bahwa antigen Fim-C yang telah diproduksi dapat membangkitkan respon imun spesifik. Antibodi yang dihasilkan juga dapat dikarakterisasi menggunakan metode ELISA dan Western Blot. Metode ELISA telah dibuktikan dengan warna yang menunjukkan adanya interaksi antara antigen Fim-C dan antibodi spesifik anti Fim-C yaitu terlihat dari kenaikan nilai absorbansi yang menunjukkan antibodi anti fim-C yang diproduksi meningkat. Sementara melalui metode western blot dapat diketahui bahwa antibodi anti Fim-C telah berhasil mengenali antigen spesifiknya yang ditandai dengan terbentuknya warna cokelat pada membran nitroselulosa.

Penelitian ini menghasilkan antigen Fim-C dari kelompok perlakuan yang memberikan kekuatan dan



**Gambar 9.** Hasil Western Blot Kelompok Perlakuan 2. (a) Gel elektroforesis protein sebelum di transfer ke membran. (b) Gel elektroforesis protein setelah tertransfer ke membran. (c) membran nitroselulose hasil western blot. Lajur A 10 µL protein marker *Biorad*. Lajur B protein Fim-C konsentrasi 3 µg/mL. Lajur C protein Fim-C konsentrasi 2,5 µg/mL. Lajur D protein Fim-C konsentrasi 2 µg/mL. Lajur E protein Fim-C konsentrasi 1,5 µg/mL. Lajur F protein Fim-C konsentrasi 1 µg/mL. Lajur G protein Fim-C konsentrasi 0,5 µg/mL.

perbedaan respon imun antibodi spesifik secara kuantitatif dibandingkan dengan antigen tanpa Fim-C pada kelompok kontrol sakit. Data ini lebih mendukung kesesuaian Protein Fim-C sebagai calon vaksin yang menjanjikan terhadap *S. typhi*.

**Penghargaan**

Peneliti mengucapkan terima kasih terhadap Penelitian Strategis Nasional 2012 (DIKTI) yang telah

mendukung pendanaan sehingga penelitian ini berhasil dilakukan. Terima kasih juga kepada Jurusan Kimia FMIPA UNJ, Jurusan Biologi FMIPA UNJ, serta seluruh rekan-rekan Laptiab-BPPT Serpong atas kerjasama dan bantuannya.

#### Daftar Pustaka

- [1] Verry. 2011. *Waspada Gejala Tifus, Segera Periksa Diri Anda!*. <http://www.prodiakalimantan.com/artikel-kesehatan/100-waspada-gejala-tifus-segera-periksakan-diri-anda.html> (Diakses pada tanggal 3 Agustus pukul 21.35 WIB).
- [2] Burrows, L. L. 2005. Weapons of Mass Refraction. *Mol Microbiol*; **57**:878-888.
- [3] Hamdani. 2013. *Jenis Vaksin*. <http://catatankimia.com/catatan/jenis-vaksin.html> (Diakses pada tanggal 5 Agustus 2013 pukul 21.17 WIB).
- [4] Pratiwi, E., D. 2013. Subkloning dan Ekspresi Gn *fim-C Salmonella typhi* [Skripsi]. Jakarta : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.
- [5] Harlow, E., dan D, Lane. 1998. *Antibodies A Laboratory Manual*. USA : Cold Spring Harbor Laboratory.
- [6] Deutcher, P, M. 1990. *Guide To Protein Purification, Methods In Enzymology*, Vol. 182.
- [7] Noer, A, S., Marzuki dan Allison, W., S,. 1992. Antipeptide Antibodies To The Carboxy Terminal and the DCCD Binding Region of Human Mithochondrial ATP Synthetase Beta Sub-Unit. *Biochem, Biophys, Acta*. 1099:123-130
- [8] Jenings, V., M. 1995. Review of Selected Adjuvants Used In Antibody Production, *ILAR Journal*; 37, 3:119-132.
- [9] Muktiningsih. 2005. *Produk Gen carA Salmonella typhi Berukuran 42 kDa yang Dideteksi dengan Antibodi Anti-Protein Fusi*. Disertasi Program Pascasarjana. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- [10] Sambrook, J, F dan Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual, Second Edition, Volume 3*. USA : Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [11] Josephy, P. D., Eling, T., Mason, R. P. 1982. The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine, *The Journal of Biological Chemistry*; 257, 7:3669-3675
- [12] Andrews, AT. 1986. *Electrophoresis Theory, Techniques, Biochemical and Clinical Application*. Oxford : Clarendon press.