

STRATEGI PENGEMBANGAN VAKSIN MYIASIS YANG DISEBABKAN OLEH LARVA LALAT *CHRYSOMYA BEZZIANA* (THE OLD WORLD SCREWORM FLY)

SRI MUHARSINI

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

ABSTRAK

Indonesia merupakan daerah endemis myiasis yang disebabkan oleh larva lalat *Chrysomya bezziana*. Sampai saat ini, pengendalian penyakit ini masih mengandalkan penggunaan insektisida jenis organofosfat dan coumaphos. Kontrol myiasis dengan *Sterile Insect Technique* (SIT) cukup berhasil, namun metode ini sangat mahal disamping pemakaian insektisida pendamping yang cukup banyak. Oleh sebab itu, diperlukan alternatif lain untuk pengendalian myiasis yang relatif murah, lebih ramah lingkungan dan sesuai dengan konsep pertanian yang berkesinambungan, yaitu dengan vaksinasi. Dalam makalah ini, dibahas strategi pengembangan vaksin myiasis yang telah dikerjakan oleh Balai Penelitian Veteriner bekerja sama dengan PAU-ITB, Bandung dan CSIRO, Brisbane-Australia. Tahapan pertama adalah identifikasi dan purifikasi antigen protektif dari bahan ekskretori/sekretori (ES) dan membran peritrofik (MP). Bahan ES dipurifikasi dan dianalisa dengan sekuen asam amino terminal menghasilkan tripsin dan *chymotrypsin* yang masing-masing berukuran 26 dan 28 kDa. Bahan membran peritrofik selanjutnya difraksinasi dan diperoleh kandidat antigen Cb15, Cb42 dan Cb48. Ke-tiga protein kandidat diekspresikan ke bakteri *Eschericia coli* dan khamir *Pichia pastoris* dengan hasil yang bervariasi, tergantung dari sifat masing-masing protein. Strategi pengembangan vaksin myiasis ini dapat dijadikan salah satu acuan untuk pengembangan vaksin penyakit parasit lain di Indonesia.

Kata kunci: *Chrysomya bezziana*, vaksin, ekskretori/sekretori, membran peritrofik

ABSTRACT

VACCINE DEVELOPMENT STRATEGY FOR MYIASIS CAUSED BY THE LARVAE OF *CHRYSOMYA BEZZIANA* (THE OLD WORLD SCREWORM FLY)

Indonesia is an endemic area for myiasis caused by the larvae of *Chrysomya bezziana*. So far, the controlling method for myiasis is using insecticides such as organophosphate and coumaphos compounds. Sterile Insect Technique (SIT) was a successful method for myiasis control, however, this method is expensive, beside it needs a large amount of insecticide. Therefore, vaccinations as an alternate controlling method for myiasis which relatively cheap, environment friendly and in accordance with the sustainable agriculture concept are needed. The strategy of myiasis vaccine development has been done by the Indonesia Research Institute for Veterinary Science in collaboration with IUC-ITB, Bandung and CSIRO, Brisbane-Australia, are briefly discussed in this paper. The first step was to identify and purify the protective antigens from excretory/secretory material and peritrophic membrane. The excretory/secretory material was purified and analysed using amino-terminal sequencing and resulted trypsin and chymotrypsin at 26 kDa and 28 kDa, respectively. The peritrophic membrane was then fractionated and resulted candidate antigens of Cb15, Cb42 and Cb48. The three antigens were expressed into bacterial *Eschericia coli* and yeast *Pichia pastoris* resulting different yield depending on each protein character. The strategy of myiasis vaccine could be used as an alternate way for vaccine development for other parasite diseases in Indonesia.

Key words: *Chrysomya bezziana*, vaccine, excretory/secretory, peritrophic membrane

PENDAHULUAN

Myiasis yang disebabkan oleh larva lalat *Chrysomya bezziana*, merupakan obligat parasit, pada hewan menyusui termasuk manusia yang ditemukan di daerah tropis dan subtropis di Asia Tenggara, Afrika, India dan Papua New Guinea (NORRIS dan MURRAY, 1964). Berdasarkan studi literatur, kejadian ini paling banyak menyerang sapi dan domba. Infestasi mengakibatkan iritasi karena luka, kelemahan dan

penurunan berat badan (HUMPREY *et al.*, 1980; BARHOOM *et al.*, 1998). Kejadian infeksi larva telah dilaporkan terutama pada ternak yang dipelihara secara ekstensif dan semi ekstensif di Propinsi Sulawesi Selatan dan Pulau Sumba Timur (SIGIT dan PARTOUTOMO, 1981; WARDHANA *et al.*, 2003), juga di Jawa Barat dan Pulau Timor sebelah barat (Kupang) (SUKARSIH *et al.*, 1989). Namun kerugian ekonomi penyakit ini di Indonesia belum dihitung secara detail dan belum ada program pengendalian secara

menyeluruh untuk mengurangi kasus kejadian myiasis di lapangan.

Pengendalian penyakit myiasis masih mengandalkan preparat insektisida seperti senyawa organofosfat atau coumaphos. Senyawa avermectin yang berasal dari *Streptomyces avermitilis* merupakan obat antiparasit berspektrum luas. Avermectin adalah obat myiasis yang paling baik yang dapat memberikan perlindungan sampai 20 hari pada dosis 200 µg/kg berat badan sekali suntik (SPRADBERY *et al.*, 1985). Namun senyawa avermectin ini relatif mahal untuk peternak kecil di Indonesia. Selain itu, perlindungan yang pendek menyebabkan pemberian harus diberikan lebih dari satu kali sehingga biaya pengobatan akan lebih mahal lagi. Pengendalian dengan preparat insektisida banyak dilakukan dengan cara disemprot, namun apabila luka sudah terlalu dalam, maka aplikasi menjadi tidak efektif.

Pengobatan myiasis secara tradisional dengan tembakau, bensin dan batu baterai pernah dilakukan peternak (SUKARSIH *et al.*, 1989). Namun cara ini hanya mengusir larva dan tidak menyembuhkan luka, bahkan bersifat iritasi. Penelitian obat myiasis dengan tanaman obat-obatan seperti daun mindi (*Melia azedarach* Linn) dan biji srikaya (*Annona squamosa*) secara *in vitro* menimbulkan penurunan bobot badan larva bahkan kematian larva pada konsentrasi 0,5–1% (MUHARSINI *et al.*, 2004; WARDHANA *et al.*, 2004). Namun pengujian ini hanya dilakukan secara *in vitro*. Masih perlu penelitian yang lebih komprehensif secara *in vivo* pada hewan percobaan misalnya domba atau sapi.

Kontrol myiasis dengan *Sterile Insect Technique* (SIT) merupakan metode yang paling berhasil telah dilakukan terhadap lalat myiasis *New World Screwworm Fly* (*Cochliomya hominivorax*) di USA and Mexico (KRAFSUR *et al.*, 1987) dan di Libya (LINDQUIST *et al.*, 1992). Metode SIT ini harus dibarengi dengan pemakaian insektisida untuk menekan populasi lalat di lapangan (LINDQUIST *et al.*, 1992). Walaupun metode SIT ini sukses untuk eradikasi lalat *C. hominivorax*, namun biaya yang diperlukan sangat besar dan harus didukung oleh fasilitas yang cukup mahal (SMITH, 1960), disamping itu metode ini juga menggunakan insektisida yang tidak ramah lingkungan. Oleh karena itu, pengendalian myiasis dengan vaksinasi secara teori mempunyai keuntungan dibandingkan dengan pemakaian insektisida antara lain: relatif murah pembuatannya, stabil, mudah didistribusikan, bebas dari kontaminan dan spesifik terhadap insek target. Keuntungan vaksin adalah mengurangi pemakaian insektisida yang sekarang semakin banyak digunakan sehingga sesuai dengan sistem pertanian yang berkesinambungan.

Dalam makalah ini diuraikan strategi pengembangan vaksin myiasis yang telah dikerjakan di

Balai Penelitian Veteriner yang merupakan proyek kerjasama antara Balai Penelitian Veteriner Bogor, PAU-ITB, Bandung dan CSIRO Brisbane, Australia yang dibiayai oleh ACIAR. Strategi pengembangan vaksin myiasis menggunakan dua pendekatan yang disebut dengan istilah *natural antigen* dan *concealed antigen*. *Natural antigen* adalah antigen yang dapat menimbulkan tanggapan kebal pada induk semang secara langsung selama infeksi, sedangkan *concealed antigen* tidak menimbulkan tanggapan kebal secara langsung selama infeksi (WILLADSEN, 1999). Umumnya, *concealed antigen* berasal dari protein permukaan pada membran sel (*surface membrane protein*) dari alat pencernaan parasit. Strategi pengembangan vaksin pada parasit umumnya dan khususnya myiasis berawal dari mengidentifikasi antigen protektif. Selanjutnya antigen protektif ini akan dikembangkan dan diperbanyak baik secara konvensional maupun secara rekayasa genetika.

IDENTIFIKASI DAN PURIFIKASI ANTIGEN PROTEKTIF

Tahap ini umumnya memerlukan prosedur yang panjang dan banyak masalah. Pemilihan antigen protektif dilakukan berdasarkan penelitian beberapa parasit terdahulu dengan memilih jaringan atau protein tertentu yang diduga mempunyai efek antigenik. Pemilihan antigen protektif terhadap vaksin caplak *Boophilus microplus* dan myiasis yang disebabkan oleh lalat *Lucilia cuprina* (WILLADSEN *et al.*, 1988; EAST *et al.*, 1993) merupakan beberapa contoh. Pada pengembangan vaksin tersebut, antigen protektif diperoleh dengan cara mengisolasi bahan ekskretori/sekretori (ES) dan membran peritrofik (MP) larva *C. bezziana*.

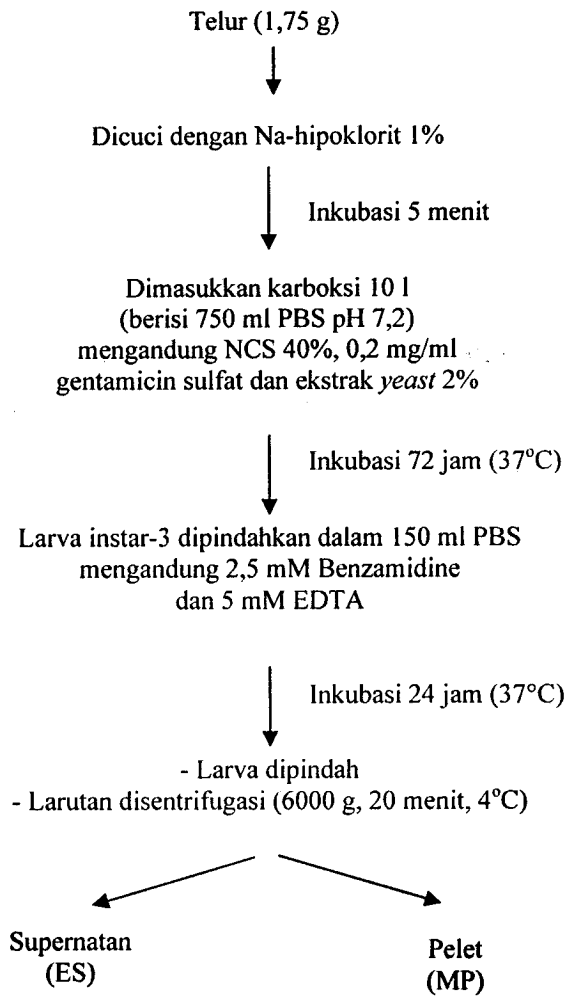
Bahan ES sudah dipelajari secara luas dan dipurifikasi sebagai antigen potensial yang mengandung protease dan dapat mengganggu pencernaan makanan pada larva maupun pada lalat dewasa (TELLAM *et al.*, 1994). Lalat dewasa dari *Hematobia irritans* yang diberi makan serum yang mengandung protease akan meningkatkan kematiannya secara *in vitro* (EAST *et al.*, 1995). Larva instar-I merupakan stadium larva yang paling banyak menggunakan bahan ES (protease) untuk pembentukan luka karena bagian mulutnya belum berkembang (YOUNG *et al.*, 1996). Protease juga berperan penting untuk mempermudah penetrasi larva infeksi ke dalam kulit dan makanan dari cacing cacing *Schistosoma* sp., *Strongyloides stercoralis* dan *Ancylostoma cacinum* (HOTEZ *et al.*, 1990; MCKERROW *et al.*, 1990). Sedangkan pada *Hypoderma lineatum*, fungsi ES adalah untuk penetrasi ke dalam jaringan induk semang (LECROISEY *et al.*, 1979). Sebaliknya bahan MP tidak banyak dipelajari, namun penelitian secara

intensif telah dilakukan pada MP dari caplak *B. microplus* dan lalat *L. cuprina* (WILLADSEN *et al.*, 1993; TELLAM, 1996).

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAHAN EKSKRETORI/SEKRETORI (ES)

Koloni lalat *C. bezziana* telah dipelihara di laboratorium Parasitologi Balai Penelitian Veteriner sejak tahun 1994 (SUKARSIH *et al.*, 2000). Larva dikoleksi dari luka akibat infeksi alam domba merino

yang dipelihara di kandang Cimanglit (Balitvet). Larva dipelihara hingga menjadi pupa dan menetas menjadi lalat dewasa yang merupakan cikal bakal koloni. Sampai sekarang, lalat koloni laboratorium tersebut sudah beberapa kali dikawinkan dengan lalat lapangan yang berasal dari Gunung Putri (Cibinong), Garut dan Sulawesi Selatan. Bahan ES dikoleksi dalam kondisi steril seperti yang telah dikerjakan pada lalat *L. cuprina* (EAST *et al.*, 1993) dengan modifikasi yang disesuaikan untuk lalat *C. bezziana* (Gambar 1, MUHARSINI *et al.*, 2000). Setelah diproduksi, maka bahan ES dan MP disimpan pada suhu -70°C sampai digunakan.



Gambar 1. Diagram pembuatan dan koleksi bahan ES dan bahan membran pritrofik (MP) secara steril

Sumber: MUHARSINI *et al.* (2000)

Serine protease dipurifikasi dari bahan ES dengan metode kromatografi afinitas menggunakan kolom *soybean-trypsin inhibitor* Sepharose (SBTI-Sepharose) (MUHARSINI *et al.*, 2000). Protein dielusi dengan 100 mM asam asetat pH 2,5 yang mengandung detergen SB3-14 0,1%. Fraksi yang mengandung protein dikoleksi dan dianalisa dengan SDS-PAGE. Protein ini mengandung serine protease yang berukuran 26 dan 28 kDa yang dibuktikan dengan sekuen asam amino terminal. Aktivitas enzim juga diuji dengan substrat BAPNA (N-benzoyl-Arg-p-nitroanilide) dan SAPNA (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide) yang masing-masing untuk menguji aktifitas enzim tripsin dan *chymotrypsin*. Hasil pengujian menyatakan bahwa enzim tripsin dan *chymotrypsin* yang telah diisolasi dari bahan ES bekerja aktif pada pH netral sampai basa (MUHARSINI *et al.*, 2000). Aktivitas enzim pada pH basa umum terjadi pada enzim serine protease pada invertebrata (TERRA dan FERREIRA, 1994). Enzim protease pada invertebrata bekerja aktif pada kondisi basa sangat diperlukan dalam keadaan kandungan amonia yang tinggi pada infestasi luka induk semang (WATERHOUSE, 1940; HOBSON, 1931).

Selanjutnya enzim serine protease dari bahan ES dikarakterisasi secara biokimia dan molekuler. Enzim yang telah dipurifikasi secara parsial dilewatkan pada *cation exchange chromatography* yang menghasilkan lima fraksi protein murni berukuran 26 dan 28 kDa (MUHARSINI *et al.*, 2001). Analisa dengan sekuen asam amino terminal ternyata bahwa, dua fraksi yang berukuran 26 kDa adalah tripsin dan satu fraksi yang berukuran 28 kDa adalah *chymotrypsin*. Protein yang berukuran 26 kDa ini mempunyai identitas sekuens 86% dan 80% masing-masing terhadap tripsin *L. cuprina* dan tripsin *D. melanogaster*. Sedangkan protein yang berukuran 28 kDa mempunyai identitas sekuens 73-80% terhadap *chymotrypsin D. melanogaster* dan *L. cuprina*. Tripsin dan *chymotrypsin* ini kemudian diamplifikasi dengan menggunakan primer F1 untuk tripsin and F2 untuk *chymotrypsin* yang didesain berdasarkan sekuen asam amino terminal dari tripsin dan *chymotrypsin* yang telah murni (MUHARSINI *et al.*, 2001). Dalam kondisi PCR yang sesuai, diperoleh produk yang berukuran 550-600 pb. Tripsin dan *chymotrypsin* larva *C. bezziana* dikloning dan menghasilkan 26 klon tripsin dan 24 klon *chymotrypsin*. Analisa dengan enzim restriksi menghasilkan 18 macam tripsin dan 10 macam *chymotrypsin* yang selanjutnya klon-klon ini dipilih untuk disekuens. Analisis filogenetik menghasilkan 4 kluster yang terdiri dari 2 famili tripsin (trypA dan trypB) dan 4 famili *chymotrypsin* (chytC-F) (MUHARSINI *et al.*, 2001). Hal ini menunjukkan enzim serine protease larva *C. bezziana* mempunyai famili yang besar. Penelitian lain menyatakan bahwa larva *L. cuprina* mempunyai 125-220 serine protease (ELVIN *et*

al., 1993) dan *D. melanogaster* mempunyai sekitar 200 serine protease (RUBIN *et al.*, 2000). Heterogenitas tripsin dan *chymotrypsin* larva *C. bezziana* menunjukkan perbedaan atau kesamaan spesifisitasnya. Mayoritas serine protease dihasilkan di bagian anterior dan posterior dari *midgut* (MUHARSINI *et al.*, 2000) yang fungsinya adalah sebagai penghacur makanan. Pada perkembangan selanjutnya dan dengan jenis makanan yang berbeda maka enzim ini akan berkembang (berevolusi). MUHARSINI *et al.* (2001) telah membuktikan bahwa *ion exchange chromatography* hanya memisahkan tripsin dan *chymotrypsin*. Sedangkan dengan PCR dan sekuensing dapat dihasilkan 22 subspecies serine protease yang terdiri dari 2 tripsin dan 4 *chymotrypsin*.

IDENTIFIKASI, FRAKSINASI DAN KARAKTERISASI MEMBRAN PERITROFIK (MP)

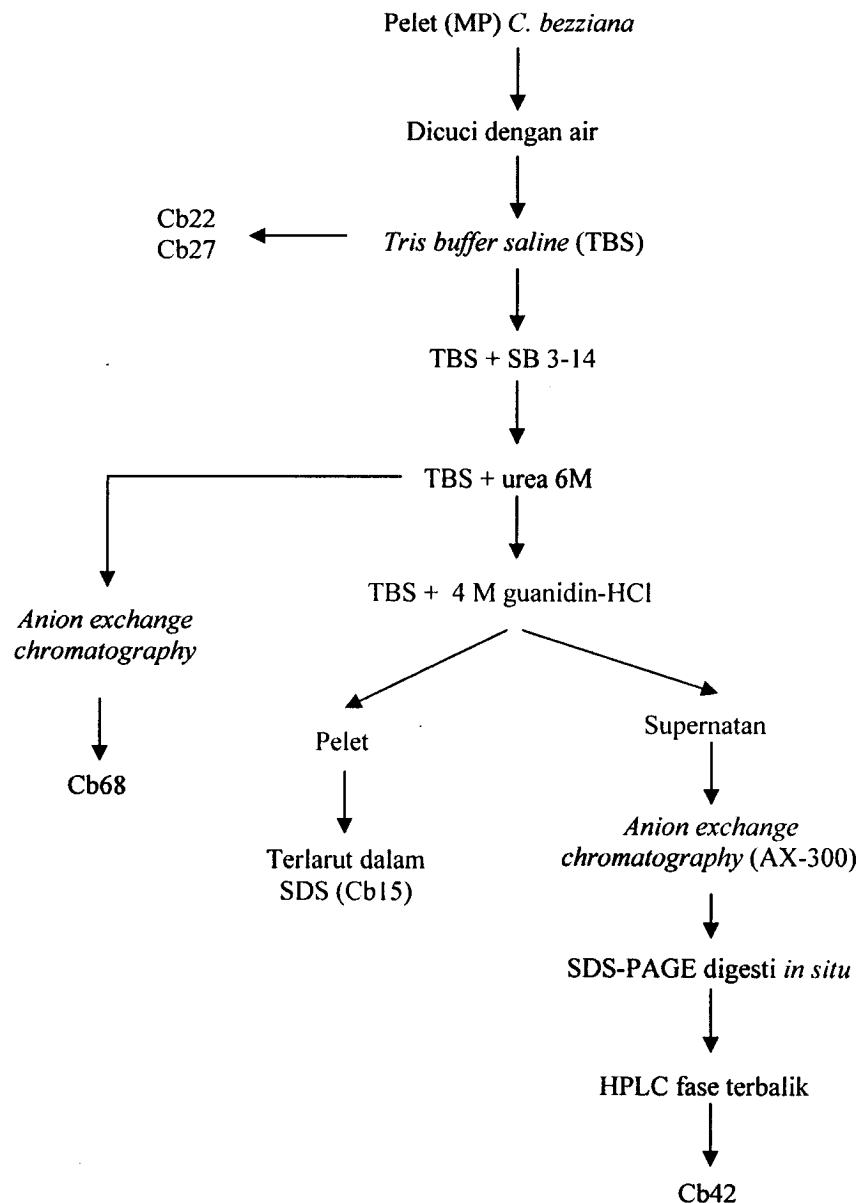
Membran peritrofik merupakan karakteristik dari alat pencernaan invertebrata, yaitu merupakan lapisan matrik aseluler yang memisahkan antara makanan yang telah dicerna dengan epitel usus. Fungsi dari MP pada invertebrata telah banyak di review bahkan sampai taraf molekuler (PETERS, 1992; JACOB-LORENA dan OO, 1996; LEHANE, 1997; TELLAM *et al.*, 1999), diantaranya yaitu sebagai barier terhadap parasit dan pengatur permeabilitas yang melindungi epitel usus (*midgut*) dari kerusakan mekanis terhadap partikel dan residu makanan. MP mengandung 4-13% khitin, 21-51% protein dan 15% karbohidrat dari glikoprotein dan proteoglikan (PETERS, 1992, JACOBS-LORENA dan OO, 1996). Studi terakhir menyatakan bahwa jumlah khitin *L. cuprina* maksimum 7,2% dari total MP (TELLAM dan EISEMANN, 2000). Khitin akan membentuk ikatan dengan protein yang berisi mikrofibril yang sangat baik untuk kekuatan MP. Proteoglikan untuk melindungi usus dari enzim proteolitik dan mempengaruhi permeabilitas MP (PETERS, 1992). Permeabilitas MP berkisar 2-10 nm (LEHANE, 1997). Mengingat fungsi MP dan lokasinya, maka MP merupakan sumber potensial sebagai kandidat antigen untuk vaksin. Vaksinasi domba dengan PM menunjukkan bahwa ingesti anti-MP antibodi menghasilkan lapisan tebal yang menyelaputi usus, sehingga mengurangi permeabilitas usus dan menghambat makanan masuk ke dalam sel usus (TELLAM, 1996).

Protein dari MP disebut peritrofin yang dibagi menjadi empat kelas berdasarkan solubilitas (TELLAM, 1996: TELLAM *et al.*, 1999). Grup I mengandung protein yang kecil dan terikat longgar dengan MP, sehingga mudah diekstrak dengan larutan dapa yang berion rendah. Kelompok II berisi protein yang dapat diekstrak dengan detergen lemah (Triton X-100 2% atau SB 3-142%). Kelompok III adalah protein yang

hanya dapat diekstrak dengan denaturan yang kuat seperti 6 M urea atau 6 M guanidin hidroklorida. Kelompok terakhir adalah protein yang tidak dapat disolubilisasi dengan apapun dan berikatan secara kuat dengan protein lain atau dengan MP sendiri (TELLAM *et al.*, 1999).

Ekstraksi protein dari larva *C. bezziana* diperoleh dengan cara homogenisasi membran peritrofik dengan menggunakan zat *chaotropic* dan detergen untuk menambah kelarutan seperti yang telah dikerjakan oleh EAST *et al.* (1993) dan dimodifikasi untuk larva *C. bezziana* (RIDING *et al.*, 2000). MP dari larva *C.*

bezziana diekstraksi secara sekuensial, sehingga menghasilkan beberapa kandidat antigen di antaranya Cb15, Cb22, Cb27 dan Cb42 (Gambar 2), yang selanjutnya beberapa protein direkayasa menjadi produk vaksin. Dari hasil karakterisasi ternyata Cb22 dan Cb27 mempunyai sekuen asam amino terminal yang identik dengan Cb26 dan Cb24 (MUHARSINI *et al.*, 2000) yang merupakan sekuen dari enzim protease. Empat protease ini mungkin saling berhubungan atau memang merupakan protease yang sama.



Gambar 2. Ekstraksi pelet (membran peritrofik) larva *C. bezziana* secara sekuensial

Sumber: RIDING *et al.* (2000)

Untuk mengisolasi gen dari protein yang akan dipilih sebagai kandidat vaksin, maka mRNA diisolasi untuk menghasilkan cDNA (VUOCOLO *et al.*, 2000), yang selanjutnya digunakan sebagai templat. Tiga kandidat antigen yaitu Cb15, Cb42 dan Cb48 dipilih menjadi kandidat antigen untuk vaksin rekombinan. Cb15 dan Cb42 diisolasi dari larva *C. bezziana* (RIDING *et al.*, 2000), sedangkan Cb48 merupakan hasil identifikasi dengan cara skrining pustaka cDNA dengan probing DIG-lebeled DNA dari MP larva *L. cuprina* (VUOCOLO *et al.*, 2000). Cb15, Cb42 dan Cb48 masing-masing diekspresikan ke bakterial *E. coli* maupun ke khamir *P. pastoris* (WIJFFELS *et al.*, 2000; MUHARSINI *et al.*, 2000).

EKSPRESI CB15, CB42 DAN CB48 PADA BAKTERI *E. COLI* DAN KHAMIR *P. PASTORIS*

E. coli banyak digunakan untuk mengekspresi gen eukaryotik ke dalam prokaryotik, karena *E. coli* sangat baik untuk memproduksi protein dalam jumlah besar. Protein diekspresi sebagai protein fusi dari amino atau karboksil terminal dengan peptida untuk memperoleh protein rekombinan yang stabil dan mudah dipurifikasi. Namun *E. coli* sebagai sistem ekspresi mempunyai kelemahan yaitu sebagai prokaryotik yang tidak mempunyai membran inti atau organel sel lain seperti eukaryotik, sehingga protein rekombinan yang dihasilkan umumnya berbentuk pelet (*inclusion body*). Dengan bentuk pelet ini diperlukan teknik solubilisasi, purifikasi dan *folding* protein. Protein yang berupa pelet harus dipisahkan dari komponen yang lain dengan cara homogenisasi, pencucian dan sentrifugasi dan selanjutnya disolubilisasi dengan menggunakan denaturan seperti guanidin-HCl atau urea. Denaturan ini akan mencegah interaksi antar ion. Protein natif

yang terpapar denaturan dalam konsentrasi tinggi akan terbuka secara sempurna, namun ikatan disulfida masih utuh (MARSTON, 1986).

Berbagai vektor ekspresi bakterial *E. coli* digunakan untuk merekayasa rekombinan Cb15, Cb42 dan Cb48. Bahkan Cb42 dipotong menjadi 2 fragmen yaitu Cb42A dan Cb42B untuk efisiensi ekspresi (Tabel 1).

Mengingat kelemahan *E. coli* sebagai sistem ekspresi, maka penggunaan organisme eukaryotik sebagai sistem ekspresi menjadi lebih populer. Sistem eukaryotik mampu membentuk ikatan disulfida yang tepat pada saat post-translasi setelah sintesa polipeptida. Protein yang terlipat sempurna akan meningkatkan ketahanannya terhadap degradasi protease. Selain itu, eukaryotik seperti khamir mampu mengglikosilasi protein dengan penambahan gugus gula senyawa asparagin atau serine/threonin (*O*- atau *N-linked glycosylation*), sehingga protein rekombinan yang dihasilkan adalah protein aktif secara biologi (GLICK dan PASTERNAK, 1998).

Pichia pastoris dikenal setelah penggunaan sistem ekspresi *Saccharomyces cereviceae*, merupakan khamir *methylophilic* yang mempunyai kemampuan menggunakan metanol sebagai sumber karbon dengan adanya ekspresi gen alkohol oksidase (AOX). Keuntungan *P. pastoris* adalah dapat menghasilkan protein dalam jumlah banyak (KOCKEN *et al.*, 1999) dan jarang terjadi hiperglikosilasi (TSCHOPP *et al.*, 1987). Cb42 dan Cb48 telah diekspresikan ke *P. pastoris* dengan menggunakan dua strain KM71 dan GS115 (MUHARSINI dan VUOCOLO, 2000). Cb48 berhasil diekspresikan dan menghasilkan protein rekombinan 8 mg/ml yang bersifat glikosilasi dengan gugus gula manosa. Cb42 gagal diekspresi, sehingga dipecah menjadi dua fragmen Cb42A dan Cb42B yang masing-masing diekspresikan ke *P. pastoris*. Cb42A

Tabel 1. Beberapa vektor untuk ekspresi Cb15, Cb42 dan Cb48 pada *E. coli*

Protein	Vektor	Rekombinan yang diharapkan	Hasil	Sumber
Cb15	pQE-9	N-terminal h-His Cb15	-protein tunggal	WIJFFELS <i>et al.</i> (2000)
			-larut	WIJFFELS <i>et al.</i> (2001)
	pGEX-2T	N-terminal GST fusi Cb15	-multi protein	WIJFFELS <i>et al.</i> (2000)
			-larut	
Cb42	pQE-9	N-terminal h-His Cb42	-protein tunggal	WIJFFELS <i>et al.</i> (2000)
			-nirlarut	
Cb42A	pQE-9	N-terminal h-His Cb42A	-protein tunggal	WIJFFELS <i>et al.</i> (2000)
			-nirlarut	
Cb42B	pQE-9	N-terminal h-His Cb42B	-protein tunggal	WIJFFELS <i>et al.</i> (2000)
			-nirlarut	
Cb48	pQE-60	C-terminal h-His Cb48	-protein tunggal	WIJFFELS <i>et al.</i> (2000)
			-nirlarut	VUOCOLO <i>et al.</i> (2001)

gagal diekspresi, namun Cb42B menghasilkan 0,4 mg/liter kultur. Kegagalan Cb42 (*full length*) dan Cb42A kemungkinan adanya sekuen yang komposisinya kaya A+T, sehingga menyebabkan transkripsional terminal prematur (MUHARSINI dan VUOCOLO, 2000). Gen yang kaya sekuen A+T tidak efisien ditranskripsi, karena ada kecenderungan terminasi prematur seperti yang terjadi pada sekuen glikoprotein HIV-1 (SCORER *et al.*, 1993). Sebaliknya gen yang kaya G+C lebih efisien ditranskripsi (ROMANOS *et al.*, 1991). Namun penyebab kegagalan ekspresi yang pasti pada kasus Cb42 dan Cb42A ini masih perlu pembuktian lebih lanjut. Dari beberapa studi ini membuktikan bahwa walaupun *P. pastoris* mempunyai keuntungan lebih sebagai vektor ekspresi dibandingkan dengan *E. coli*, namun tidak semua gen dapat diekspresi secara efisien karena adanya variasi dari gen ke gen.

PURIFIKASI PROTEIN REKOMBINAN DAN LOKALISASI CB42

Tahap lanjut setelah ekspresi adalah purifikasi protein rekombinan. Sebelum memproduksi protein rekombinan dalam jumlah yang cukup untuk vaksinasi, maka sebaiknya dilakukan deteksi rekombinan protein untuk membuktikan apakah protein target benar-benar telah terekspresi. Pelet dari protein rekombinan dalam skala kecil (10 ml) baik yang berada pada *E. coli* maupun *P. pastoris* disonikasi dalam keadaan dingin dalam bufer yang mengandung Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) dan 140 mM NaCl yang berisi 1 mg/ml lysozyme (PEARSON *et al.*, 2000). Bahan protein yang sudah dilisis kemudian disentrifugasi dan semua pelet maupun supernatannya dianalisa dengan SDS-PAGE dengan pewarnaan menggunakan *Commasie Blue* atau *Silver stain*. Apabila tingkat ekspresinya sangat rendah, maka dapat digunakan *Western Blotting* yang jauh lebih sensitif daripada kedua teknik sebelumnya. Dengan analisa ini apabila protein sudah terbukti terekspresi, maka dapat dilanjutkan dengan pembuatan skala untuk vaksinasi misalnya dari 1 liter kultur.

Purifikasi dari 1 liter kultur didahului dengan sonikasi yang dilakukan dua kali. Sonikasi pertama dengan menambahkan 0,1% Triton X-100. Sonikasi kedua dengan menambahkan 0,5% Triton X-100 (PEARSON *et al.*, 2000). Setelah disentrifugasi (12.000 g, 20 menit) maka pelet disolubilisasi dengan larutan yang berisi urea 8 M, Tris-HCl 10 mM, NaH₂PO₄ 100 mM (pH 8,0) dan 2-mercaptoetanol 2 mM, kemudian disentrifugasi lagi (100.000 g, 20 menit). Supernatan yang berisi protein rekombinan diinkubasikan dengan resin Ni-NTA selama 1 jam. Resin Ni-NTA ini kemudian dilewatkan pada kolom kromatografi yang telah disambungkan dengan FPLC. Fraksi protein

target dielusi dengan larutan yang berisi urea 8 M, Tris-HCl 10 mM, NaH₂PO₄ 100 mM (pH 6,0) dan imidazole gradient 0–1 M. Karena protein rekombinan yang diperoleh adalah dalam bentuk denaturasi, maka untuk vaksin harus dilakukan renaturasi dengan menggunakan glutation reduksi/oksidasi untuk proses *refolding* (PEARSON *et al.*, 2000). Protein yang sudah mempunyai ikatan disulfida terlipat (*refolded*), kemudian dipekatkan menjadi 1 mg/ml untuk mempermudah injeksi ke hewan percobaan.

Protein rekombinan juga dapat dideteksi pada larva *C. bezziana* dengan menggunakan teknik imunofluoresen antibodi (FAT) maupun dengan teknik mikroskop elektron (EISEMANN dan MUHARSINI, 2000). Dengan FAT terbukti bahwa Cb42 terdapat di seluruh permukaan MP, sedangkan dengan mikroskop elektron diketahui bahwa Cb42 terdapat pada sel-sel sekresi dari MP pada kardia yaitu organ khusus pembuat MP yang terletak antara usus bagian depan dan tengah. Penelitian ini juga sekaligus membuktikan bahwa protein rekombinan Cb42 merupakan target molekuler yang potensial untuk vaksinasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Strategi pengembangan vaksin penyakit parasit, khususnya myiasis didahului dengan isolasi dan identifikasi bahan ekskretori/sekretori dan membran peritrofik sebagai antigen protektif.
2. Antigen protektif yang telah berhasil diidentifikasi dilanjutkan dengan perbanyakan antigen secara secara konvensional maupun secara rekayasa genetika dengan diekspresikan ke bakteri atau khamir agar cukup digunakan sebagai bahan untuk vaksin.
3. Strategi pengembangan vaksin myiasis ini dapat dijadikan sebagai salah satu acuan untuk pengembangan vaksin penyakit parasit lain yang ada di Indonesia.

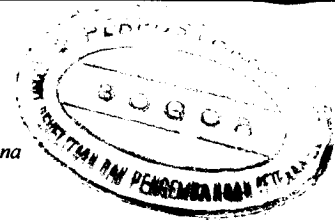
UCAPAN TERIMAKASIH

Pengembangan vaksin myiasis ini dibiayai oleh ACIAR. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. John Copland sebagai Program Manager AS1. Penulis juga berterimakasih kepada Kepala Balai Penelitian Veteriner, sehingga proyek tersebut berjalan dengan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

- BARHOOM, S.S., A.M. KHALAF, and F.S. KADHIM. 1998. Aetiological and clinical findings of cutaneous myiasis in domestic animals in Iraq. Iraqi J. Vet. Sci. 11: 31–44.

- EAST, I.J., C.J. FITZGERALD, R.D. PEARSON, R.A. DONALDSON, T. VUOCOLO, L.C. CADOGAN, R.L. TELLAM, and C.H. EISEMANN. 1993. *Lucilia cuprina*: inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritrophic membrane. *Int. J. Parasitol.* 23: 221–229.
- EAST, I.J., P.G. ALLINGHAM, R.J. BUNCH, and J. MATHESON. 1995. Isolation and characterisation of a trypsin-like enzyme from buffalo fly, *Haematobia irritans exigua*. *Med. Vet. Entomol.* 9: 120–126.
- EISEMANN, C.H. and S. MUHARSINI. 2000. Localization of the glycoprotein Cb42 in larvae of the screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *JITV* 5(3): 197–200.
- ELVIN, C.M., V. WHAN and P.W. RIDDLES. 1993. A family of serine proteases genes expressed in adult buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). *Mol. Gen. Genet.* 240: 132–139.
- GLICK, B.R. and J.J. PASTERNAK. 1998. Recombinant protein production in eukaryote cells. In: *Molecular Biotechnology. Principles and Application of Recombinant DNA*. American Society for Microbiology, Washington DC, 2nd edition. 683 p.
- HOBSON, R.P. 1931. On an enzyme from blow fly larvae (*Lucilia sericata*) which digests collagen in alkaline solution. *Biochem J.* 25: 1458–1463.
- HOTEZ, P., J. HAGGERTY, J. HAWDON, L. MILSTONE, H.R. GAMBLE, G. SCHAD and F. RICHARD. 1990. Metalloproteases of infective *Ancylostoma* hookworm larvae and their possible functions in tissue invasion and ecdysis. *Infect. Immun.* 58(12): 3883–3892.
- HUMPREY, J.D., J.P. SPRADBURY and R.S. TOZER. 1980. *Chrysomya bezziana*: pathology of Old World Screwworm fly infestation in cattle. *Exp. Parasitol.* 49: 379–381.
- JACOBS-LORENA, M. and M.M. OO. 1996. The peritrophic matrix of insects. In: *The Biology of Diseases. Vectors* BEATY, B.J. and W.C. MARQUART (Eds.). University. Press. Colorado pp. 318–332.
- KOCKEN, C.H.M. M.A. DUBBELD, A. VANDERWEL, J.T. PRONK, A.P. WATERS, J.A.M., LANGERMANS and A.W. THOMAS. 1999. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical matrix antigen1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mullata* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SB AS2. *Infect. Immun.* 67: 43–49.
- KRAFSUR, E.S., C.J. WHITTEN and J.E. NOVY. 1987. Screwworm fly eradication in North and Central America. *Parasitol. Today.* 4: 131–137.
- LECROISEY, A., C. BOULARD and B. KEIL. 1979. Chemical and enzymatic characterisation of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Eur. J. Biochem.* 101: 385–393.
- LEHANE, M.J. 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 525–550.
- LINDQUIST, D.A., M. ABUSOWA and M.J.R. HALL. 1992. The New World Screwworm in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med. Vet. Entomol.* 6: 2–8.
- MARSTON, F.A.O. 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Eschericia coli*. *Biochem. J.* 36: 1–9.
- MCKERROW, J.H., P. BRINDLEY, M. BROWN, A.A. GAM, C. STAUNTON and F. NEVA. 1990. *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease whose inhibition prevents larval skin invasion. *Exp. Parasitol.* 70: 134–143.
- MUHARSINI, S. and T. VUOCOLO. 2000. Expression in yeast (*Pichia pastoris*) of recombinant Cb-peritrophin-42 and Cb-peritrophin-48 isolated from *Chrysomya bezziana* (the Old World Screwworm fly). *JITV* 5(3): 177–184.
- MUHARSINI, S. B. DALRYMPLE, T. VUOCOLO, S. HAMILTON, P. WILLADSEN and G. WIJFFELS. 2001. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the Old World Screwworm fly. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 31: 1029–1040.
- MUHARSINI, S., A.H. WARDHANA dan Y. SANI. 2004. Studi pendahuluan pengaruh ekstrak air daun mindi (*Melia azedarach* Linn) terhadap larva lalat *Chrysomya bezziana* secara *in vitro*. Pros. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4–5 Agustus 2004. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 689–693.
- MUHARSINI, S., SUKARSIH, G. RIDING, S. PARTOUTOMO, S. HAMILTON, P. WILLADSEN and G. WIJFFELS. 2000. Identification and characterisation of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*. *Int. J. Parasitol.* 30: 703–714.
- NORRIS, K.R. and M.D. MURRAY. 1964. Notes on the screwworm fly *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae) as a pest of cattle in Papua New Guinea. CSIRO Division of Entomology. Technical Paper 6: 1–26.
- PEARSON, R.D., S. MUHARSINI, G. WIJFFELS and T. VUOCOLO. 2000. Purification of recombinant peritrophic membrane proteins of the Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. *JITV* 5(3): 185–191.
- PETERS, W. 1992. Peritrophic membranes. *Zoophysiology* 130: 1–238. Springer-Verlag, Berlin.
- RIDING, G., S. MUHARSINI, R. PEARSON, SUKARSIH, E. SATRIA, G. WIJFFELS and P. WILLADSEN. 2000. Fractionation, identification and vaccination efficacy of native antigen from the screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. *JITV* 5(3): 150–159.
- ROMANOS, M.A. J.J. CLARE, K.M. BEESLEY, F.B. RAYMENT, S.P. BALLANTINE, A.J. MAKOFF, G. DOUGAN, N.F. FAIRWEATHER and I.G. CHARLES. 1991. Recombinant *Bordetella pertussis* (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccines* 9: 901–906.



- RUBIN, G.M., M.D. YANDELL, J.R. WORTMANN and G.L.G. MIKLOS. 2000. Comparative genomic of the eukaryotes. *Sci.* 287: 2204–2217.
- SCORER, C.A., R.G. BUCKHOLZ, J.J. CLARE and M.A. ROMANOS. 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136: 111–119.
- SIGIT, S.H. and S. PARTOUTOMO. 1981. Myiasis in Indonesia. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93: 173–178.
- SMITH, C.L. 1960. Mass production of screwworm (*Cochliomya hominivorax*) for the eradication program in the southeastern states. *J. Econ. Entomol.* 53: 1110–1116.
- SPRADBERY, J.P. R.S. TOZER, N. DREWETT and M.J. LINDSEY. 1985. The efficacy of ivermectin against larvae of the screwworm fly (*Chrysomya bezziana*). *Aust. Vet. J.* 61: 311–314.
- SUKARSIH, R.S. TOZER and M.R. KNOX. 1989. Collection and case incidence of the Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, in three localities in Indonesia. *Penyakit Hewan* 21: 114–117.
- SUKARSIH, S. PARTOUTOMO, R.S. TOZER, E. SATRIA, G. WIJFFELS and G. RIDING. 2000. Establishment and maintenance of colony of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana* at Balitvet in Bogor, West Java, Indonesia. *JITV* 5(3): 144–149.
- TELLAM, R.L. 1996. The peritrophic matrix. In: Lehane, M.J. and Billingsley, P.F. (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London. pp. 86–114.
- TELLAM, R.L. and C. H. EISEMANN. 2000. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 30: 1189–1201.
- TELLAM, R.L., C.H. EISEMANN and R.D. PERSON. 1994. Vaccination of sheep with purified serine proteases from the excretory/secretory material of *Lucilia cuprina* larvae. *Int. J. Parasitol.* 24: 757–764.
- TELLAM, R.L., G. WIJFFELS and P. WILLADSEN. 1999. Review: Peritrophic matrix proteins. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 29: 87–101.
- TERRA, W.R. and C. FERREIRA. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 1–62.
- TSCHOPP, J.F., G. SVERFLOW, R. KOSSON, W. CRAIG and L. GRINNA. 1987. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 5: 1305–1308.
- VUOCOLO, T., C.H. EISEMANN, R.D. PEARSON, P. WILLADSEN and R.L. TELLAM. 2001. Identification and molecular characterization of a peritrophic gene, peritrophin--48, from the myiasis fly *Chrysomya bezziana*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 31: 919–932.
- WARDHANA, A.H., E. WIDYASTUTI, W.A. SUPRATMANA, S. MUHARSINI dan DARMONO. 2004. Uji efikasi ekstrak heksan daging biji srikaya (*Annona squamosa*) terhadap pertumbuhan larva lalat *Chrysomya bezziana* secara *in vitro*. *JITV* 9(4): 272–280.
- WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI dan SUHARDONO. 2003. Koleksi dan kejadian myiasis yang disebabkan oleh Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana* di daerah endemis di Indonesia. *Pros. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner*. Bogor, 29–30 Sept. 2003. Puslitbang Peternakan. hlm. 235–239.
- WATERHOUSE, D.F. 1940. Studies of the physiology and toxicology of blowflies. 5. The hydrogen ion concentration in the alimentary canal. *CSIRO Pamphlet* 102: 7–27.
- WIJFFELS, G., C.H. EISEMANN, G. RIDING, R.D. PEARSON, A. JONES, P. WILLADSEN and R.L. TELLAM. 2001. A novel family of chitin binding proteins from insect type II peritrophic matrix: cDNA sequences, chitin binding activity and cellular localization. *J. Biol. Chem.* 276: 15537–15536.
- WIJFFELS, G., T. VUOCOLO, S. MUHARSINI. and F. SUPRIYANTI. 2000. Bacterial expression of larval peritrophins of *Chrysomya bezziana*. *JITV* 5: 170–176.
- WILLADSEN, P. 1999. Immunological control of ectoparasites: past achievement and future research priorities. *Gen. Anal. Biomolec. Engin.* 15: 131–137.
- WILLADSEN, P., C.H. EISEMANN and R.L. TELLAM. 1993. Concealed antigen: Expanding the range of immunological target. *Parasitol. Today* 9: 132–135.
- WILLADSEN, P., R.V. MCKENNA and G.A. RIDING. 1988. Isolation from cattle tick, *Boophilus microplus*, antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int. J. Parasitol.* 18: 183–189.
- YOUNG, A.R., E.N.T. MEEUSEN and V. M. BOWLES. 1996. Characterization of ES products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* during egg hatch. *Int. J. Parasitol.* 26: 245–252.