

PENGEMBANGAN VAKSIN MYIASIS: DETEKSI *IN VITRO* RESPON KEKEBALAN PROTEKTIF ANTIGEN PROTEIN *PERITROPHIC MEMBRANE*, PELET DAN SUPERNATAN LARVA L₁ LALAT *CHRYSOMYA BEZZIANA* PADA DOMBA

SUKARSIH¹, S. PARTOUTOMO¹, E. SATRIA¹, C. H. EISEMANN², dan P. WILLADSEN²

¹ Balai Penelitian Veteriner,
Jalan R. E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

² CSIRO Division of Tropical Animal Production,
Long Pocket Laboratories, 120 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australia

(Diterima dewan redaksi 14 Juni 1999)

ABSTRACT

SUKARSIH, S. PARTOUTOMO, E. SATRIA, C. H. EISEMANN, and P. WILLADSEN. 1999. Development of myiasis vaccine: *In vitro* detection of immunoprotective responses of peritrophic membrane protein, first instar larva L₁ supernatant and pellet antigen of fly *Chrysomya bezziana* in sheep. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(3) : 202-208.

Myiasis control by means of individual treatment of animals which are mainly raised extensively is time consumed and expensive. The alternative way to control this disease by vaccination is considered effective and economically accepted. However the expected vaccine is now still being developed under a collaborative project between CSIRO, Inter-University Centre on Biotechnology-ITB and Research Institute for Veterinary Science and funded by ACIAR. There are several antigens have been identified as vaccine candidates and an *in vitro* bioassay technique has been developed for assessing the immunoresponses of vaccine in sheep. Three antigens were used for vaccines in this study, these included protein peritrophic membrane (PM), soluble extract (SE) and pellet extract (PE) of 1st instar larvae of *Chrysomya bezziana*. Twenty four experimental sheep were divided into 4 groups of 6 animals, 3 groups of animals were injected with PM, SE and PE vaccines with the dose rate of 0.5 g PM/head, 0.8 g PE/head and 4.2 ml LE/head respectively, and the other one group was injected with 4 ml PBS/head as a control group. Vaccination with the same dose was repeated 4 weeks after the 1st vaccination as a booster, and 2 weeks after the booster the sheep were challenged with live larvae, 3 days after challenge animals were killed. Sera were collected at the day of vaccination, 4 weeks after vaccination, 2 weeks after booster, and 3 days after challenge. An *in vitro* bioassay technique was conducted by culturing 1st instar larvae on five media containing sera collected from each experimental animal. The effects of sera on cultivated larvae were assessed by means of larval weight and larval mortality rate. The results indicated that the growth rate and survival of cultivated larvae in media containing anti-PM sera were significantly lower ($P < 0.01$) compared to the larvae cultivated on media with sera on the day of vaccination. The larval weight depression by anti-PM sera collected at 3 days after challenge was 65% of that larvae cultivated on media with sera collected on the day of vaccination. Anti-PM sera depressed the growth rate and survival of larvae significantly greater ($P < 0.05$) than that of anti-PE or anti-LE sera. It is concluded that PM has the best immunoresponses and as the candidate of choice for myiasis vaccine.

Key words : *In vitro* bioassay, myiasis, immunoresponses, *Chrysomya bezziana*

ABSTRAK

SUKARSIH, S. PARTOUTOMO, E. SATRIA, C. H. EISEMANN, dan P. WILLADSEN. 1999. Pengembangan vaksin myiasis : Deteksi *in vitro* respon kekebalan protektif antigen protein *peritrophic membrane*, pelet dan supernatan ekstrak larva L₁ lalat *Chrysomya bezziana* pada domba. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(3): 202-208.

Pengendalian penyakit myiasis dengan pengobatan ternak secara individual, terutama pada ternak yang dipelihara secara ekstensif, memakan banyak waktu dan mahal. Sementara itu, untuk pengendalian penyakit ini dengan cara vaksinasi merupakan teknologi alternatif yang dianggap paling murah. Akan tetapi, vaksin untuk penyakit ini masih dalam pengembangan melalui kerjasama penelitian antara CSIRO, Pusat Antar Universitas-Institut Teknologi Bandung (PAU-ITB) dan Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) dengan dana dari ACIAR. Tiga jenis antigen *protein peritrophic membrane* (PM), larutan ekstrak (LE), dan ekstrak pelet (EP) larva *Chrysomya bezziana* stadium pertama (L₁) dipakai sebagai vaksin atau imunogen dalam penelitian ini. Antigen PM, LE dan EP masing-masing diemulsikan dalam ajuvan Montanide ISA-70 dengan menggunakan *blender* Virtis. Masing-masing vaksin disuntikkan pada 6 ekor domba dengan dosis 0,5 g/ekor untuk PM, 0,8 g/ekor untuk EP, dan 4,2 ml untuk

LE. Enam ekor domba lagi masing-masing disuntik dengan 4 ml PBS sebagai kontrol. Empat minggu sesudah suntikan vaksin pertama *dibooster* dengan dosis yang sama, 2 minggu sesudah *booster* ditantang dengan menginfeksi larva hidup pada semua domba percobaan. Darah diambil pada hari vaksinasi, 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang. Hewan dibunuh 3 hari sesudah ditantang. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan di dalam *freezer* (-20°C) sampai digunakan. Uji *in vitro bioassay* dilakukan dengan cara mengkultur larva dalam medium yang telah ditambah dengan serum domba percobaan, masing-masing serum untuk lima tabung medium sebagai ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bobot larva yang dikultur pada medium dengan serum anti-PM 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster*, dan 3 hari sesudah ditantang lebih rendah secara nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan bobot larva pada medium dengan serum yang diambil waktu vaksinasi (kontrol). Terdapat penurunan bobot larva yang konsisten pada medium dengan serum anti-PM 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang. Bobot larva pada serum 3 hari sesudah ditantang mendapat hambatan pertumbuhan sebesar 65% dibandingkan dengan larva pada medium dengan serum yang diambil waktu vaksinasi. Bobot larva pada medium dengan serum anti-LE dan anti-EP hanya lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) pada serum 2 minggu sesudah *booster* dibandingkan dengan larva yang dikultur pada medium dengan serum waktu vaksinasi. Jumlah larva hidup pada medium dengan serum anti-PM 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan larva pada medium dengan serum waktu vaksinasi, sedangkan jumlah larva hidup pada medium dengan serum anti-EP dan anti-LE hanya berbeda nyata dengan serum yang diambil waktu vaksinasi pada 2 minggu sesudah *booster*. Serum anti-PM dapat menekan daya hidup dan pertumbuhan larva jauh lebih baik dibandingkan dengan vaksin EP dan LE. Dengan kata lain dapat disimpulkan bahwa antigen PM mempunyai daya proteksi terbaik secara *in vitro* dan dapat dijadikan kandidat untuk pembuatan vaksin myiasis.

Kata kunci : *In vitro bioassay*, myiasis, respon kekebalan, *Chrysomya bezziana*

PENDAHULUAN

Myiasis adalah infeksi larva lalat (diptera) pada jaringan hidup hewan dan manusia (ZUMPT, 1965). Di Indonesia penyebab utama myiasis adalah larva lalat *Chrysomya bezziana*. Larva ini bersifat parasit obligat sehingga mutlak diperlukan jaringan hidup untuk pertumbuhannya. Selain dari itu, ada larva dari spesies lalat lain yang dapat menyebabkan myiasis, akan tetapi sifatnya fakultatif, jenis larva lalat ini dapat hidup pada jaringan yang sudah mati maupun yang masih hidup, contoh jenis lalat ini ialah *Musca domestica*, *Fannia* sp., *Sarcophaga* sp. Siklus hidup *C. bezziana* melalui 3 tahap, yaitu larva instar₁, larva instar₂, dan larva instar₃, ketiga tahap perkembangan larva tersebut diperlukan waktu 6 sampai 7 hari. Dari larva instar₁ sampai dengan larva instar₃ selanjutnya akan tumbuh menjadi pupa dalam waktu 7 sampai 8 hari, kemudian menjadi lalat dewasa, yang akan bertelur setelah berumur 6-7 hari (SPRADBERY, 1991).

Kasus myiasis sering ditemukan pada bagian sekitar mata, mulut, vagina, tanduk yang dipotong, luka kastrasi dan pada pusar hewan yang baru lahir. Hewan yang menderita myiasis mengalami penurunan bobot badan, pertumbuhan terganggu dan bisa pula berakibat anemia (SPRADBERY, 1991). Myiasis dapat ditemukan di daerah tropis dan subtropis, seperti di daerah Asia Tenggara yang meliputi Taiwan hingga Irian (NORRIS dan MURRAY, 1964). Kejadian myiasis di Indonesia sudah dilaporkan oleh SUKARSIH *et al.* (1989), SIGIT dan PARTOUTOMO (1981).

Upaya pemberantasan myiasis yang sudah dilakukan adalah dengan membuat lalat jantan steril dengan radiasi dan kemudian disebar di lapangan, sehingga lalat betina yang dikawininya menghasilkan

telur yang tidak dapat berkembang (SPRADBERY *et al.*, 1983). Teknik ini dilakukan dengan pertimbangan bahwa lalat *C. bezziana* betina hanya sekali kawin. Proses pembuatan lalat jantan steril menghabiskan biaya yang banyak, karena harus membuat koloni lalat yang akan menghasilkan pupa secara besar-besaran. Pada stadium pupa tidak dapat dipilih antara yang jantan dan yang betina, sehingga kedua jenis pupa semuanya diradiasi, kemudian untuk penyebaran di lapangan dilakukan memakai pesawat terbang. Selain pengendalian dengan pelepasan lalat jantan yang steril, upaya pengendalian dapat pula dilakukan dengan memakai insektisida (SPRADBERY *et al.*, 1991), dan pengobatan dengan memakai ivermectin dengan hasil proteksi selama 14 hari (SPRADBERY *et al.*, 1985), cara tersebut membutuhkan dana yang cukup besar. Pengendalian myiasis dengan cara yang praktis perlu dipelajari terutama untuk peternakan yang berskala besar (BASSET dan KADIR, 1982). Untuk ini CSIRO, PAU-ITB bekerjasama dengan Balai Penelitian Veteriner Bogor telah merintis pembuatan vaksin myiasis. Dalam penelitian ini diharapkan dapat diisolasi dan diidentifikasi jenis antigen (protein) dari lalat atau larva myiasis yang dapat digunakan sebagai imunogen (antigen protektif), yang selanjutnya imunogen tersebut dapat dikembangkan menjadi vaksin rekombinan yang efektif. Bila vaksin rekombinan yang efektif dapat dihasilkan maka biaya produksinya akan lebih murah, sehingga harga vaksin dan biaya vaksinasi akan menjadi lebih murah dibandingkan dengan pengendalian myiasis dengan pengobatan.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini meliputi beberapa tahapan, yaitu pembuatan antigen, identifikasi antigen untuk kandidat vaksin, kemudian pembuatan serum kebal dengan jalan vaksinasi domba percobaan, uji *in vitro* respon kekebalan yang protektif dari vaksin dengan menguji sampel serum domba percobaan. Untuk tahap pertama ada tiga macam antigen yang akan dibuat vaksin, yaitu *protein peritrophic membrane* (PM), larutan ekstrak (LE) dan ekstrak pelet (EP) dari larva *C. bezziana* stadium pertama (L₁).

Kultivasi lalat untuk produksi larva

Untuk memperoleh PM dalam jumlah yang cukup dan berkelanjutan selama penelitian diperlukan kultur lalat yang stabil. Untuk itu telah dikultur lalat *C. bezziana* di Balitvet yang berasal dari domba jenis Merino yang terinfeksi myiasis di kandang Balitvet di Cimanglid, pada tahun 1995. Untuk mempertahankan sifat alami lalat betina yang dikultur seperti besar dan bobot larva, pupa dan lalat dewasa, dan produksi telur yang optimal, lalat tersebut sudah dikawinkan dengan lalat liar minimal setiap 6 bulan sekali. Telur-telur yang diproduksi oleh lalat kultur dibiakkan pada medium yang terdiri atas campuran daging yang dihaluskan ditambah dengan darah sapi segar. Setelah telur tumbuh menjadi larva, medium yang dipakai terdiri atas campuran tepung darah (60 g), *skim milk* (30 g), tepung telur (30 g), *waterlock/gel* (12 g) dan air suling (860 ml), sedikit formalin (1 ml) ditambahkan untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Setelah 5-6 hari larva akan berubah menjadi pupa dan ditaruh pada medium *vermiculat*.

Pembuatan protein *peritrophic membrane* (PM)

Teknik produksi PM yang digunakan adalah teknik yang digunakan untuk produksi PM untuk lalat *Lucilia cuprina* (EAST *et al.*, 1993) dengan sedikit modifikasi sebagai berikut: Larva dikultur pada medium untuk larva yang steril, semua larutan dan peralatan dipersiapkan dalam kondisi steril, sedangkan perlakuan lain secara aseptis dilakukan dalam *laminar flow*. Bahan medium untuk larva adalah 15 g ekstrak *yeast* dilarutkan dalam 450 ml air suling yang disterilkan, kemudian ditambah 150 mg gentamisin sulfat yang sudah dilarutkan dalam 3 ml air suling steril, dan akhirnya ditambah 300 ml *newly borne calf serum*. Campuran bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam kotak plastik tahan panas dengan ukuran 8 liter. Kultur larva dimulai dengan menumbuhkan telur dari lalat yang telah dikultur sebanyak 175 g setiap kotak. Dalam kotak yang berisi medium tersebut ditaruh 4 lembar spons tipis untuk menaruh telur agar tidak terendam di dalam medium. Untuk menjaga agar telur berada dalam keadaan steril, sebelum dimasukkan ke

dalam medium telur dicuci terlebih dahulu dengan 1% natrium hipoklorida beberapa detik. Kotak plastik kemudian ditutup, diberi saluran pipa yang dilengkapi dengan filter (0,22 μ .) dan dihubungkan dengan aerator. Kotak yang berisi medium dan telur lalat kemudian diletakkan dalam inkubator dengan suhu 37°C dan kelembaban 80% RH selama 4 hari.

Ekstraksi PM

Semua tahapan dalam ekstraksi PM dilakukan dalam kondisi steril dalam kabinet *laminar flow*. Larva yang tumbuh dalam kotak plastik (lihat pada pembuatan PM) dicuci di atas saringan dengan air suling steril sampai 3 kali. Larva kemudian dipindahkan ke dalam tabung Erlenmeyer (ukuran 3 liter) berisi PBS (150 ml), EDTA (252 mg), bensamidin (58,5 mg) dan gentamisin sulfat (25 mg) yang terlebih dahulu dilarutkan dalam 0,5 ml air suling. Erlenmeyer ditutup dengan karet namun dihubungkan dengan pipa yang dilengkapi dengan filter (0,22 μ), kemudian disambung ke *aerator*. Erlenmeyer tersebut disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C dan kelembaban 80% RH selama 24 jam.

Koleksi PM

Untuk koleksi PM tidak diperlukan kondisi yang steril. Semua larutan dalam Erlenmeyer beserta larvanya disaring dan hasil saringan dituangkan dalam gelas piala. Erlenmeyer dibilas dengan menambahkan PBS, EDTA dan bensamidin (lihat pada ekstraksi PM) sampai bersih dan hasil bilasan dimasukkan ke dalam gelas piala. Larutan dalam gelas piala dituangkan ke dalam botol sentrifuse bervolume 250 ml dan ditutup rapat. Botol sentrifuse diputar dengan kecepatan 6.000 RPM selama 20 menit. Larutan bagian atas dipisahkan dengan hati-hati dan dibuang, sedangkan endapan merupakan PM yang kemudian disimpan dalam *freezer* (-70°C) sampai proses berikutnya.

Pembuatan vaksin PM dalam ajuvan Montanide ISA-70

Untuk vaksinasi 6 ekor domba dengan dosis 0,5 g PM/ekor diperlukan sebanyak 3 g PM. Tiga gram PM dilarutkan ke dalam 9 ml PBS pH 7,3 atau kira-kira dengan perbandingan 1 bagian PM dan 3 bagian PBS. Larutan PM disimpan dalam sebuah *mixing flask* dan ditambah dengan 40.000 i.u. prokain penisilin G dan 50 mg streptomisin. Dengan menggunakan sebuah *blender* Virtis larutan PM dihomogenkan dengan memutar *blender* pada kecepatan rendah selama 2 menit, dan homogenat yang diperoleh sementara disimpan dalam keadaan dingin. Selanjutnya pada *blender* dipasang lagi *mixing flask* yang lain dan diisi 28 ml ajuvan Montanide ISA-70, lalu *blender* diputar dengan

kecepatan rendah. Dengan menggunakan alat suntik 10 ml dan jarum suntik No. 23 homogenat PM disemprotkan ke dalam ajuvan yang sedang diputar pada *blender* sedikit demi sedikit. Setelah semua homogenat masuk ke dalam *mixing flask* yang sedang diputar, kecepatan *blender* dinaikkan sampai kecepatan medium untuk selama kira-kira 2 menit atau sampai terbentuk suatu emulsi yang bagus.

Pembuatan vaksin larutan ekstrak larva L₁ (LE) dan ekstrak pelet larva L₁ (EP)

Untuk vaksinasi 6 ekor domba dengan LE dan 6 ekor dengan EP dengan dosis sebanyak 2,5 g L₁/ekor diperlukan sebanyak 2,5 g x 6 = 15 g L₁, ditambah dengan 45 ml PBS pH 7,3 (1 bagian L₁ dan 3 bagian PBS), kemudian L₁ dihancurkan dengan memutar di dalam *blender* Virtis pada kecepatan sedang, selama 3x5 menit, setelah itu disonikasi dalam *sonifer Branson* dengan 80 amplitudo selama 2 x 20 detik. Larutan L₁ kemudian disentrifuse dalam sentrifuse biasa dengan kecepatan 1.000 RPM selama 3 x 15 menit pada kondisi dingin. Setelah itu, cairan bagian atas diambil dan dipindahkan ke dalam tabung konikel dan diputar pada kecepatan 14.000 RPM selama 15 menit, sesudah sentrifugasi supernatan dipisahkan sebagai larutan ekstrak (LE) dan endapan sebagai ekstrak pelet (EP).

Pembuatan vaksin EP

Dari hasil sentrifugasi diperoleh endapan EP sebesar 4,75 g, kemudian ditambah 14,25 ml PBS pH 7,3 (1 bagian EP ditambah 3 bagian PBS), kemudian ditambah 40.000 i.u. prokain penisilin G dan 50 mg streptomisin. Selanjutnya campuran diputar dalam *blender* Virtis dengan kecepatan rendah sampai homogen (homogenat), homogenat kemudian diemulsikan dengan ajuvan Montanide ISA70 dengan perbandingan 3 bagian larutan EP dan 7 bagian ajuvan dengan cara seperti pada pembuatan vaksin PM. Akhirnya vaksin dibagi menjadi 6 dosis untuk 6 ekor domba atau sama dengan 6,7 ml/ekor yang mengandung EP sebesar 0,8 g/ekor.

Pembuatan vaksin LE

Larutan supernatan LE sebanyak 50 ml terlalu banyak untuk 6 ekor domba sehingga larutan supernatan yang digunakan untuk membuat vaksin LE hanya separuhnya saja atau 25 ml. Larutan sebanyak 25 ml tersebut ditambah 40.000 i.u. prokain penisilin G dan 50 mg streptomisin, kemudian diemulsikan dengan 25 ml ajuvan Montanide ISA-70 seperti pada pembuatan vaksin PM. Vaksin akhirnya dibagi menjadi 6 dosis untuk 6 ekor domba atau sama dengan 8,3 ml/ekor yang mengandung 4,2 ml larutan

supernatan/ekor.

Pembuatan serum anti-PM, anti-EP dan anti-LE

Sebanyak 24 ekor domba percobaan yang dibagi menjadi 4 grup, masing-masing grup divaksinasi dengan vaksin PM, LE, dan EP yang telah disiapkan di atas, satu grup lagi disuntik dengan air suling dalam ajuvan Montanide ISA-70 sebagai kontrol. Masing-masing vaksin disuntikkan secara subkutan dengan dosis untuk vaksin PM = 5,8 ml/ekor atau 0,5 g PM /ekor, vaksin EP = 6,7 ml/ekor atau mengandung EP 0,8 g/ekor, vaksin LE = 8,3 ml/ekor yang mengandung 4,2 ml larutan ekstrak dan vaksin PBS = 6,7 ml/ekor yang mengandung 4 ml PBS/ekor. Vaksinasi diulang atau *booster* dengan dosis yang sama 4 minggu sesudah injeksi vaksin pertama, 2 minggu sesudah *booster* domba ditantang dengan menginfeksi larva L₁ hidup pada kulit yang telah dilukai. Darah diambil sebelum domba divaksinasi, 4 minggu setelah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster*, dan 3 hari sesudah uji tantang. Serum dipisahkan dan selanjutnya disimpan dalam *freezer* (-20°C) sampai digunakan. Domba dipotong 3 hari sesudah ditantang.

In vitro bioassay/respon kekebalan serum in vitro terhadap larva

Uji *in vitro bioassay* dilakukan dengan menggunakan medium seperti untuk larva *Lucilia cuprina* (EISEMANN *et al.*, 1990) dengan sedikit modifikasi. Medium dibuat dengan cara mendidihkan 50 ml air suling, kemudian ditambah 4% agar Nobel sambil diaduk, setelah didinginkan sampai 50°C ditambah dengan 8% ekstrak *yeast* dan 0,8 mg gentamisin sulfat. Selanjutnya, medium disimpan dalam penangas ini dengan suhu 40°C. Serum yang akan diuji sebanyak 5 ml/sampel dipanaskan dalam penangas ini dengan suhu yang sama dengan suhu pada medium, kemudian sebanyak 1,65 ml medium yang sedang dipanaskan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung serum sambil terus diaduk sampai homogen. Akhirnya campuran serum dan medium dipindahkan ke dalam 5 buah tabung plastik yang telah disiapkan. Medium yang mengandung serum di dalam tabung plastik dibiarkan sampai dingin, dan setelah dingin pada bagian permukaan medium dibuat goresan-goresan untuk memudahkan larva masuk ke dalam medium. Untuk masing-masing tabung plastik ditumbuhkan 10 larva yang baru menetas dengan cara meletakkan larva di atas potongan spons kecil dan tipis yang dibasahi dengan posisi permukaan spons yang ada larvanya ditempelkan pada medium. Tabung plastik ditutup dengan kain kasa dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C dan kelembaban 80% RH selama 30 jam. Setelah 30 jam,

larva dari setiap tabung dicuci dengan air suling untuk menghilangkan medium yang menempel, kemudian dikeringkan pada kertas saring, selanjutnya larva yang hidup dihitung dan ditimbang, sedangkan yang mati dihitung tetapi tidak ditimbang.

Uji statistik

Bobot dan daya tahan hidup larva dari setiap perlakuan dianalisis dengan sidik ragam dengan teknik Anova, sedangkan untuk beda nyata antara nilai tengah digunakan uji Tukey dari program Statistix (NH Analytical Software, 1958 Eldridge Avenue, Roseville MN 55113).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semua larva *C. bezziana* yang dikultur pada medium dengan serum anti-PM, anti-LE dan anti-EP tidak mengalami kerusakan fisik, seperti halnya pada larva *L. cuprina* yang dikultur pada medium dengan serum anti-PM (EAST *et al.*, 1993), sedangkan perubahan bobot larva rata-rata setiap pengamatan disajikan pada Tabel 1.

Bobot rata-rata larva yang dikultur pada medium dengan serum anti-PM 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang masing-masing adalah $1,8 \pm 0,69$, $1,1 \pm 0,43$ dan $0,8 \pm 0,43$ mg yang lebih rendah secara nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan bobot larva rata-rata yang

dikultur pada medium dengan serum domba yang diambil waktu vaksinasi ($3,0 \pm 0,32$).

Pertambahan bobot larva yang dikultur pada medium dengan serum yang mengandung antibodi (anti-PM) umumnya lebih rendah daripada pertambahan bobot larva yang dikultur pada medium dengan serum domba waktu divaksinasi (serum domba normal). Apabila kekurangan pertambahan bobot larva tersebut dibandingkan dengan pertambahan bobot larva yang dikultur pada medium dengan serum domba waktu vaksinasi, maka akan diperoleh persentase tingkat hambatan pertumbuhan, sehingga tingkat hambatan pertumbuhan larva pada medium yang mengandung serum anti-PM 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang masing-masing adalah 30,8%, 50% dan 65%. Hambatan pertumbuhan ini terjadi karena adanya antibodi anti-larva di dalam serum yang konsentrasinya makin bertambah tinggi dengan adanya *booster*. Hasil ini mendukung laporan yang menyatakan bahwa di dalam serum yang mengandung antibodi terhadap antigen PM, pertumbuhan larva terhambat sehingga mengalami kekerdilan yang nyata (EISEMANN *et al.*, 1990). Hambatan pertumbuhan sebesar 65% pada myiasis ini lebih baik dibandingkan dengan hambatan pertumbuhan larva *L. cuprina* yang dikultur pada media yang mengandung serum anti-PM sebesar 55%. Serum anti-PM pada *L. cuprina* berasal dari domba yang divaksinasi dengan antigen PM yang difraksinasi dengan 4M-UREA (EAST *et al.*, 1993).

Tabel 1. Bobot dan persentase hambatan pertumbuhan (*) larva *C. bezziana* pada uji *in vitro* bioassay menggunakan serum waktu vaksinasi, 4 minggu sesudah vaksinasi pertama, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang

Serum domba yang divaksin	Bobot larva rata-rata (mg) dengan perlakuan serum domba			
	Sebelum vaksinasi	4 minggu sesudah vaksinasi	2 minggu sesudah <i>booster</i>	3 hari sesudah ditantang dengan larva L ₁
Anti-PM	$3,0 \pm 0,32$ Aa	$1,8 \pm 0,69$ Ba (30,8)*	$1,1 \pm 0,43$ Ca (50,0)	$0,8 \pm 0,43$ Ca (65,0)
Anti-LE	$2,3 \pm 0,31$ Aa	$1,8 \pm 0,38$ Aa (30,8)	$1,4 \pm 0,23$ Ba (36,4)	$1,9 \pm 0,48$ Ab (17,4)
Anti-EP	$2,2 \pm 0,37$ Aa	$2,0 \pm 0,60$ Aa (23,1)	$1,4 \pm 0,35$ Ba (36,4)	$2,0 \pm 0,48$ Ab (13,0)
Kontrol	$2,8 \pm 0,60$ Aa	$2,6 \pm 0,29$ Aa	$2,2 \pm 0,36$ Aa	$2,3 \pm 0,29$ Ab

Keterangan :

Huruf kecil pada kolom dan huruf kapital pada lajur yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata

Bobot rata-rata larva yang dikultur pada medium dengan serum anti-LE 4 minggu sesudah vaksinasi, 3 hari sesudah ditantang dan waktu vaksinasi masing-masing adalah $1,8 \pm 0,38$, $1,9 \pm 0,48$ dan $2,3 \pm 0,31$ mg. Bobot rata-rata larva tersebut berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan larva yang dikultur dalam medium yang mengandung serum anti-LE 2 minggu sesudah *booster* ($1,4 \pm 0,23$). Tingkat hambatan pertumbuhan larva yang

dikultur pada medium dengan serum anti-LE 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang masing-masing adalah 30,8%, 36,4% dan 17,4%.

Bobot rata-rata larva yang dikultur pada medium dengan serum anti-EP 4 minggu sesudah vaksinasi, 3 hari sesudah ditantang dan sebelum vaksinasi masing-masing adalah $2,0 \pm 0,60$, $2,0 \pm 0,48$ dan $2,2 \pm 0,37$ mg.

Seperti halnya pada medium yang mengandung serum anti-LE, bobot rata-rata dari larva yang dikultur pada medium dengan serum anti-EP 2 minggu sesudah *di booster* lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan bobot larva rata-rata yang dikultur pada medium dengan serum anti-EP lainnya dan serum domba sebelum divaksinasi. Dalam medium yang mengandung serum anti-EP pertumbuhan larva mengalami hambatan pada serum 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang masing-masing sebesar 23,1%, 36,4% dan 13%.

Bobot rata-rata larva yang dikultur dalam semua medium yang mengandung serum kontrol tidak berbeda nyata ($P > 0,005$).

Jumlah larva hidup rata-rata pada medium dengan masing-masing anti-serum sampai selesai pengamatan dapat dilihat pada Tabel 2. Jumlah larva hidup rata-rata yang dikultur pada medium dengan serum anti-PM 4 minggu sesudah divaksinasi, 2 minggu sesudah *di booster* dan 3 hari sesudah ditantang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), dan masing-masing adalah sebesar

$5,7 \pm 1,02$, $6,1 \pm 1,26$ dan $6,0 \pm 0,97$. Angka-angka tersebut lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan jumlah larva hidup rata-rata yang dikultur dalam medium yang mengandung serum domba yang diambil waktu vaksinasi ($8,5 \pm 0,41$).

Jumlah larva hidup rata-rata yang dikultur pada medium dengan serum anti-LE 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dan masing-masing adalah $7,3 \pm 0,64$, $6,8 \pm 0,69$ dan $7,0 \pm 0,69$. Angka-angka tersebut lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan jumlah larva hidup rata-rata yang dikultur pada medium dengan serum domba yang diambil waktu vaksinasi ($8,1 \pm 0,43$).

Jumlah larva hidup rata-rata yang dikultur dalam medium dengan serum anti-EP 4 minggu sesudah vaksinasi dan 3 hari sesudah ditantang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dan masing-masing adalah $7,1 \pm 0,59$ dan $7,6 \pm 1,03$. Angka-angka tersebut lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan jumlah larva hidup rata-rata yang dikultur dalam medium yang mengandung serum anti-EP 4 minggu sesudah vaksinasi ($8,2 \pm 0,50$) dan yang mengandung serum domba yang diambil waktu vaksinasi ($8,4 \pm 0,46$).

Jumlah larva hidup rata-rata dalam semua medium yang mengandung serum kontrol tidak ada yang berbeda nyata ($P > 0,05$).

Pertambahan bobot larva rata-rata yang dikultur dalam medium yang mengandung serum anti-PM terutama pada pengamatan 3 hari sesudah ditantang lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan pertambahan bobot larva yang dikultur pada medium dengan serum anti-EP atau serum anti-LE. Sementara itu, daya tahan hidup larva yang dikultur dalam medium dengan serum anti-PM cenderung lebih rendah dibandingkan dengan daya tahan hidup larva yang dikultur dalam media yang mengandung serum anti-EP atau serum anti-PE.

Tabel 2. Jumlah larva yang hidup pada uji *in vitro bioassay* menggunakan serum waktu vaksinasi, 4 minggu sesudah vaksinasi, 2 minggu sesudah *booster* dan 3 hari sesudah ditantang dengan larva L_1

Serum domba yang divaksin	Jumlah larva ditanam	Jumlah larva yang hidup dengan perlakuan serum domba			
		Sebelum vaksinasi	4 minggu sesudah vaksinasi I	2 minggu sesudah <i>booster</i>	3 hari sesudah ditantang dengan larva L_1
Anti-PM	10	$8,5 \pm 0,41$ Aa	$5,7 \pm 1,02$ Ba	$6,1 \pm 1,26$ Ba	$6,0 \pm 0,97$ Ba
Anti-LE	10	$8,1 \pm 0,43$ Aa	$7,3 \pm 0,64$ Bb	$6,8 \pm 0,69$ Ba	$7,0 \pm 0,69$ Ba
Anti-EP	10	$8,4 \pm 0,46$ Aa	$8,2 \pm 0,46$ Ac	$7,1 \pm 0,59$ Ba	$7,6 \pm 1,03$ Bb
Kontrol	10	$8,3 \pm 0,60$ Aa	$8,2 \pm 0,50$ Ac	$8,0 \pm 1,09$ Ab	$8,2 \pm 1,60$ Ab

Keterangan :

Huruf kecil pada kolom dan huruf kapital pada lajur yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata

KESIMPULAN

Teknik *in vitro bioassay* dapat digunakan untuk mendeteksi respon kekebalan protektif dari vaksin myiasis pada domba. Larva yang dikultur pada medium dengan serum anti-PM 3 hari sesudah ditantang mendapat hambatan pertumbuhan sebesar 65% dari pertumbuhan larva yang dikultur pada medium dengan serum normal. Serum anti-PM menekan pertumbuhan dan daya hidup larva dalam medium lebih besar dibandingkan dengan serum anti-LE ataupun serum anti-EP. PM merupakan kandidat vaksin yang terbaik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada ACIAR (*the Australian Centre for International Agricultural Research*) yang telah memberi bantuan dana untuk penelitian ini, dan juga kepada para peneliti dari CSIRO, terutama Dr. Gene Wijffels, George Riding, M.Sc. dan Tony Vuocolo, M.Sc. yang banyak memberi saran sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Kepala Balai Penelitian Veteriner yang telah memberi fasilitas dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- BASSET, C. R. and S. B. A. KADIR. 1982. The screw worm fly (*Chrysomya bezziana*): An obstacle to large scale beef production in Malaysia. *Anim. Prod. Health Tropics* 82: 133-135.
- EISEMANN, C. H., L. A.Y. JOHNSTON, M. BROADMEADOW, B.M. O'SULLIVAN, R. A. DONALDSON, R. D. PEARSON, T. VUOCOLO, and J. D. KERR. 1990. Acquired resistance of sheep to larvae of *Luciana cuprina*, assessed *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 20(3): 299-305.
- EAST, J., C. J. FITZGERALD, R. D. PEARSON, R.A. DONALDSON, T. VUOCOLO, L.C. CADOGAN, R.L. TELLAM, and C.H. EISEMANN. 1993. *Luciana cuprina* : Inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritrophic membrane. *Int. J. Parasitol.* 23(2): 221-229.
- NORRIS, K. R. and M. D. MURRAY. 1964. Notes on the screw-worm fly *Chrysomya bezziana* (Diptera: *Calliphoridae*) as a pest of cattle in Papua New Guinea. *CSIRO Aust. Div. Entomol. Tech. Pap.* No. 6.
- SIGIT, S. H. and S. PARTOUTOMO. 1981. Myiasis in Indonesia. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 93:173-178.
- SPRADBERY, J. P., A. A. POUND, J. R. ROBB, and R. S. TOZER. 1983. Sterilization of screw worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera : *Calliphoridae*), by gamma radiation. *J. Aust. Entomol. Soc.* 22:319-324.
- SPRADBERY, J.P., R.S. TOZER., N. DREWETT, and M.J. LINDSEY. 1985. The efficacy of Ivermectin against larvae of the screw worm fly (*Chrysomya bezziana*). *Aust. Vet. J.* 62:280-284.
- SPRADBERY, P. J., R. S. TOZER, and A. A. POUND. 1991. The efficacy of insecticides against screw worm fly larvae. *Aust. Vet. J.* 60:57-58.
- SPRADBERY, J.P. 1991. *A Manual for the Diagnosis of Screw-worm Fly*. CSIRO Division of Entomology. pp. 62.
- SUKARSIH, R.S. TOZER, and M.R. KNOX. 1989. Collection and case incidence of the old word screw worm fly, *Chrysomya bezziana*, in three localities in Indonesia. *Penyakit Hewan* 21(38): 114-117.
- ZUMPT, F. 1965. *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterworths, London. pp. 33.

