

Pengaruh Adjuvant Alumina dan Protein Rekombinan Fim-C Inclusion Bodies *Salmonella Typhimurium* terhadap Respon Imun Mencit Balb/C

Dian Larasati¹, Muktiningsih Nurjayadi¹, Kurnia Agustini²

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Jl. Rawamangun Muka, Rawamangun 13220, Jakarta, Indonesia

²Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (Laptiab), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong, Tangerang Selatan, Banten, Indonesia

Corresponding Author: dianlaras08@gmail.com

Abstract

Typhoid fever is one of the most public health problem in the world, with approximately 17 million cases of typhoid fever worldwide and 600,000 death cases each year. One method to prevent typhoid fever is vaccination. Nowadays, frequently, vaccine for typhoid fever is Ty 21a and vi polysaccharide vaccines. In other hands, it has side effect of nausea, fever, and headache. So it is still necessary to search other typhoid vaccine with minimum side effects. The purpose of this study was to obtain immunogenicity test information of recombinant protein Fim-C S. typhimurium and adjuvant alumina in Balb / C mice. The used doses were 20 µg, 40 µg, and 60 µg. Plasma was obtain then analyzed by ELISA, western immunoblotting, and dot blot. Immune response of Balb / C mice from KS 1 showed significant differences antibody when dose injection 40µg / 20g BB and KS2 showed significant differences antibody when dose injection 20µg / 20g BB compared with KN. Adjuvant alumina was added to the Fim-C protein inclusion bodies Salmonella typhimurium provides a higher immune response compared to the Fim-C inclusions bodies Salmonella typhimurium protein without the addition of adjuvant alumina. The results of analysis by using western blot and dot blot showed the formation of brown color indicating the interaction between protein Fim-C inclusion bodies Salmonella typhimurium and anti-Fim-C S. typhimurium antibodies. The results of adjuvant alumina and protein Fim-C inclusion bodies of Salmonella typhimurium in Balb / C mice concluded that adjuvant alumina and Fim-C protein inclusion bodies Salmonella typhimurium provide significant increased immune response in Balb / C mice.

Keyword: *Salmonella typhimurium, typhoid vaccine, recombinant protein Fim-inclusion Bodies S. typhimurium, Balb/C mice*

Abstrak

Demam tifoid merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat di dunia dengan kisaran 17 juta kasus demam tifoid di seluruh dunia dan 600.000 kasus kematian tiap tahunnya. Salah satu cara untuk mencegah demam tifoid adalah dengan vaksinasi. Vaksin untuk demam tifoid yang sering digunakan saat ini adalah vaksin Ty 21a dan vi polisakarida. Akan tetapi vaksin-vaksin tersebut memberikan efek mual, demam, dan sakit kepala sesudah vaksinasi. Oleh karena itu, pencarian vaksin tifoid alternatif yang memiliki efek samping rendah masih diperlukan. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan informasi uji imunogenitas protein rekombinan Fim-C S. typhimurium dan adjuvant alumina pada mencit Balb/C. Dosis yang digunakan adalah 20µg, 40µg, dan 60µg. Plasma yang diperoleh kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan metode ELISA, western immunoblotting, dan dot blot. Kenaikan respon imun mencit Balb/C dari KS 1 menunjukkan perbedaan bermakna saat penyuntikan 40µg/ 20g BB dan KS 2

menunjukkan kenaikan antibodi pada saat penyuntikan 20 μ g/20g BB dibandingkan dengan KN. Adjuvant alumina yang ditambahkan pada protein Fim-C inclusion bodies salmonella typhimurium memberikan respon imunitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan protein Fim-C inclusion bodies Salmonella typhimurium tanpa penambahan adjuvant alumina. Hasil analisis dengan menggunakan western blot dan dot blot menunjukkan terbentuknya warna cokelat yang menandakan adanya interaksi antara protein Fim-C inclusion bodies Salmonella typhimurium dan antibodi anti Fim-C S. typhimurium. Hasil penelitian pengaruh adjuvant alumina dan protein Fim-C inclusion bodies Salmonella typhimurium pada mencit Balb/C memberikan kesimpulan bahwa adjuvant alumina dan protein Fim-C inclusion bodies Salmonella typhimurium memberikan respon imun yang meningkat bermakna pada mencit Balb/C.

Keyword: *Salmonella typhimurium, typhoid vaccine, Protein Rekombinan Fim-C inclusion Bodies S. typhimurium, Balb/C mice*

1. Introduction/Pendahuluan

Demam tifoid menjadi salah satu permasalahan kesehatan yang cukup serius di wilayah Asia Tengah, Asia Tenggara, Afrika, dan Amerika Latin [1]. Penanganan demam tifoid saat ini dilakukan dengan pemberian antibiotik, vaksin, serta dengan adanya perawatan intensif. Pemberian vaksin merupakan salah satu upaya yang diperhitungkan dalam mengatasi demam tifoid. Vaksin-vaksin yang telah digunakan dalam mengatasi demam tifoid antara lain vaksin oral Ty21a dan vaksin parenteral Vi-polisakarida [2]. Kedua vaksin tersebut berasal dari bakteri *S. typhi* yang dilemahkan. Vaksin Ty21a merupakan salah satu vaksin yang disarankan oleh WHO. Namun, vaksin ini memiliki kelemahan yaitu mengalami penurunan efektivitas perlindungan jika daerah tersebut merupakan daerah hiper-endemik seperti Indonesia. Kelemahan lainnya adalah vaksin ini hanya dapat digunakan orang dewasa dan anak-anak usia di atas 6 tahun. Selain itu terdapat efek samping yang dialami oleh beberapa orang setelah memperoleh vaksin demam tifoid antara lain mual, sakit perut, sakit kepala, dan diare [3]. Begitu pun dengan vaksin Vi-polisakarida,

vaksin ini tidak dapat digunakan pada bayi dan anak-anak di bawah usia 2 tahun, serta harus dilakukan vaksinasi ulang setiap 3 tahun. Oleh karena itu saat ini sedang dikembangkan penggunaan vaksin rekombinan yang jauh lebih aman dan umumnya tidak menimbulkan efek samping. Vaksin rekombinan memiliki keuntungan antara lain memiliki keamanan yang

lebih tinggi bagi pasien, kemurnian yang lebih tinggi, menghasilkan respon imun yang lebih spesifik, dapat diproduksi dalam jumlah besar, kemudahan dalam produksi dan penyimpanan[4]. Vaksin *Salmonella typhi* tentunya sulit diuji cobakan pada manusia, selain itu tidak ada hewan model yang sesuai (kecuali primata tingkat tinggi) untuk mempelajari patogenesis *Salmonella typhi* dan menguji vaksin yang potensial. Oleh karena itu dilakukan uji coba *Salmonella typhimurium* pada mencit berikut juga vaksinnnya. Hal ini dikarenakan *Salmonella typhimurium* menghasilkan gejala yang menyerupai demam tifoid pada tikus/mencit [4].

Penelitian sebelumnya telah dilakukan untuk menguji antigenitas protein rekombinan Fim-C *Salmonella typhimurium* dengan penggunaan *adjuvant* dan tanpa penggunaan *adjuvant*. *Adjuvant* yang digunakan adalah *Freund Complete/Incomplete Adjuvant* (FCA/FIA) [5]. Namun, *adjuvant* FCA/FIA bukanlah *adjuvant* yang dapat digunakan padamanusia. *Adjuvant* FCA/FIA mengandung *mycobacterium tuberculosis* yang sudah dilemahkan. Efek sesudah induksi dengan FCA/FIA mengakibatkan terjadinya hipersensitivitas granuloma [6]. *Adjuvant* yang dapat digunakan pada vaksin untuk manusia saat ini adalah *adjuvant* alumina. Sehingga dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan *adjuvant* alumina untuk mengetahui respon imun yang dihasilkan dengan menggunakan hewan uji mencit Balb/C.

2. Metodologi Penelitian

2.1 Produksi Protein Rekombinan Fim-C Inclusion Bodies Salmonella typhimurium

2.1.1 Pembuatan Inokulum *E.coli* BL21DE3 *plys.S pET-30a-fim-C-S.typhimurium*

Biakan *E. coli* BL21DE3 *plys.S pET-30a-fim-C-S. typhimurium* (DE3) diinokulasi dalam media LB cair 20mL yang mengandung 60µg/mL kanamisin (LBK). Campuran dilakukan inkubasi pada suhu 37⁰C dan dilakukan pengocokan dengan kecepatan 150 rpm dan dilakukan *overnight*.

2.1.2 Proses Overekspresi

Sebanyak 10 mL inokulum dengan OD₆₀₀ 0,6-0,8 dimasukkan ke dalam 250 mL media LBK steril. Campuran diinkubasi pada suhu 37⁰C, dengan pengocokan 150 rpm selama 3 jam sampai didapatkan OD₆₀₀ sebesar 0,6-0,8. Induksi terhadap ekspresi protein rekombinan dilakukan dengan menambahkan IPTG sebanyak 250 µL. Konsentrasi IPTG dalam medium 0,4 mM. Setelah itu inkubasi dilanjutkan selama 4 jam pada suhu 37⁰C, dengan pengocokan 150 rpm. [7]

2.1.3 Isolasi Protein Rekombinan Fim-C *S. typhimurium*

Isolasi protein Protein rekombinan Fim-C. *typhimuirum* diisolasi dari protein yang larut dalam sitoplasma dan protein yang membentuk agregat (*inclusion bodies*). Prosedur isolasi hasil overekspresi dilakukan sesuai prosedur QIAexpressionist [7].

2.1.4 Purifikasi Protein Rekombinan Fim-C *S. typhimurium* Hasil Isolasi

Purifikasi protein hasil isolasi yang membentuk agregat (*inclusion bodies*) dilakukan dengan menggunakan *His-Pur Spin Ni-NTA Purification Kit* dari *Thermo Scientific*. Prosedur yang digunakan sesuai dengan protokol *His-Pur Spin Ni-NTA Purification Kit* dari *Thermo Scientific*.

2.1.5 Pengukuran Konsentrasi Protein

Pengukuran konsentrasi protein Rekombinan Fim-C *S. typhimurium* hasil purifikasi dilakukan sesuai protokol dari produk *BCA Kit Assay* dari *Thermo Scientific*.

2.1.6 Karakterisasi Protein dengan SDS-PAGE

Karakterisasi protein hasil purifikasi dilakukan dengan SDS-PAGE 12%. Langkah proses SDS-PAGE meliputi penyiapan gel poliakrilamida, penyiapan sampel protein rekombinan *Fim-C S. typhimurium*, proses elektroforesis, pewarnaan gel, dan pengeringan gel.

2.2 Pengujian Protein Fim-C Inclusion Bodies *Salmonella typhimurium* dan Adjuvant Alumina pada Mencit Balb/C

Pengujian protein rekombinan Fim-C *Inclusion Bodies Salmonella typhimurium* dan *adjuvant* alumina pada Mencit Balb/C dilakukan secara *in vivo*. Mencit Balb/C yang digunakan berumur 4 minggu, berjenis kelamin jantan, dan memiliki berat 20-30 gram. Masing masing mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok yang disuntikan campuran protein Fim-C dan *adjuvant* alumina (KS 1), kelompok yang disuntikan oleh protein Fim-C (KS 2), kelompok kontrol yang disuntikan *adjuvant* alumina (KK1 1), kelompok yang disuntikan oleh *Phosphate Buffer Saline* atau PBS (KK 2), dan Kelompok normal (KN). Jumlah PBS 1x yang disuntikkan pada setiap ekor mencit pada kelompok kontrol 1 (KK 1) yaitu 500 µL. Jumlah *adjuvant* alumina yang disuntikkan pada setiap ekor mencit pada kelompok kontrol 2 (KK 2) yaitu 500 µL. Jumlah protein rekombinan Fim-C *Salmonella typhimurium* yang disuntikkan pada tiap mencit pada kelompok sampel 1 (KS 1) memiliki konsentrasi 20 µg/ 20 g BB mencit, 40 µg/ 20 g BB mencit, 60 µg/ 20 g BB. Protein dengan jumlah yang telah ditentukan kemudian ditambahkan dengan PBS 1X dengan perbandingan 1:1. Jumlah protein Fim-C *Salmonella typhimurium* untuk kelompok sampel 2 (KS 2) adalah dengan konsentrasi 20 µg/ 20 g BB mencit, 40µg/ 20g BB mencit, 60 µg/ 20 g BB yang kemudian ditambahkan dengan *adjuvant* alumina dengan perbandingan 1:1.

Pengambilan darah atau *bleeding* dilakukan satu minggu setelah proses penyuntikan. Darah yang berasal dari sinus orbitalis mata dikumpulkan pada tabung

mikrosentrifuge steril berukuran 1,5 mL yang sudah berisi EDTA. Sentrifugasi dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4 °C. Cairan bening (plasma) diambil dan dipisahkan menggunakan mikropipet dengan hati-hati dan dimasukkan dalam tabung mikrosentrifuge steril baru. Kemudian plasma disimpan pada -20 °C

Tabel 1. Jadwal Penyuntikan dan Pengambilan Darah

Kelompok	Hari ke-										
	0-7	8	9	16	17	24	25	32	36		
Normal			-		-		-				
Kontrol (PBS 1x)	Aklimatisasi	Bleed-0	500 µL	Bleed-1	500 µL	Bleed-2	500 µL	Bleed-3	Bleed-4		
Kontrol (Alumina)											
Sampel 1 (Protein Fim-C+PBS 1x)			20 µg/20 g BB		40 µg/20 g BB		60 µg/20 g BB				
Sampel 2 (Protein Fim-C+Adjuvant)											

2.3 Analisis Titer Antibodi Anti Fim-C *S. typhimurium* dengan Teknik ELISA

Protein rekombinan Fim-C *S. typhimurium inclusion bodies* dengan konsentrasi 100 ng/50 µL diinkubasi dalam plate pada suhu ruang selama semalam. Tiap well dicuci masing-masing 3 kali dengan PBS 1x yang mengandung 1 mM MgCl₂ dan 0,05% Tween-20 (*buffer* pencuci). Kemudian masing-masing well ditambahkan 150 µL larutan blotto (5 gram susu skim dalam 100 mL PBS 1x) inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Setelah inkubasi dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan *buffer* pencuci. Sebanyak 50 µL plasma mencit (Bleed 0 sampai Bleed 4) dengan pengenceran 100x ditambahkan pada tiap well sesuai dengan rancangan ELISA yang telah disiapkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Well microtiter plate dicuci kembali dengan *buffer* pencuci sebanyak tiga kali. Setelah proses pencucian ke dalam well ditambahkan masing-masing 50 µL antibodi sekunder (*anti IgG-mice-HRP* yang telah diencerkan 5000x), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, well microtiter plate dicuci kembali dengan *buffer* pencuci sebanyak tiga kali. Masing-masing well ditambahkan dengan 50 µL larutan substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Sesudah inkubasi, untuk penghentian reaksi ditambahkan H₂SO₄

masing masing well sebanyak 100 µL. Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada alat ELISA-Reader pada $\lambda = 450\text{nm}$.

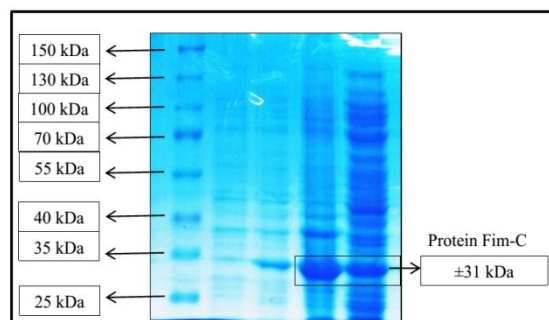
2.4 Analisis Interaksi Antibodi Anti Fim-C *S. typhimurium*

Prosedur *Western immunoblotting* dan *Dot Blot* menggunakan prosedur Bio-Rad [8] dan Amersham Bioscience [9].

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Produksi dan Karakterisasi Protein Rekombinan Fim-C *Inclusion Bodies S. typhimurium*

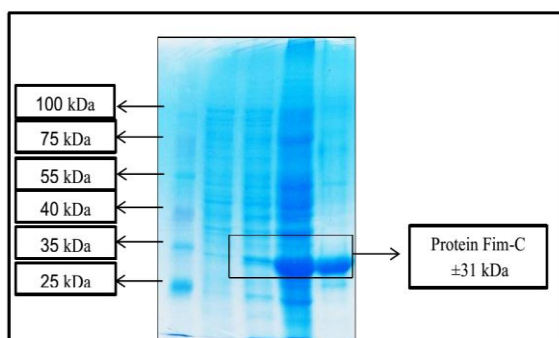
Protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies S. typhimurium* dilakukan proses overekspresi menggunakan IPTG sebagai *inducer*. Kultur sel bakteri rekombinan *E. coli* BL21 (DE3) plysS yang mengandung plasmid pET-30a-fim-C-*S. typhimurium* diinduksi selama 4 jam dan menghasilkan pellet sel sebanyak 2,39 gram. Hasil isolasi protein menghasilkan 4 mL ekstrak protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies S. typhimurium*. Protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies S. typhimurium* dimurnikan dengan metode *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) pada kolom yang mengandung resin Ni-NTA. Konsentrasi protein protein Fim-C *inclusion bodies* yang sudah dimurnikan hasil elusi pertama yaitu 318 µg/mL, hasil elusi kedua (P2) yaitu 154,54 µg/mL dan hasil elusi ketiga yaitu 118,18 µg/mL. Konsentrasi protein sebelum pemurnian yaitu 2720 µg/mL, berdasarkan data tersebut rendemen protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies S. typhimurium* yang diperoleh yaitu 24,03 %. Protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies S. typhimurium* dikarakterisasi dengan SDS-PAGE yang ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil Karakterisasi Protein Hasil

Eksresi dengan SDS PAGE. Lajur 1 : Protein marker 10 μ L; Lajur 2 : 20 μ L protein Fim-C *S. typhimurium* sebelum induksi; Lajur 3 : 20 μ L protein Fim-C *S. typhimurium* sesudah induksi; Lajur 4 : 20 μ L protein Fim-C *inclusion bodies S. typhimurium*; Lajur 5 : 20 μ L protein Fim-C *native S. typhimurium*

Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies S. typhimurium* telah berhasil diproduksi dan dimurnikan dengan adanya pita protein pada berat molekul \pm 31 kDa pada lajur 4 dan pita protein tunggal pada berat molekul \pm 31 kDa pada lajur 5. Berat molekul protein rekombinan Fim-C *S. typhi* diperoleh berdasarkan perhitungan secara teoretis menggunakan program DNASTar khususnya *EditSeq* dimana massa molekul protein fusi Fim-C *S. typhi* yang mengandung 10 asam amino histidin pada ujung 5' dan 12 asam amino yang dikenali oleh faktor Xa yang berkisar pada berat molekul 31 kDa [10].



Gambar 2. Hasil Karakterisasi SDS-PAGE Protein Fim-C *S. typhimurium*. Lajur 1: Protein marker 10 μ L; Lajur 2 : 20 μ L protein Fim-C *S. typhimurium* sebelum induksi; Lajur 3 : 20 μ L protein Fim-C *S. typhimurium* sesudah induksi; Lajur 4 : 20 μ L protein Fim-C *S. typhimurium* sebelum pemurnian; Lajur 5: 20 μ L protein Fim-C *S. typhimurium* sesudah pemurnian.

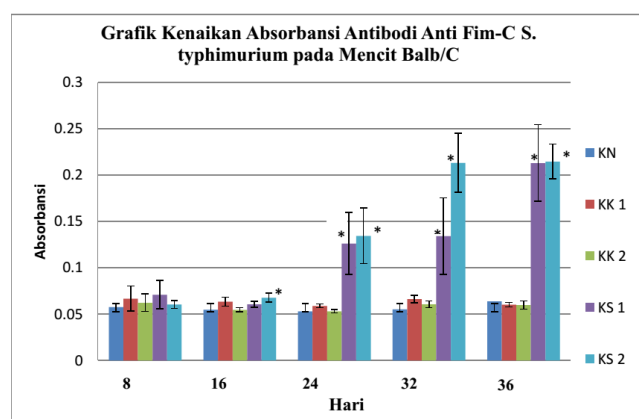
3.2 Pengujian Protein Fim-C Inclusion Bodies *Salmonella typhimurium* dan Adjuvant Alumina pada Mencit Balb/C

Berat badan rata-rata mencit selama pengujian protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies S. typhimurium* ditunjukkan pada tabel 2. Berat badan mencit pada masing-masing kelompok sebelum aklimatisasi dengan saat tahap aklimatisasi cenderung stabil. Hal ini menandakan mencit dapat beradaptasi dengan

baik di lingkungan yang baru. Pengambilan darah dilakukan pada bagian sinus orbitalis mata sebanyak 500 μ L dan dihasilkan plasma sebanyak 150-200 μ L. Kemudian plasma disimpan di freezer suhu -20 $^{\circ}$ C.

3.3 Analisis Titer Antibodi Anti Fim-C *Salmonella typhimurium* dengan Metode ELISA

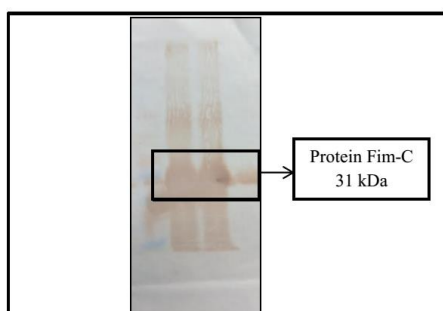
Plasma yang diperoleh kemudian dilakukan analisis perkembangan antibodinya dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Pada penelitian ini metode ELISA yang digunakan adalah metode *indirect ELISA*. Berdasarkan hasil analisis, KS 1 mulai menunjukkan perbedaan bermakna setelah penyuntikan dengan dosis 40 μ g/ 20g BB dibandingkan dengan KN. Sedangkan untuk KS 2 perbedaan bermakna ditunjukkan sesudah penyuntikan dengan dosis 20 μ g/ 20g BB dibandingkan dengan KN. Pada KS 2 semakin meningkatnya dosis penyuntikan semakin meningkat pula absorbansi yang dihasilkan. Hal ini menandakan bahwa penambahan *adjuvant alumina* meningkatkan respon imun yang lebih cepat dengan dosis yang kecil 20 μ g/ 20 g BB dibandingkan dengan protein rekombinan Fim-C *S. typhimurium* tanpa penambahan *adjuvant*. Kenaikan nilai titer antibodi anti Fim-C *S. typhimurium* ditunjukkan pada Gambar 3.



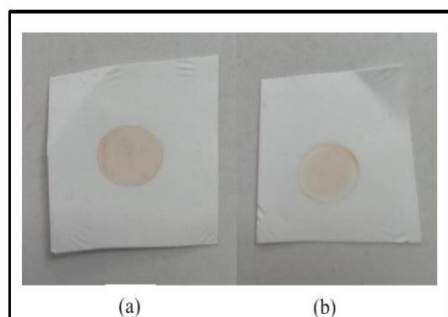
Gambar 3. Kenaikan Absorbansi Antibodi Anti Fim-C *S. typhimurium*

3.4 Analisis Interaksi Antibodi Anti Fim-C *S. typhimurium* dengan Western Blot dan Dot Blot

Hasil analisis interaksi antibodi anti-Fim-C *S. typhimurium* terhadap antigen Fim-C *S. typhimurium* (protein rekombinan Fim-C inclusion bodies *S. typhimurium*) ditunjukkan pada gambar 4 dan gambar 5. Warna cokelat yang terbentuk merupakan interaksi antara antigen (protein rekombinan Fim-C inclusion bodies *S. typhimurium*) dan antibody anti Fim-C yang dihasilkan.



Gambar 5. Western Immunoblotting



Gambar 6. Hasil Dot Blot. (a) Sampel Protein Fim-C+PBS 1x (b) Sampel Protein Fim-C +adjuvant alumina

4 Kesimpulan

Hasil penelitian pengaruh adjuvant alumina dan protein rekombinan Fim-C inclusion bodies *Salmonella typhimurium* pada mencit Balb/C memberi kesimpulan bahwa :

1. Protein rekombinan Fim-C inclusion bodies *Salmonella typhimurium* dan adjuvant alumina memberikan respon imun pada mencit Balb/C.
2. Antibodi anti-Fim-C yang diproduksi oleh mencit Balb/C kelompok 1 (KS1) mengalami perbedaan bermakna saat pemberian dosis 40 μg / 20 g BB. Antibodi anti-Fim-C yang diproduksi oleh mencit Balb/C kelompok 2 (KS2) mengalami perbedaan bermakna saat pemberian dosis 20 μg / 20 g BB.
3. Antibodi Anti-Fim-C *S. typhimurium* menghasilkan interaksi terhadap antigen Fim-C *S. typhimurium*.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Prodi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Laboratorium Oral Biologi FKG UI dan LAPTIAB BPPT, Serpong

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Cui, C., Carbis, R., An, S. J., Jang, H., Czerkinsky, C., Szu, S. C., and Clemens, J. D. 2010. Physical and Chemical Characterization and Immunologic Properties of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Capsular Polysaccharide-Diphtheria Toxoid Conjugates. *Journal.asm.org*. Vol. **17**, No. 1, 73-79
- [2] NHS. 2015. *Typhoid fever-Vaccination*. <http://www.nhs.uk/conditions/typhoid-fever/pages/prevention.aspx>, diakses pada 23 September 2015 pukul 05.36 WIB
- [3] Muktiningsih, Syukriani, Y.F., Kartika I.R. 2009. *Laporan Penelitian Fundamental DIKTI: Studi Fungsi Protein Reference Spot Bakteri Salmonella typhi dalam Upaya Penemuan Protein Bioaktif*. Jakarta: FMIPA UNJ.
- [4] Song, J., Willinger, T., Rongvaux, A., Eynon, E. E., Stevens, S., Markus, G., Flavel, R. A., Jorge, E. 2010. A Mouse Model for the Human Pathogen

- Salmonella typhi*. *Cell Host & Microbe Resource*, 8(4) :369-379.
- [5] Apriyani, D. 2014. *Produksi dan Karakterisasi Antibodi Anti Fim-C Salmonella typhimurium pada Mencit ddY* [SKRIPSI]. Jakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta
- [6] Apostólico J. S., Lunardelli, V. A. S., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., Rosa, D. S. 2016. Adjuvants : Classification, *Modus Operandi*, and Licensing. *J Immunol Res* 2016: 1459394
- [7] QiaExpressionist. 2003. *A Hand Book for High-level Expression and Purification of 6xHis-tagged Proteins* (5th ed.). USA: Qiagen.
- [8] Bio-Rad. 2016. *A Guide to Polyacrilamide Gel Electrophoresis and Detection*. USA: Bio-Rad.
- [9] Abcam. 2017. *Dot Blot Protocol*. <http://www.abcam.com/protocols/dot-blot-protocol>, diakses pada 20 Juni 2017 pukul 18.23 WIB
- [10] Pratiwi, E., D. 2013. *Subkloning dan Ekspresi Gen fim-C Salmonella typhi* [Skripsi]. Jakarta : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.