

Sensitivitas dan Spesifisitas metode *Dot Blot* menggunakan Antigen *Outer Membrane Protein Klebsiella pneumoniae* yang Direspon *Secretory-Immunoglobulin A* Sputum Penderita Terinfeksi *Klebsiella pneumoniae*

Wara pertiwi* Teguh R.Sartono* Sumarno** Siswanto Adi***

* Bagian Ilmu Penyakit Paru FK Unibraw-RSU Dr. Saiful Anwar Malang

** Bagian Biomedik FK Unibraw Malang

*** Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat FK Unibraw Malang

ABSTRAK

Klebsiella pneumoniae (*K.pneumoniae*) termasuk dalam genus *Klebsiella*, merupakan penghuni normal traktus digestivus. Pada manusia *K.pneumoniae* dapat menyebabkan infeksi saluran napas di samping infeksi lain di luar sistem pernapasan misalnya infeksi saluran kemih, infeksi nosokomial dll. Selama ini, untuk mengidentifikasi kuman ini digunakan metode pengecatan dan kultur, yang memerlukan waktu lama.

Penelitian ini bertujuan mendeteksi kuman *K. pneumoniae* yang terdapat pada sputum penderita batuk menggunakan prinsip reaksi serologis metode *Dot blot* dengan melihat respon imun humoral *Secretory-Immunoglobulin A (s-IgA)* terhadap antigen spesifik *Outer Membrane Protein (OMP)* kuman *K. pneumoniae*.

Metode penelitian dilakukan secara eksploratif dilanjutkan dengan analisis uji diagnosis. Bahan berupa 110 sampel sputum penderita batuk yang diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSSA Malang dengan melakukan kultur. Hasil pemeriksaan kultur digunakan sebagai standard emas pada uji diagnosis. Isolasi *OMP K.pneumoniae* sebagai antigen spesifik diperoleh dari penderita batuk dengan kultur *K.pneumoniae* positif. Dilanjutkan dengan identifikasi adanya respon imun *s-IgA* yang terdapat pada sputum dengan cara *Western blotting*. Tahap selanjutnya penelitian uji diagnostik dengan metode *dot blot* protein spesifik *OMP* pada 110 sampel sputum.

Hasil penelitian ternyata menunjukkan bobot molekul *OMP K.pneumoniae* sebesar 20 kDa direspon oleh *s-IgA*. Pemeriksaan respon imun humoral *s-IgA* terhadap antigen 20 kDa *K.pneumoniae* Sedangkan hasil pemeriksaan *Dot blot* dan berdasarkan baku emas pemeriksaan kultur pada 110 sampel sputum didapatkan pada *cut off mean* 124,91 nilai sensitivitas 83,33%, spesifitas 87,79 %, prediksi positif 45,45 % dan prediksi negatif 97,72 %. Dalam penerapan klinik masih perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam lagi berkaitan dengan pengembangan metode ini.

Kata kunci: *OMP, Klebsiella pneumoniae, Dot blot*

PENDAHULUAN

LATAR BELAKANG

Klebsiella pneumonia (*K.pneumoniae*) adalah kuman *Enterobacteriaceae* yang dapat menimbulkan penyakit infeksi. Bentuk klinis penyakit infeksi oleh *K.pneumoniae* ini adalah infeksi nosokomial, terutama pada penderita dengan imunokompromais, Diabetes Melitus, Penyakit Paru Obstruktif Kronik, alkoholik (Jong 1995). Selain itu *K.pneumoniae* termasuk dalam *the big three* kuman gram negatif penyebab *febrile neutropenia* (Margono 2006).

Pola kuman infeksi paru di RSUD dr. Soetomo, frekwensi infeksi dengan *Klebsiella* adalah 20%. *Klebsiella* sering ditemukan pada penderita dengan pneumonia napza, penyebab CAP di bagian Pulmonologi FKUI 42,85 % (Soenarjo), 78,57 % (Jabang M), 44,4% (Handiarto M). Sebagai kuman penyebab CAP dan faktor risiko independen untuk mortalitas pada CAP berat (Paganin 2004).

Pola kuman berdasarkan hasil pemeriksaan sputum di RS. Saiful Anwar Malang periode bulan Juli 2000 - Juni 2001 ditemukan *K. pneumoniae* sebanyak (17,8%), Juli-Desember 2001 (19,37%), urutan pertama pemeriksaan kultur sputum di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSSA. Di RS. Dr.Soetomo Surabaya menempati urutan ke 3 (20%) pada tahun 1998. Dari data bakteri di beberapa

laboratorium di Medan dari bulan Januari-Desember 2001 *K. pneumonia* menduduki peringkat pertama (22,06%) dari 21 bakteri yang ditemukan.

Banyak faktor-faktor bakterial diketahui terlibat dalam mekanisme patogenik infeksi *Klebsiella*. Penelitian akhir pada fokus patogenisitas *Klebsiella* spp pada 5 faktor bakterial mayor yaitu kapsul, fimbriae (pili), resistensi serum, LPS, dan *siderophores* (Podschun, 1998).

Tiga komponen dinding luar bakteri gram negatif diperkirakan terlibat pada berkembangnya imunitas adalah LPS, membran proteoglikan dan *Outer membrane protein* (OMP). *Outer membrane protein* (OMP) atau *Afibrial adhesin* merupakan protein permukaan, melekat pada hospes lebih kuat dibandingkan pili (Kisra 1995).

Satu dari mekanisme pertahanan lini pertama saluran napas adalah *system secretory IgA* (*s-IgA*), yang telah diseleksi melalui evolusi untuk memproteksi permukaan mukosa. *s-IgA* mempunyai sifat yang unik (valensi tinggi untuk ikatan antigen dan relatif resisten terhadap proteolisis mikroflora komensal) untuk memenuhi perannya pada mukosa (Pillete 2004).

Untuk mengidentifikasi kuman *K.pneumoniae* dapat digunakan metode-metode pengecatan dan kultur, yang memerlukan waktu yang cukup lama. Pada penelitian ini berusaha untuk mengetahui bagaimana respon *s-IgA* terhadap antigen spesifik *OMP K.pneumoniae* penderita *K.pneumoniae* dengan metode *Dot blot*.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan untuk rancangan penelitian ini adalah penelitian eksploratif laboratorium yang dilanjutkan dengan uji diagnostik.

Pengumpulan sputum dilakukan di Laboratorium Klinik Mikrobiologi RSUD Dr.Saiful Anwar Malang. Uji klinik laboratorium dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Sampel adalah sputum penderita batuk yang dilakukan kultur di laboratorium mikrobiologi RSSA Malang yang menjalani rawat inap/jalan di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.

Kriteria inklusi dan eksklusi

Kriteria inklusi adalah sputum yang representatif. Kriteria eksklusi bila sputum tidak representatif.

Definisi operasional

- Sputum representatif adalah jika dalam pemeriksaan mikroskopis didapatkan sel PMN > 25/lpk dan sel epitel < 10/lpk.
- Kultur positif adalah jika hasil pemeriksaan kultur sputum tumbuh kuman *K.pneumoniae*
- Kultur negatif adalah jika hasil pemeriksaan kultur tidak tumbuh kuman *K.pneumoniae*.
- Hasil positif *Dot blot* adalah apabila terbentuk dot-dot pada membran nitroselulose. Kualitas hasil dilihat berdasarkan gradasi warna.

Jumlah sampel

Jumlah sampel dihitung menggunakan rumus besar sampel untuk proporsi tunggal yaitu perkiraan sensitivitas uji diagnostik 80 % dan spesifitas 85 %, penyimpangan untuk sensitivitas dan spesifisitas masing-masing adalah 10 % dan interval kepercayaan yang dikehendaki 95 % ($=0,05$), dengan jumlah total sampel = $61 + 49 = 110$.

Baku emas

Baku emas yang kita pakai adalah hasil pemeriksaan kultur sputum. Baku emas ini dipilih karena memang merupakan modalitas diagnostik terbaik untuk kelainan yang diteliti dan selama ini dipakai sebagai alat diagnostik untuk maksud tersebut.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat elektroforesis, seperangkat alat elektroelusi, seperangkat alat dialisa, sentrifus, *plate* titer mikro, pipet titer makro, tabung 15 cc, *ependorf*, *magnetic stirrer*, *refrigerator centrifuge*, *disposable spuit 1 cc*, *Vortex*, *Dot blotter*.

Bahan sampel penelitian

Sampel sputum, medium *Mc.Conkey*, *kit Microbac system*, medium BHI, TCG, Bahan elektroforesis, elektroelusi, *Western blotting*, *Dot blotting*.

CARA KERJA

A. Penelitian eksploratif laboratorium

Metode untuk mendapatkan kuman *K.pneumoniae*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari sputum penderita dengan kultur positif *K.pneumoniae*, dengan menggunakan kit *Microbact system* yang mempunyai ketepatan 90%. Hasil isolasi kuman *K.pneumoniae* yang dipilih dilakukan perbenihan pada cawan petri yang mengandung media TCBS dieramkan pada suhu 24°C 24 jam. Hasil biakan pada media TGBS tersebut dipanen dengan melakukan kerokan yang sebelumnya telah dituangi dengan PBS steril pada pH 7,4 sebanyak 10 ml. Suspensi bakteri hasil kerokan dimasukkan dalam botol yang mengandung 1000 ml larutan *Brain Heart Infussion Broth* (BHI), kemudian dikocok kuat selama 30 menit pada penangas air pada suhu 37 °C. Selanjutnya dari botol tersebut suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan dalam masing-masing botol yang telah mengandung medium TCG kemudian dilakukan pengeringan pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam. Kemudian kuman dipanen ditambah TGA disentrifus dan diambil peletnya untuk isolasi OMP-nya

Isolasi protein OMP *K.pneumoniae*.

Isolasi dilakukan menurut Sumarno, dkk (1988) yang merupakan modifikasi dari Evan's. Modifikasi yang dilakukan adalah pada bagian sampel yang digunakan yaitu endapan dari perlakuan pemotongan pili pada putaran terakhir dan tidak dilakukan kolom kromatografi. Pelet disuspensikan dengan PBS pH 7,4 sampai volumenya mencapai 5 kali, kemudian ditambahkan *n-octyl-β-D-glucopyranoside* (NOG) sehingga konsentrasinya mencapai 0,05 %. Kemudian dilakukan homogenisasi dengan vorteks dengan menggunakan kecepatan penuh selama 1 menit. Setelah selesai melakukan homogenisasi maka dikerjakan sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm. Pada suhu 4 °C selama 15 menit. Pada bagian endapannya dilakukan isolasi bagian OMP nya dengan cara yang sama seperti langkah-langkah tersebut diatas. Perlakuan ini diulang sampai enam kali.

Mencari berat molekul OMP *K.pneumoniae*

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Monitoring bobot molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE metode Laemmli (1970). Sampel *Klebsiella pneumonia* yang telah diencerkan dengan PBS diambil sebanyak 500 µl dipanaskan 100 °C selama 5 menit dalam 500 µl larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCl pH 6,8 , 2-mercapto ethanol 5%, w/v sodium dodecyl sulfate 2.5%, v/v glyserol 10% dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipilih mini slab gel 12,5% dengan tracking gel 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Bahan pewarna yang digunakan adalah *coomassie brilliant blue*. Digunakan molekul standard *sigma low range marker* untuk mengetahui berat molekul dari antigen yang akan digunakan.

Metode *Westernblotting*

Pemeriksaan *westernblotting* 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. Setelah waktu pemindahan dicapai, maka dilakukan pengecatan menggunakan pewarna *ponco* 2% yang mengandung TCA sampai konsentrasi mencapai 30% untuk mengetahui apakah protein sampel telah pindah pada kertas nitroselulosa. Sebagai petanda untuk menentukan bobot molekul protein hasil pemeriksaan *western blotting* maka menggunakan lajur yang berisi protein petanda. Pada setiap pita protein petanda tersebut ditusuk dengan jarum supaya tidak kehilangan jejak oleh karena pada waktu dibilas dengan air warna tersebut tidak tampak. Untuk menghilangkan warna *ponco* dibilas dengan H₂O. Selanjutnya dilakukan pada kertas nitroselulose diratakan menggunakan cairan TBE yang mengandung albumin dengan konsentrasi 3% dalam larutan TBE pH 7,4 dan *Tween* 20 konsentrasi 0,05%, selanjutnya dilakukan inkubasi semalam. Setelah waktu inkubasi cukup maka dilakukan pencucian dengan cairan TBE pH 7,4 yang ditambah *Tween* 20 konsentrasi 0,05% sampai 2 kali, dimana tiap kali pencucian memerlukan waktu 5 menit. Apabila waktu pencucian selesai maka ditambahkan antibodi primer dengan konsentrasi 1/1000 dalam TBE pH 7,4 yang mengandung larutan BSA konsentrasi 1%, kemudian digoyang selama 2 jam. Dilakukan pencucian lagi sebanyak 2 kali, dimana setiap pencucian memerlukan waktu 5 menit, sebagai larutan pencuci adalah cairan TBE pH 7,4 yang mengandung *Tween* 20 konsentrasi 0,05%. Selanjutnya ditambah antibodi sekunder yaitu *IgA-anti Human* konsentrasi 1/2000 dalam TBE pH 7,4 dan BSA konsentrasi 1%. Digoyang selama 2 jam dan dilindungi terhadap pengaruh sinar. Kemudian dilakukan pencucian 2 kali selama 5 menit dengan menggunakan TBE pH 7,4 *Tween* 20 konsentrasi 0,05%. Sebagai bahan warna digunakan tablet *β Cip* yang dilarutkan pada H₂O 10 ml. Larutan ini

dituangkan pada kertas nitroselulose dan dilakukan pengamatan reaksi terjadinya warna merah. Jika reaksi cukup kemudian dibilas dengan H₂O dan selanjutnya dikeringkan dengan meletakkan di atas kertas saring.

Metode pemurnian protein *Klebsiella pneumonia*

Petunjuk penelitian seperti dilakukan oleh Ehara dengan modifikasi (Sumarno et al, 1991 dan Winarsih S et al, 1998).

Gel dipotong lurus pada bobot molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan dalam tabung membran dialisa memakai cairan penyangga elektroforesis *running buffer*. Selanjutnya dilakukan elektroelusi menggunakan elektroforesis horisontal apparatus aliran 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilakukan dialisa dengan cairan penyangga PBS dan PH 7,4 selama 2 X 24 jam @ 2 liter dan diganti 3 kali. Cairan dialisat yang berasal dari potongan pita SDS-PAGE tersebut selanjutnya digunakan untuk *Dot Blotting*

Dot Blot

Dot blot merupakan uji serologis yang fungsinya sama dengan *western blott*, yaitu untuk mendeteksi kespesifikan reaksi antara antigen dan antibodi. Membran nitroselulose/NC (dipotong 7,5 x 11 cm) 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 (dalam tris-buffer salin pH. 7,4), diinkubasi semalam pada suhu 4 °C atau di degas sampai antigen benar-benar terserap ke dalam membran NC. Selanjutnya dilakukan bloking dengan *blocking buffer* TBS (mengandung Tris Base 50 mM, NaCl 0,2 M, susu skim 5 %, pH 7,4), diinkubasi semalam pada suhu 4 °C. Larutan bloking dibuang. Tahap selanjutnya pada membran ditetesi antibodi primer yang diuji 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 1:2500 dalam larutan tris salin, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, diatas *shaker*. Dicuci lagi 3 kali dengan TBS Tween-20 0,05 %. Selanjutnya ditambahkan substrat berkromogen (BCIP-NBT) yang akan memberikan warna coklat kemerahan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan H₂O.

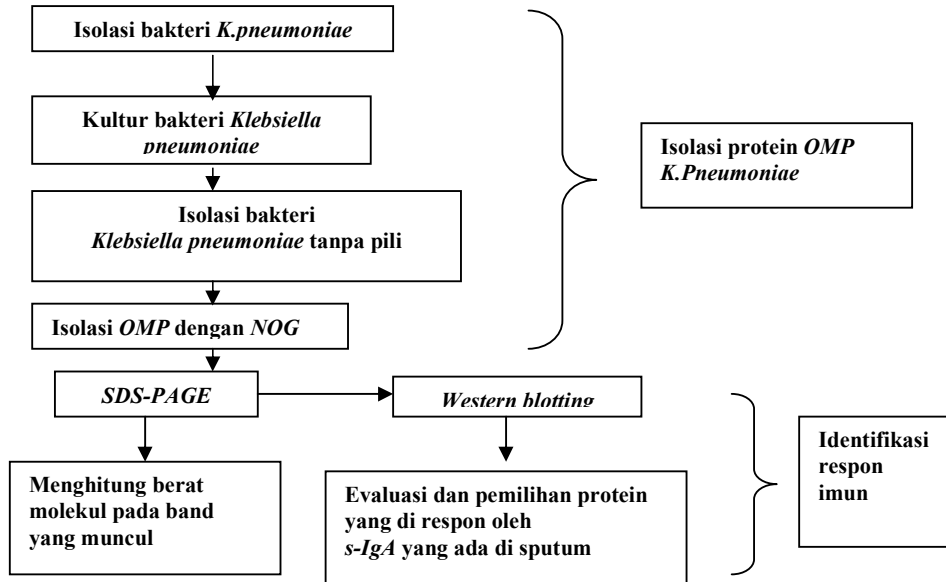
Hasil positif apabila terbentuk dot-dot pada membran nitroselulose. Kualitas hasil dilihat berdasarkan gradasi warna.

B. Penelitian untuk uji diagnostik.

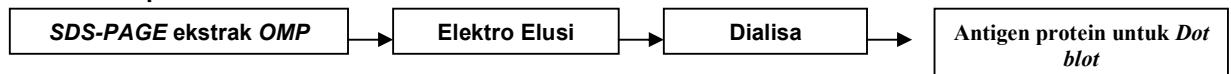
Test silang sampel sputum dengan kultur

Untuk membandingkan hasil pemeriksaan *dot blotting* ini, maka sputum juga dilakukan kultur untuk melihat apakah sputum yang positif mengandung kuman *K.pneumoniae* dengan reaksi *Dot Blot* akan tumbuh kuman *K.pneumoniae* dan sebaliknya sputum yang negatif tidak akan terjadi pertumbuhan kuman *K.pneumoniae*.

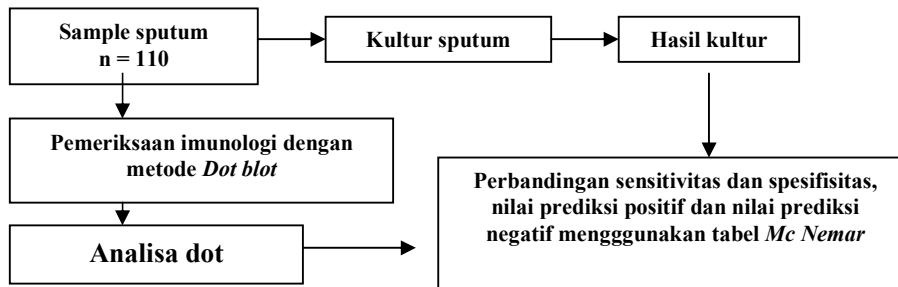
**Kerangka operasional laboratorium.
Studi eksploratif untuk isolasi protein OMP *K. Pneumoniae***



Pemurnian protein bakteri



Uji Diagnostik protein OMP *Klebsiella* dengan metode *Dot blot*



Analisa data penelitian

Setelah pengumpulan data selesai, dilakukan tabulasi hasil uji diagnostik (*dot blot*) dan hasil pemeriksaan baku emas (kultur sputum) untuk setiap sputum penderita.

Hasil uji klinis ini dapat diketahui mengenai berapa sensitivitas dan spesifitas metode diagnostik *dot blot* protein sub unit OMP *K. pneumoniae* dibandingkan dengan kultur.

Untuk mendapatkan standard dalam menilai hasil dot dalam setiap penelitian ini digunakan program *Corel Photoplain 12* untuk mendapatkan data yang akurat tentang tebal tipisnya noda hitam pada membran nitroselulosa.

HASIL PENELITIAN

Hasil survei sputum

Dari 110 sampel sputum yang diperiksa kulturnya didapatkan hasil seperti dalam tabel 1. Dari tabel 1. dapat dilihat bahwa *K.pneumoniae* berada di urutan ke 2 setelah *Staph.coagulase negatif* yaitu 10,9% dari 110 sampel sputum yang telah dilakukan kultur dan dari 25 isolat bakteri yang ditemukan

Tabel 1. Jenis isolat bakteri dari sampel sputum

No	Jenis isolat bakteri	Jumlah	%
1	Staph.Coagulase negatif	25	22,72
2	Klebsiella pneumoniae	12	10,9
3	Pseudomonas aeruginosa	11	10
4	A. baumami	9	8,18
5	St.aureus	9	8,18
6	E.coli	7	6,36
7	E.georgiviae	6	5,45
8	Streptococcus spp	6	5,45
9	K.oxytoca	4	3,64
10	P.pseudomalei	3	2,73
11	A.hydrophylic	2	1,82
12	P.cloacae	2	1,82
13	P.fluorescens	2	1,82
14	A.firofii	1	0,91
14	P.vulgaris	1	0,91
16	S.runidae	1	0,91
17	S.colerasius	1	0,91
18	B.cepacia	1	0,91
19	S.marcescens	1	0,91
20	E.zacazae	1	0,91
21	C.grenidi	1	0,91
22	P.aerotins	1	0,91
23	A.ifo	1	0,91
24	A.lofii	1	0,91
25	S.liquefacialis	1	0,91

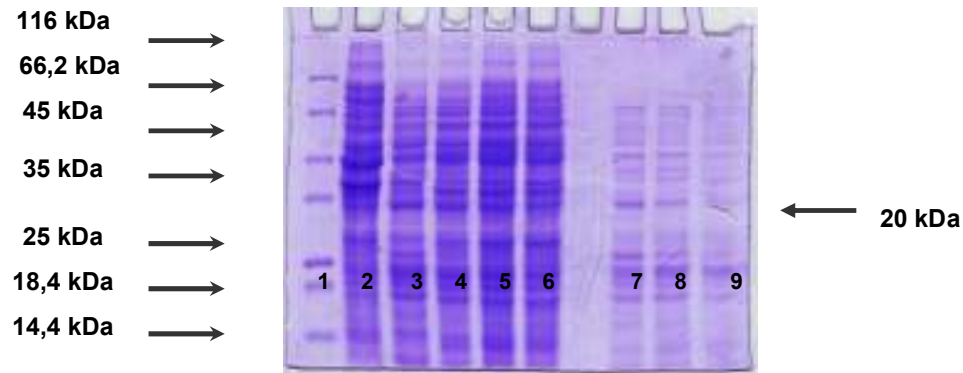
Hasil pengecatan Gram bakteri *K.pneumoniae*



Gambar 1. Hasil pengecatan Gram bakteri *K.pneumoniae*
Pada pengecatan gram bakteri *Klebsiella pneumoniae* tampak kuman batang biru kemerahan.

Profil protein *OMP K. pneumonia* menggunakan metode *SDS-PAGE*

Penelitian tahap ini ditujukan untuk mengetahui profil pita protein yang muncul pada protein *OMP*. Pita protein yang muncul dihitung bobot molekulnya (BM) dengan memakai cara penghitungan regresi-korelasi dibandingkan dengan marker *protein low sigma*.



Gambar 2. Profil protein *OMP K. pneumonia* menggunakan metode *SDS-PAGE*

Keterangan :

1. Protein petanda
2. Sumur 2 adalah Whole Cell *K. Pneumonia*
3. Sumur 3-6 adalah protein *OMP K. Pneumonia* hasil isolasi dengan SDS 0,5%
4. Sumur 7-9 adalah protein *OMP K. Pneumonia* hasil isolasi dengan NOG 0,5%

Dari gambar 2 dapat dilihat bahwa pita protein yang timbul lebih banyak dan lebih tebal pada *whole cell* dan isolasi protein dengan SDS 0,5% dibandingkan pita protein yang muncul pada isolasi protein dengan NOG 0,5 %. Tetapi pada isolasi dengan NOG 0,5% didapatkan pita protein yang muncul lebih menonjol yaitu pada protein *OMP* dengan bobot molekul 20 kDa.

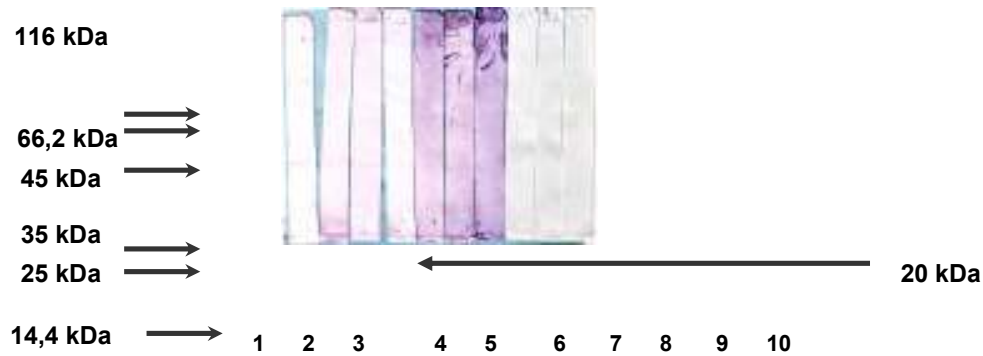
Dengan melakukan elektroforesis dengan metode *SDS PAGE* dapat diketahui profil pita protein yang muncul pada protein *OMP*. Pita protein yang muncul dihitung berat molekulnya melalui regresi-korelasi yang dibandingkan dengan protein petanda *Fermentas Low Range Marker*. Hasil fraksinasi protein *OMP* dapat dibedakan dengan protein *whole cell*nya, dimana protein *whole cell* mempunyai berat molekul antara 8,9 kDa sampai 80,67 kDa, sedangkan profil protein *OMP* terlihat mempunyai berat molekul antara lain: 18 kDa, 20 kDa, 34 kDa

Hasil uji respons imun dengan metode *Western Blotting*

Karakterisasi antibodi anti OMP 20 kDa dilakukan dengan metode *Western blotting*. Antibodi primer anti OMP 20 kDa diisolasi dari sputum penderita hasil kultur positif dengan antibodi sekunder *IgA- anti Human AP conjugate*. Dengan kromogen BCIP-NBT akan memberikan visualisasi coklat kemerahan terhadap keberadaan protein. OMP 20 kDa.

Warna pita coklat kemerahan yang muncul pada membran NC (*Nitrocellulose*) menunjukkan protein OMP 20 kDa hasil transfer dari gel *SDS-PAGE* diikat oleh antibodi anti OMP 20 kDa. Pita coklat kemerahan pada membran NC menunjukkan respon antigen-antibodi spesifik pada berat molekul tertentu yaitu 20 kDa.

Hasil produksi dan isolasi antibodi poliklonal anti OMP 20 kDa *K.pneumoniae* dikarakterisasi dengan metode *Western blotting* untuk mendeteksi respons antibodi humoral terhadap antigen spesifik (pada BM 20 kDa), pada membran nitroselulosa yang sudah ditransfer protein dari gel *SDS-PAGE*. Pita yang muncul pada *Western blotting* hanya pada protein yang diikat oleh antibodi poliklonal anti OMP 20 kDa.



Gambar 3. Profil protein pili & OMP *K. pneumoniae* menggunakan metode *Western Blotting* dengan antibodi primer dari sputum penderita

Keterangan:

1. Protein petanda
2. Adalah protein Pili *K. Pneumonia* cukuran ke-3
3. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-2 dengan NOG 0,5%
4. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-4 dengan SDS 0,5%
5. Adalah protein Pili *K. Pneumonia* cukuran ke-1
6. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-3 dengan NOG 0,5%
7. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-2 dengan SDS 0,5%
8. Adalah protein Pili *K. Pneumonia* cukuran ke-6
9. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-1 dengan NOG 0,5%
10. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-1 dengan SDS 0,5%

Dari gambar tersebut terlihat bahwa yang dikenali oleh antibodi terhadap OMP *K.pneumoniae* dengan jelas adalah OMP *K.pneumoniae* dengan bobot molekul 20 kDa dengan menggunakan NOG 0,5 % sama seperti pita protein yang muncul dominan pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE

Uji respons imun ulang dengan Western blotting

Tujuan untuk melihat respon imun semua protein OMP dengan antibodi primer dari sputum kultur positif yang berespons pada uji *western blotting* pertama



Gambar 4. Profil protein pili & OMP *K. pneumoniae* menggunakan metode *Western Blotting* dengan antibodi primer dari sputum penderita

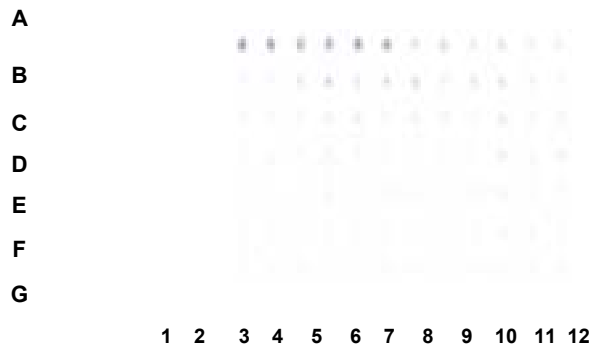
Keterangan:

1. Protein petanda
2. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-1 dengan SDS 0,5%
3. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-2 dengan NOG 0,5%
4. Adalah protein Pili *K. Pneumonia* cukuran ke-3
5. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-2 dengan SDS 0,5%
6. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-3 dengan NOG 0,5%
7. Adalah protein Pili *K. Pneumonia* cukuran ke-6
8. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-4 dengan SDS 0,5%
9. Adalah protein OMP *K. Pneumonia* isolasi ke-1 dengan NOG 0,5%
10. Adalah protein Pili *K. Pneumonia* cukuran ke-1

Pada gambar diatas didapatkan pita protein yang muncul menonjol sama dengan uji *western blotting* pertama yaitu pada protein *OMP* no 3 hasil isolasi dengan NOG 0,5 % dengan berat molekul 20 kDa. Selanjutnya protein ini dilakukan elektroelusi dan dialisa untuk pemurnian protein dan digunakan untuk uji *Dot blotting*.

Karakterisasi antibodi anti *OMP* 20 kDa dengan metode *Dot blot*

Karakterisasi antibodi anti *OMP* 20 kDa dilakukan dengan metode *dot blotting*. Antibodi primer anti *OMP* 20 kDa yang diisolasi dari sputum penderita kultur positif dengan antibodi sekunder *anti IgA human AP-conjugate* dengan kromogen *western blue*, yang memberikan visualisasi biru keunguan terhadap keberadaan molekul ini.



Gambar 5. Hasil *Chequerboard* antigen protein *OMP* BM 20 kDa *K. pneumonia* dengan menggunakan antibodi primer dari sputum penderita
Keterangan :

1. Baris 1-12 pengenceran antigen
2. Kolom A-G pengenceran antibodi

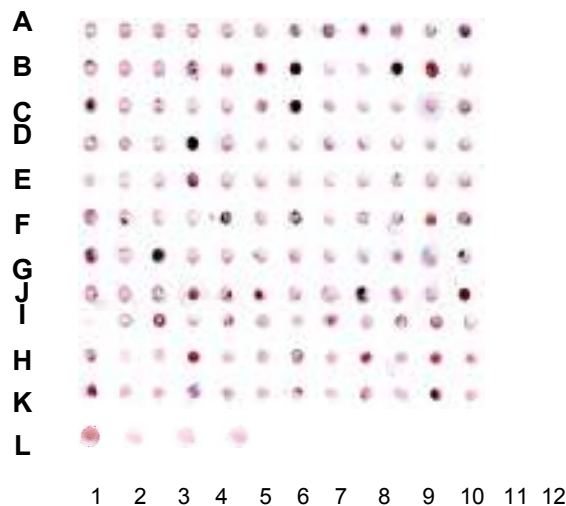
Pada *Dot blotting* tampak sebagai gambaran dot biru keunguan. Warna dot biru keunguan yang muncul pada membran *NC* menunjukkan protein *OMP* 20 kDa diikat oleh antibodi anti *OMP* 20 kDa. Dot biru keunguan pada membran *NC* menunjukkan respons antigen-antibodi spesifik.

Besarnya titer antibodi ditentukan oleh nilai pengenceran tertinggi yang masih memiliki konsistensi ketebalan warna dot sama atau mendekati pengenceran yang pertama. Warna biru keunguan yang semakin tipis di membran nitroselulosa pada pengenceran tertinggi (kolom G), menandakan titer antibodi yang semakin kecil.

Hasil pemeriksaan *Dot blot*

Uji *Dot blot* dikerjakan dengan maksud untuk menguji apakah antigen *OMP* 20 kDa bakteri *K.pneumoniae* bersifat sensitif dan spesifik terhadap antibodi *K.pneumoniae* yang terdapat dalam supernatan sputum penderita. Uji ini dilakukan pada 110 sampel sputum penderita yang telah dilakukan kultur dan telah diperiksa di Laboratorium Klinik mikrobiologi RSSA Malang. Sputum yang akan diperiksa diacak kemudian dilakukan uji *Dot blot* . Sebagai antigen dipakai sampel protein *OMP* 20 kDa sedang antibodi sekundernya adalah anti *IgA human AP conjugate*.

Hasil pemeriksaan *Dot blot* dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 6. Hasil *Dot Blot* antigen protein OMP BM 20 kDa *K. pneumonia* dengan menggunakan antibodi primer dari sputum penderita

Keterangan :

1. Baris 1-12, Kolom A-K dan L 1 adalah menggunakan antibodi primer sputum pasien.
2. L 4 – L 6 adalah kontrol negatif

Gambaran hasil *Dot blot* diatas menunjukkan adanya ikatan antigen dan antibodi antara supernatan sputum yang diduga terinfeksi *K.pneumoniae* dengan antigen 20 kDa *K.pneumoniae*. Kualitas warna dot yang ditampilkan menunjukkan seberapa tinggi titer antibodi terhadap antigen yang dicoatingkan pada kertas Nitroselulosa

Analisa *Dot blotting* dengan *corel photo pain 12*

Data dot yang diperoleh di masukkan dalam program *Corel Photo Pain 12*, dan dengan cara menilai masing-masing dot yang mempunyai ketebalan yang berbeda, akan didapatkan nilai kuantitatif yang berbeda-beda. Semakin tebal warna dot, semakin rendah nilai *mean*, yang berarti juga semakin tinggi titer antibodi yang dihasilkan.

Analisa Data Penelitian

Tabel 2. Prosentase sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif dengan mengganti nilai *cut off meannya* dengan tabel *Mc Nemar*

<i>Cut off mean</i>	Sensitivitas %	Spesifitas %	NPP %	NPN %
124,91	83,33	87,75	45,45	97,72
131,87	83,33	85,71	41,67	97,67
116,79	75	88,77	45	96,66
156,81	91,66	74,48	30,55	98,64

- ⇒ *Cut off* berasal dari perhitungan mean menggunakan program *Corel Photoplain 12*
 ⇒ NPP = Nilai Prediksi positif, NPN = Nilai Prediksi Negatif

PEMBAHASAN

Dari penelitian yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUD Dr.Saiful Anwar Malang terhadap 110 sampel sputum secara acak didapatkan profil isolat bakteri terbanyak adalah *Staphylococcus coagulase negatif* yaitu 24 (21,8%), disusul dengan *K.pneumoniae* 12 (10,11%), *Pseudomonas aeruginosa* (10%). Hasil survei ini masih tidak berbeda jauh dengan hasil profil isolat bakteri di Laboratorium Mikrobiologi tahun 2002 dan Susilo (2003) dimana *K.pneumoniae* berada di urutan pertama. *K.pneumoniae* juga berada di urutan pertama di RS.persahabatan Jakarta (Soepandi 1997, Jabang M. 1997/1998, Hadiarto M 1997, Hadiarto M 1997-1998), dan berada di urutan ke dunia ditemukan oleh Hadiarto M pada tahun 2000/2001. Di Medan pada Januari-Desember 2001 *K.pneumoniae* juga menduduki urutan pertama dari 21 isolat bakteri yang ditemukan. Selain itu juga *K.pneumoniae* berada di urutan ke tiga (11,05%) setelah *E.coli* dan *P.mirabilis* pada profil isolat bakteri yang berasal dari tinja penderita yang dirawat di RSSA Malang 1994-1998.

Outer Membrane Protein (OMP) merupakan salah satu lapisan dinding sel yang merupakan salah satu bagian dari mayor antigen yang berhubungan dengan aktivitas nonspesifik endotoksin terutama pada bakteri Gram negatif.

Penelitian eksploratif bertujuan untuk identifikasi protein *OMP* dengan berat molekulnya. Dari hasil elektroforese *OMP K.pneumoniae*, menunjukkan bahwa pada *OMP* tersebut terdiri dari beberapa fraksi protein major dan minor. Pada penelitian ini isolasi *OMP* dilakukan dengan menggunakan *n-octyl glucoside (NOG)* Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya bahwa *OMP* yang diisolasi menggunakan *NOG* memberikan pola protein yang lebih banyak terutama protein mayor bila dibandingkan dengan *OMP* yang diisolasi dengan menggunakan sarkosil atau *SDS*.

n-octyl glucoside (NOG) yang digunakan dalam penelitian ini dipilih seperti yang dilakukan Evan's. *n-octyl glucoside (NOG)* digolongkan sebagai detergen golongan anion. Kegunaan dari detergen ini adalah sebagai pelarut protein terutama protein membran sel (Nakasone, 1998). Katalog *Sigma* membagi golongan detergen ini menjadi 4 golongan, yaitu detergen anion, detergen kation, detergen *zwitterions* dan detergen non-ion.

Outer Membrane Protein K.pneumoniae yang diisolasi menggunakan *NOG* didapatkan protein mayor yang mempunyai berat molekul 20 kDa. Dari kepustakaan ternyata kapsul *K.pneumoniae* mempunyai berat molekul yang bervariasi sesuai dengan serotipnya yaitu 32 kDa, 40 kDa, 64 kDa sampai 300 kDa. Disini terdapat perbedaan yang kemungkinan disebabkan adanya perbedaan lingkungan/ *environment* yang mengakibatkan perbedaan ekspresi gen yang selanjutnya berpengaruh pada sintesa protein dan akhirnya mempengaruhi virulensi kumannya. Perbedaan bisa juga karena adanya variabilitas galur atau strain dari kuman sehingga terdapat sifat maupun protein yang berbeda.

Susilo (2003) berhasil mengisolasi protein mayor *OMP K.pneumoniae* menggunakan *NOG* 0,5% , dengan berat molekul 39,66 kDa. Maftuch (2006). pada penelitiannya terhadap *OMP Vibrio alginolyticus* untuk mengendalikan penyakit Vibriosis pada ikan Kerapu Tikus, menemukan protein HA *OMP* 42,95 kDa sebagai protein adhesin, protein imunogenik dan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin penyakit Vibriosis yang disebabkan *V.alginolyticus*. Sedangkan Sumarno (2000) menemukan protein hemaglutinin *OMP* berat molekul 37,8 kDa merupakan molekul adhesi *V.cholerae* O1 M094V.

Selanjutnya protein *OMP* dengan berat molekul 20 kDa yang didapat dilakukan uji *Western Blotting* untuk mengamati apakah protein tersebut dapat mengenali antibodi terhadap bakteri *K.pneumoniae* yang diperkirakan ada dalam sputum penderita. Uji *Western Blotting* ini diujicobakan pada 3 sampel sputum. Diasumsikan bahwa terdapat *Imunoglobulin A* yang terdapat pada sampel sputum penderita *K.pneumoniae*. Dikuatkan dengan Baratawidjaya 2004 bahwa *Immunoglobulin A* disekresi oleh sel plasma yang terdapat dalam sekresi seromukus seperti air liur, air mata, cairan rongga hidung, keringat, kolostrum , cairan sekresi paru-paru, saluran cerna serta genitourinaria.

Hasil pengujian *Western blotting* yang menunjukkan pita merah kecoklatan merupakan ikatan antigen protein *OMP* 20 kDa dengan anti bodi primer *s-IgA* yang diikat lagi dengan antibodi sekunder *anti IgA- Human* pada membrane NC (gb.4.3). Ikatan tersebut menunjukkan suatu bukti bahwa protein *OMP* 20 kDa merupakan protein imunogenik yang memberikan respons diproduksinya antibodi spesifik anti *OMP* 20 kDa *K.pneumoniae*. (Baldo et.al, 1989; Wilson, et al, 2000).

Western blotting biasanya digunakan untuk menentukan kadar relatif dari suatu protein dalam suatu campuran berbagai jenis protein atau molekul lain. Metode *western blotting* menggabungkan selektivitas elektroforesis gel dengan spesifisitas *immunoassay*, sehingga setiap jenis protein dapat dideteksi dan dianalisa dengan menggunakan metode *probe* antibodi yang sesuai. Protein-protein dalam campuran itu sebelumnya dipisahkan satu dengan yang lain dengan cara elektroforesis gel, khususnya cara *SDS-PAGE*. Posisi akhir setiap jenis protein dalam gel poliakrilamid setelah elektroforesis dihentikan sesuai dengan berat molekul masing-masing. Protein-protein yang telah dipisahkan satu dengan yang lain itu kemudian dipindahkan dari gel ke membran pendukung melalui proses kapiler (*blotting*) demikian rupa sehingga membran tersebut mendapatkan replika dari susunan makromolekul seperti yang terdapat pada gel. Posisi antigen yang dicari dapat diidentifikasi pada membran dengan mereaksikannya dengan antibodi spesifik yang bertanda atau dilabel dengan radioisotop atau enzim. Berbagai jenis membran sintetik dapat mengikat protein secara kuat sehingga dapat dimanfaatkan sebagai media transport/membran pendukung untuk *immunoassay* pada media

padat. Protein yang diikat pada membran dapat mempertahankan antigenitasnya dan dengan mudah direaksikan dengan antibodi (Kresno 2003).

Tahap akhir penelitian ini adalah penelitian uji diagnostik *OMP* untuk mendeteksi infeksi *K.pneumoniae* dengan metode *Dot blot*. *Dot blot* merupakan suatu metode yang dikembangkan pada penelitian semikuantitatif pada uji imun untuk mendeteksi antigen. Sampel yang mengandung antigen ditetaskan pada membran yang dilabel dengan antibodi. Pada cara ini tidak dilakukan pemisahan seperti pada *SDS-PAGE*. Jadi *Dot blot* hanya digunakan untuk mengetahui jenis antigen bukan berat molekul protein. Namun demikian estimasi konsentrasi antigen dapat diketahui pada blot tersebut tetapi kurang akurat karena sulit untuk dikatakan akurat terhadap warna yang timbul pada blot tersebut. Metode ini cukup baik digunakan pada uji atau *screening* dengan sampel yang cukup banyak (Rantam 2000).

Karakterisasi imunogenisitas antibodi primer dalam sputum (s-IgA) dengan *Dot blotting* memberikan hasil bahwa antigen *OMP* 20 kDa diikat oleh antibodi spesifik anti *OMP K.pneumoniae* 20 kDa, yang ditandai dengan dot coklat kemerahan pada membran *NC*. Ikatan tersebut menunjukkan bukti, pertama bahwa protein *OMP* 20 kDa merupakan protein imunogenik yang memberikan respons terhadap antibodi spesifik anti *OMP* 20 kDa. Kedua metode ini juga dapat digunakan untuk menentukan titer antibodi yang ditandai dengan ketebalan (densitas) warna dot.

Protein imunogenik adalah protein yang terutama mempunyai berat molekul antara 20.000-100.000 Da (Harlow and Lane, 1998) sedang apabila berat molekulnya kurang dari 10.000 Da, biasanya tidak bersifat imunogenik (Parslow, 1997). Sehubungan dengan hal tersebut protein *OMP* 20 kDa pada penelitian ini bisa dipertimbangkan untuk digunakan sebagai alternatif *carrier* untuk vaksinasi manusia, terutama vaksin mukosal. Keuntungan yang penting dari pengembangan vaksin mukosal adalah kecenderungan untuk menginduksi baik respons mukosal maupun sistemik. Karena pertahanan humoral spesifik diberikan oleh antibodi serum dan antibodi sekresi terutama *IgA*, maka peningkatan dan pengembangan vaksin ke depan dibutuhkan metode untuk menginduksi keduanya baik respons mukosal maupun sistemik. Kemampuan vaksin seperti itulah yang saat ini menjadi pusat perhatian pengembangan vaksin (McGhee, et al 1999).

Isabelle Raully (1999) dkk. menemukan protein baru *recombinant P40* (rP40), suatu derivat protein *Omp-A K.pneumoniae* yang bisa menginduksi respons antibodi tanpa membutuhkan *adjuvant*, rP40 adalah protein *carrier* baru yang potensial untuk digunakan sebagai suatu alternatif *carrier* untuk vaksinasi pada manusia (Haeuw, et.al. 1998).

Pada penelitian ini dicoba mengupayakan untuk mengkuantifikasi hasil metode *dot blot* dengan bantuan *software* komputer menggunakan program *Corel Photoplain 12*. Diharapkan dengan melakukan kuantifikasi data untuk menilai hasil *dot blot* akan didapatkan hasil yang lebih akurat tentang hasil metode tersebut.

Hasil dari metode *dot blot* kemudian diukur tebal tipisnya warna dengan menggunakan program *Corel Photo Pain-12*. Dari program tersebut didapat data berupa nilai *mean*, standard deviasi, *median* dan *pixel*. Selanjutnya dibuat tabel yang berisi hubungan antara keempat parameter tersebut dengan masing-masing sampel sputum. Dari keempat parameter tersebut dipakai salah satu parameter saja yakni *mean* untuk menghitung sensitivitas dan spesifitas metode tersebut. Dari hasil tersebut terlihat bahwa semakin rendah angka *mean*nya semakin tebal dot yang didapatkan sedang semakin tinggi angka *mean*nya maka semakin tipis dot yang didapatkan. Dari hasil perhitungan sensitivitas dan spesifitas metode *dot blot* menggunakan tabel *Mc Nemar* terlihat bahwa *cut off* 124,91 didapatkan hasil sensitivitas sebesar 83,33 % spesifitas sebesar 87,75 %.

Untuk memilih *cut off* mana yang terbaik maka harus diperhatikan tujuan dilakukannya uji diagnostik. Menurut Puspongoro (1995) apabila uji diagnostik bertujuan untuk *screening* penyakit maka diperlukan uji diagnostik dengan sensitivitas yang tinggi namun spesifitasnya tidak terlalu tinggi. Hal ini dimungkinkan bila uji diagnostik bertujuan untuk keperluan *screening* setelah dilakukan uji diagnostik maka harus dilakukan pemeriksaan selanjutnya. Namun bila tujuan ini untuk menyingkirkan kelainan maka diperlukan uji diagnostik dengan spesifitas yang tinggi untuk menghindarkan subyek yang tidak sakit dilakukan prosedur diagnostik dan terapi selanjutnya yang mungkin memerlukan biaya yang mahal.

Penelitian ini bertujuan untuk menegakkan diagnostik maka diperlukan uji diagnostik dengan spesifitas yang tinggi walaupun sensitivitasnya tidak terlalu tinggi. *Cut off mean* yang cocok untuk keperluan tersebut adalah *cut off mean* 116,79 dengan spesivisitas 88,77%. Sedangkan apabila bertujuan untuk *screening* maka *cut off mean* 156,81 dengan sensitifitas 91,66%, NPP 30,35% dan NPN 98,64%. Pada perhitungan menggunakan *soft ware* SPSS dan kurva ROC didapatkan hasil yang hampir sama yaitu untuk tujuan diagnosa bisa digunakan *cut off* 115,69 spesifitasnya 89,8%. Untuk *sreening* menggunakan *cut off* 156,65 dengan sensitifitas 83,3%. Mengingat hasil nilai prediksi positifnya kecil dan nilai prediksi negatifnya besar maka hasil ini sementara hanya bisa digunakan untuk mengetahui bahwa penderita tersebut kemungkinan besar tidak terinfeksi *K.pneumoniae* (dengan prediksi tidak terkena infeksi 98,64%).

Sebagai bahan perbandingan perlu kiranya hasil sensitivitas dan spesifitas metode *dot blot* pada penelitian ini dibandingkan dengan penelitian-penelitian sejenis diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Gill Mearns, et al (1988) tentang metode *Dot blot* untuk mendeteksi infeksi *Chlamydia trachomatis* dibandingkan dengan kultur didapatkan spesifitas 97%, NPP 81,5% dan NPN 99%. Cabrera, et al. (1999) tentang metode *Dot blot* untuk mendeteksi *antibody antidiacyltrehalose*

pada pasien TBC. Pada penelitian ini didapatkan hasil metode *dot blot* memiliki sensitivitas 50 % dan spesifitas sebesar 97,14 %. Disamping itu penelitian yang dilakukan oleh Sugiri (2004) tentang analisa IgG serum penderita TBC terhadap antigen 52 kDa *Micobacterium tuberculosis* menggunakan metode *Dot blot* didapatkan hasil sensitivitas 33,33 %, spesifitas 56,18%, nilai prediksi positif 32,76 dan nilai prediksi negatif 45,08 %. Sedangkan penelitian Kurniawan (2005) tentang sensitivitas dan spesifitas metode *dot blot* menggunakan *adhesion OMP* 25,8 kDa *Pseudomonas aeruginosa* untuk mendeteksi infeksi saluran kencing, didapatkan sensitivitas 85,7 % dan spesifitas 100%

Hasil di atas sesuai dengan Sumarno, dkk, (2004), yang berhasil menggunakan protein antigen imunogenik sub unit pili 48 kDa *S.typhi* terhadap pemeriksaan kadar IgG penderita demam thypoid dengan metode *Dot blotting* terhadap 123 sampel darah penderita mendapatkan angka sensitivitas 94% dan spesifitasnya 87% dibandingkan dengan baku emas kultur.

Penelitian ini memiliki beberapa kelemahan diantaranya adalah hasil *dot blot* dengan menggunakan sampel sputum penderita dengan hasil kultur positif *K.pneumonia* dengan sampel sputum kultur bukan *K.pneumoniae* hasil *dot blot* nya menampilkan warna yang sama atau hampir sama gelapnya. Hal ini membuat hasil *Dot blot* sulit untuk dinilai secara kualitatif karena semuanya memberikan hasil dot. Hasil seperti ini memberikan dampak tidak dapat secara langsung dilakukan di lapangan dan masih memerlukan peran komputer untuk menginterpretasikannya.

Hasil *Dot blot* dari sampel sputum yang masih memberikan kesan dot diperkirakan terjadi oleh karena pada saat melakukan pencucian antibodi primer masih ada sisa yang menyebabkan masih terdapatnya antibodi primer sehingga memberikan hasil dot tipis. Kemungkinan terdapatnya *crossing reaction* pada antibodi diantara bakteri yang tergolong batang gram negatif serta kemungkinan pada sputum penderita yang negatif kultur didalamnya juga terdapat antibodi terhadap bakteri *K.pneumoniae* yang mungkin pernah menjangkiti penderita tersebut. Sedangkan kemungkinan yang lain adalah:

- Jumlah bakteri dalam sputum sangat sedikit sehingga tidak terdeteksi saat pemeriksaan di bawah mikroskop.
- Sputum yang dalam kultur negatif tetapi hasil *Dot blot* positif mungkin disebabkan bakteri *K.pneumoniae* dalam sputum jumlahnya sedikit, pada waktu dalam perbenihan tidak tumbuh karena didominasi oleh bakteri lain atau jamur yang dapat membunuh bakteri *K.pneumoniae*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan atas hasil yang diperoleh dari penelitian ini yang telah ditelaah dalam pembahasan maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Bobot molekul protein spesifik dari *OMP* bakteri *K.pneumoniae* yang dapat direspon oleh *s-IgA* sputum penderita adalah 20 kDa
2. Dengan pemeriksaan *Dot blot* dan berdasarkan baku emas kultur sputum pada 110 sampel sputum didapatkan bahwa antigen 20 kDa *K.pneumoniae* mampu merespons imun humoral *s-IgA* yang terdapat pada sputum untuk perangkat diagnosa *K.pneumoniae* pada *cut off mean* 124,91 dengan nilai sensitivitas 83.33 % spesifitas 87.75 %

Saran

Diharapkan adanya inovasi baru sehingga metode ini dapat dilakukan pada bakteri-bakteri serta pada penyakit-penyakit yang lain. Selain itu diharapkan adanya perbaikan dalam metode pengerjaan sehingga dapat lebih cepat, lebih mudah dilakukan serta mudah diinterpretasikan tanpa bantuan perangkat komputer. Diharapkan dikembangkan metode untuk interpretasi hasil *Dot blot* tanpa bantuan perangkat komputer dengan hasil sensitivitas dan spesifitas yang setara dengan hasil yang diinterpretasikan oleh komputer. Sehingga diharapkan di masa-masa mendatang dapat dikembangkan metode yang dapat dipakai secara langsung di lapangan. Diharapkan untuk penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan spesifitas dengan menggunakan teknologi monoklonal antibodi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. W.B. Saunders Company: 2000.p.331-3.
2. Baldo, Tovey, St. Leonard. Protein Blotting Methodology, Research and Diagnostics Applications, KARGER, Switzerland. 1989.
3. Baratawidjaya GK. Antigen-Antibodi. Imunologi Dasar. Edisi VI, cetakan I, Jakarta. Balai Penerbit FKUI;2004.p.73-90.
4. Beveridge, Terry J. Structure of Gram Negative Cell Wall and their Derived Membrane Vesicles. J.Bacteriol 1999; 8: 4725-33.

5. Burgener AF, Korman M. Pulmonary Cavitary and Cystic Lesions. In Differential Diagnosis in Chest X-Rays. 2nd. Stuttgart ; New York: Thieme; 1999.
6. Cabrera LV, Rendon A, Rodriguez, Handzel V. Dot blot Assay for Detection of Anti-diacyltrehalose Antibodies in Tuberculosis patients. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology J. 1999; 6 (5): 686-9.
7. Clement WF, Campbell GD. Preservation of Pulmonary Function by an Outer membrane Protein F Vaccine. A Study in Rats With Chronic Pulmonary Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 1994 ;105:1545-50.
8. Ehara M, Ishibashi M, Ichinose Y, Iwanaga M, Shimotori S, Naito T. Purification and Partial Characterization of Fimbriae of *Vibrio cholerae* O1: Vaccine 1984; 5:283-8.
9. Evan DG, Evan DJ, Moulds JJ, Graham DY. n-acetylnewraminyllactose-Binding Fibrillar Hemagglutinin of *Compybacter Pylori*: a Putative Colonization Factor Antigen. Infection and Immunity 1988; 56: 2896-960.
10. Haeuw Jean-Francois, Raully Isabelle, Zanna Laurence, et al. 1998. The recombinant *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugate antigenic peptides. Eur.J.Biochem. 255, p 446-454
11. Harlow E, Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.
12. Jong GM, Hsive TR, Chen GR, Chang H, Chen C. Rapidly Fatal Outcome of Bacteremic *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia in Alcoholics. Chest 1995;107: 214-7.
13. Kiska K. Relationships among Capsular Structure, Phagocytosis, and Mouse Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity 1995;3: 847-52.
14. Kresno BS. Unsur-unsur yang berperan dalam reaksi imunologi. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi ke-IV cetakan ke-2. Jakarta; FKUI:2000.p.44-81
15. Kurniawan A. Sensitifitas & Spesifitas Metode Dot Blot Menggunakan Adhesin Outer Membrane protein (OMP) 25,8 kDa *Pseudomonas aeruginosa* untuk deteksi Infeksi Saluran Kencing. TESIS. 2005.
16. Laemli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970: 680-6.
17. Maftuch. OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP) *Vibrio alginolyticus* Sebagai vaksin untuk mengendalikan Penyakit Vibriosis yang disebabkan *V.alginolyticus* pada ikan Kerapu Tikus di perairan. Disertasi. 2006
18. Margono. Pemilihan Antibiotika pada Febrile Netropenia. Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan VIII Ilmu Penyakit Paru. 2006.p.21-5.
19. Mc.Gee JR, Lam ME, Strober W. Mucosal Immune Responses: An Overview, in Ogra PL et al. (Eds), manual Immunology ;USA; 2nd Academic Press:1999.p.485-506.
20. Mearns G, Rachmond JS, Story CC. Sensitive Immune Dot Blot Test for diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections. Journal of Clinical Microbiology 1988;26:1810-3.
21. Nakasone N, Iwanaga M. Characterization of Outer Membrane Protein OmpU of *Vibrio Cholerae*, O1. Infecty and Immun 1998;60:4726-8.
22. Paganin F, Lilienthal F, et al. Severe Community-acquired pneumonia: Assessment of microbial aetiology as mortality factor. Eur Respir J 2004; 24: 779-785.
23. Parslow TG. Immunogens, Antigens and Vaccins. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, Medical Immunology, 9th ed. ; USA: Applenton & Lange; 1998.p.74-82.
24. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Pneumonia Komuniti. Pedoman Diagnosis & Penatalaksanaan Di Indonesia. Jakarta. PDPI:2003.p.31-5.
25. Pichavant Murial. Outer Membrane Protein A from *Klebsiella pneumoniae* activates Bronchial Epithelial Cells: Implication in neutrophil recruitment.
26. Pillete C, Ouadrhiri Y. Lung Mucosal Immunity: Immunoglobulin-A revisited. Series "Lung Infection and Lung Immunity". Eur respire J 2001;18: 571-88.
27. Pillete C, Durham RS. Mucosal Immunity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A role of Immunoglobulin A ?. Proc Am Thorac Sec 2004;1:125-35,
28. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. As Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing methods, and Pathogenicity Factors. Clinical microbiology Reviews 1998;10:589-603.
29. Rantam AF. Metode Imunologi. Cetakan I. Surabaya; Airlangga University Press:2003.p.79-101.
30. Raully I, Goetsch L, Haeuw FJ, Tardieux C, Baussant, Bonnefoy J, et.al. Carrier properties of a protein Derived from Outer Membrane Protein A of *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity 1999;11:5547-51
31. Struthers JK, Weatran PR. Structure and Function of Bacteria. Clinical Bacteriology 2003:9-48.
32. Sugiri. Analisa Immunoglobulin G (IgG) Serum Penderita Tuberkulosis Paru terhadap Antigen 52 kDa *Micobacterium tuberculosis* Menggunakan Metode ELISA INDIRECT (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) dan DOT BLOTTING. Tugas Akhir. 2004.
33. Sumarno. Karakteristik Molekuler Protein Adhesi *V.cholera* O1 M094V dan protein reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus putih (Wistar). Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. 2000
34. Susilo. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* Pada sputum dengan metode Imunositokimia Menggunakan Anti Outer Membrane protein *Klebsiella pneumoniae* sebagai antibodi. Tugas Akhir. 2003

35. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J, Electrophoretic Transfer of Protein From Polyacrilamid Gels To Nitrocellulose Sheets. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1979;76: 4350-4.
36. Umeh O. *Klebsiella Infections*. E-medicine 2002
37. Wilson K, Walker J. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge University Press. 2000
38. Yoshida K, Role of Bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *Bacterial Pathogenicity. J.Med.Microbiol* 2000;49: 1003-10.