

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN SERUM ANTI-*WHOLE* PROTEIN
LARVA PADA DOMBA TERHADAP PERTAMBAHAN
BERAT BADAN LARVA *Musca domestica*
SECARA IN VITRO**



Oleh :

MAULANA HANIEF RACHMAN
NTM 060313140

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

**PENGARUH PEMBERIAN SERUM ANTI-*WHOLE* PROTEIN
LARVA PADA DOMBA TERHADAP PERTAMBAHAN
BERAT BADAN LARVA *Musca domestica*
SECARA IN VITRO**

Skripsi
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
Pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

MAULANA HANIEF RACHMAN
NIM 060313140

Menyetujui
Komisi Pembimbing



(Tatik Hernawati, M.Si., Drh.)
Pembimbing Pertama



(Poedji Hastutiek, M.Si., Drh.)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**PENGARUH PEMBERIAN SERUM ANTI-*WHOLE* PROTEIN
LARVA PADA DOMBA TERHADAP PERTAMBAHAN BERAT
BADAN LARVA *Musca domestica* SECARA IN VITRO**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 18 Juni 2007

Maulana Hanief Rachman
NIM. 060313140

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 18 Juni 2007

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

Sekretaris : Endang Suprihati, M.S., Drh.

Anggota : Retno Bijanti, M.S., Drh.

Pembimbing I : Tatik Hernawati, M.Si., Drh

Pembimbing II : Poedji Hastutiek, M.Si., Drh

Telah diuji pada

Tanggal : 25 Juni 2007

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

Anggota : Endang Suprihati, M.S., Drh.

Retno Bijanti, M.S., Drh.

Tatik Hernawati, M.Si., Drh.

Poedji Hastutiek, M.Si., Drh.

Surabaya, 28 Juni 2007

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh.
NIP. 130 687 305

**THE INFLUENCE OF SUPPLYING ANTI WHOLE PROTEIN LARVA
SERUM FROM SHEEP TOWARD WEIGHT GAINING OF
LARVA MUSCA DOMESTICA BY IN VITRO**

Maulana Hanief Rachman

ABSTRACT

This research was conducted as an effort to develop the myiasis vaccine by house fly (*Musca domestica*) larva in sheep. The research took an in vitro test to *Musca domestica* larva which was given by anti Whole Protein Larva (WPL) serum from sheep had been vaccinated with antigen from the body of house fly larva.

Musca domestica larva was extracted in PBS media for whole protein larva isolation. Then, the result was continued by elektroforesis with SDS PAGE to determine the molecular weight from whole protein fraction. Then, the whole protein larva (WPL) was injected into two sheep in subcutaneous with three times booster in two weeks after vaccination. The collecting of anti whole protein larva serum was conducted to test its influence when it was given to *Musca domestica* larva by in vitro test.

Anti whole protein larva serum and control serum from the sheep were added into media where *Musca domestica* larva were developed. The growth of larva was measured by observing the weight changes of larva by three treatments : control, P (I) and P (II).

Result of in vitro test showed that mean weight of larva control were $0,022 \pm 0,004$ g and decreased 18,18 % into $0,018 \pm 0,006$ g, P (I) decreased 68 % and larva P (II) decreased 50 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan makalah skripsi ini hingga selesai. Pada kesempatan kali ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Prof. Romziah Sidik, Ph.D., Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ibu Tatik Hernawati, M.Si., Drh., selaku dosen pembimbing pertama atas saran, dukungan, semangat dan bimbingannya sehingga penulis dapat menyelesaikan makalah ini sampai tuntas, juga kepada Ibu Poedji Hastutiek, M.Si., Drh., selaku pembimbing kedua atas semua bimbingan, bantuan, dan arahan yang tak ternilai selama penelitian ini.

Dosen penguji penulisan skripsi Prof. Dr. Fedik A Rantam, Drh., Endang Suprihati, MS.,Drh., Retno Bijanti, MS.,Drh., atas waktu, saran dan perhatiannya yang sangat berharga.

Seluruh staf pengajar dan karyawan Bagian Parasitologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu kelancaran jalannya penelitian.

Bapak Mufasirin, M.S., Drh dan Bapak Bashori yang telah menyediakan tempat peternakan domba guna proses pemeliharaan, dan perlakuan terhadap ternak peneliti.

Drs. Achmad Afandy dan Sri Wahyu Utami S.Pd., selaku orang tua dan Eva Rosyida saudara tercinta atas dukungan, doa, bantuan baik secara moral maupun materi.

Sahabat Yudhi, Bastian, dan Sri Nuryani serta seluruh teman-teman penulis di FKH UNAIR, khususnya angkatan 2003, serta semua pihak yang telah membantu baik secara langsung atau tidak langsung.

Akhirnya penulis menyadari sepenuhnya bahwa makalah ini masih sangat jauh dari kata sempurna. Saran dan masukan yang membangun sangat penulis harapkan bagi penyempurnaan makalah ini.

Surabaya, Mei 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN.....	ii
HALAMAN IDENTITAS.....	iii
ABSTRACT.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Landasan Teori.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
1.6 Hipotesis.....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Tinjauan Tentang Lalat <i>Musca domestica</i>	7
2.1.1 Etiologi	7
2.1.2 Morfologi lalat <i>M. Domestica</i>	7
2.1.3 Siklus hidup.....	8
2.2 Tinjauan Tentang Myiasis.....	11
2.3 Antigen Parasit.....	14
2.4 Antibodi.....	16
2.5 Respon Imun.....	17
2.6 Imunisasi.....	18
BAB III. MATERI DAN METODE	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2 Sampel Penelitian.....	23
3.2.1 Rearing Lalat <i>Musca domestica</i>	23
3.2.2 Koleksi larva Lalat <i>Musca domestica</i>	23
3.2.3 Sonikasi Sampel Protein Larva lalat <i>Musca domestica</i>	24
3.2.4 Pengukuran Berat Molekul <i>Whole Protein Larva Musca domestica</i>	24
3.2.5 Imunisasi pada Domba	27
3.2.6 Percobaan Laboratorium pada Larva Lalat <i>Musca domestica</i>	27
3.3 Analisis Data	28

BAB IV. HASIL PENELITIAN	30
4.1 Rearing Larva <i>Musca domestica</i>	30
4.2 Penentuan Kadar <i>Whole Protein Larva Musca domestica</i>	30
4.3 Hasil Pengukuran Berat Molekul <i>Whole Protein Larva Musca domestica</i> dengan SDS-PAGE.....	30
4.4 Percobaan Laboratorium pada Larva Lalat <i>M. domestica (In vitro bioassay)</i> dengan Uji penurunan berat	31
 BAB V. PEMBAHASAN	 36
 BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	 41
4.1 Kesimpulan.....	41
4.2 Saran	41
 RINGKASAN	 42
 DAFTAR PUSTAKA	 45
 LAMPIRAN	 49

DAFTAR TABEL

Tabel

1. Rerata Berat Larva pada Penimbangan Harian (g).....	32
2. Cara Kerja (Prosedur) Pemeriksaan Kadar <i>Whole Protein</i> Larva Lalat <i>M. domestica</i>	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Lalat Dewasa	10
2. Siklus Hidup lalat <i>Musca domestica</i>	10
3. Larva Lalat pada Kasus Myiasis	14
4. Kandang Lalat	23
5. Kerangka Operasional Penelitian.....	29
6. Larva Instar 3 Lalat <i>M. domestica</i>	30
7. Hasil Elektroforesis <i>Whole Protein Larva M. domestica</i> dengan SDS PAGE 12 % Pewarnaan Perak Nitrat.....	31
8. Pola Rerata Berat Harian Larva pada Kontrol.....	33
9. Pola Rerata Berat Harian Larva pada Perlakuan I.....	34
10. Pola Rerata Berat Harian Larva pada Perlakuan II.....	35
11. Sampel Larva.....	49
12. Sonikator.....	49
13. Imunisasi dan Pengumpulan Serum Domba.....	49
14. Domba Penelitian.....	49
15. Media dan Perlengkapan Penelitian.....	49
16. Proses Penelitian.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara Kerja (Prosedur) dan Hasil Pemeriksaan Kadar <i>Whole</i> Protein Larva Lalat <i>M. Domestica</i>	50
2. Penghitungan Dosis Imunisasi pada Domba.....	51
3. Cara Kerja SDS –PAGE	52
4. Data Berat Larva <i>M. Domestica</i>	56
5. Analisis Nisbah Berat Larva hingga Hari Ke 4.....	57
6. Pola Berat Badan pada Media Pertama.....	60
7. Pola Berat Badan pada Media Kedua	63
8. Pola Berat Badan pada Media Ketiga	66

DAFTAR TABEL

Tabel

1. Rerata Berat Larva pada Penimbangan Harian (g).....	31
--	----

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Sebagaimana telah diketahui secara luas bahwa terdapat banyak sekali jenis serangga yang dianggap merugikan atau berpotensi merugikan bagi kehidupan manusia, salah satunya adalah serangga dari jenis lalat *Musca domestica*. Lalat *M. domestica* adalah serangga umum dengan spesies yang banyak terdapat di seluruh dunia. Selain daripada itu, lalat ini dianggap sebagai hama pengganggu karena merupakan vektor mekanis pada beberapa penyakit pada manusia dan hewan dan juga dapat menyebabkan myiasis (Moreira *et al.*, 2004). Keberadaan lalat pada beberapa wilayah di dunia perlu diperhatikan menyangkut dua faktor yaitu siklus hidup dan tingkat pertumbuhan yang tinggi (Carina *et al.*, 2004).

Lalat *M. domestica* dapat menyebabkan myiasis cutaneus pada beberapa hewan. Myiasis merupakan suatu infestasi larva lalat diptera pada manusia dan hewan pada periode tertentu hidup dalam jaringan hidup atau jaringan mati, substansi cairan tubuh atau pada makanan. Myiasis menurut lokasi/kerusakan yang terjadi dibagi atas 3 tipe : *cutaneus myiasis*, *body cavity myiasis* dan *accidental myiasis*. Berdasarkan pada sifat hidup larvanya myiasis dibagi atas *myiasis obligat* dan *myiasis fakultatif*. Menurut datangnya lalat dewasa yang akan meletakkan telur pada bagian tubuh inang dibagi atas lalat primer, sekunder dan tersier. Lalat *M. domestica* termasuk lalat yang akan memperparah kerusakan yang terjadi pada inang, myiasis yang terjadi termasuk fakultatif karena lalat ini masih bisa hidup pada tempat di luar tubuh hewan. Namun demikian lalat *M. domestica* dapat juga ditemukan pada kasus myiasis intestinal yang terjadi

pada manusia (Sehgal, *et. al.*, 2002). Luka akibat gigitan caplak *B. microplus* sebagai penyebab timbulnya myiasis tersebut mengundang datangnya sejumlah lalat yang hidup di sekitar ternak seperti *M. domestica* (Sigit, 1978). Pada beberapa kasus myiasis kuku yang ditemukan di Bogor dilaporkan bahwa selain larva lalat obligat yaitu *C. bezziana* dan *Booponus intonsus* juga ada *Sarcophaga* dan *Musca domestica* (Partoutomo, 2000).

Seringkali terjadi gangguan ketenangan, penyebaran penyakit dan keadaan myiasis yang ditimbulkan oleh serangga, maka dilakukan berbagai upaya untuk pengendalian yaitu menggunakan insektisida dan pelepasan pejantan mandul, namun cara pendekatan tersebut dalam industri peternakan semakin diperbaiki karena percepatan dan perkembangan serangga ini cukup luas. Metode pengendalian secara tradisional menggunakan bahan kimia dapat berhasil dengan baik, akan tetapi masalah residu bahan kimia yang berasal dari produk ternak yang menggunakan insektisida, akan mencemari lingkungan sekitarnya bahkan dapat menimbulkan resistensi. Dampak lain yang mungkin timbul dari penggunaan insektisida adalah matinya organisme yang bukan termasuk sasaran. Bahkan hewan yang menguntungkan manusiapun bisa terkena dampak negatifnya. Berdasarkan berbagai kekurangan inilah maka semakin besar munculnya dorongan untuk mencari metode pengendalian atau pencegahan yang lain.

Pengendalian myiasis secara biologi dengan melepaskan lalat jantan yang telah disterilkan dengan radiasi telah berhasil dilakukan di Amerika dan Mexico pada lalat *Cochliomyia hominivorax* (Krafsur *et al.*, 1985). Teknologi tersebut telah diadaptasi di Australia dan Papua New Guinea pada lalat *C. bezziana*,

namun cara ini dianggap terlalu mahal dan perlu informasi dasar tentang bioekologi lalat, oleh sebab itu muncul pemikiran untuk mencari alternatif pengendalian terhadap myiasis dengan cara vaksinasi.

Casa *et al.*, (1997) telah melakukan vaksinasi menggunakan antigen yang berasal dari usus lalat *L. cuprina*. Usus dilapisi oleh membran peritropik (MP) yang bersifat semipermeabel terdiri atas lapisan kitin, proteoglikan dan protein. Membran ini berfungsi memudahkan proses pencernaan dan melindungi sel epitel usus dari invasi mikroorganisme serta menimbulkan kekebalan tubuh inang, oleh karena protein dari MP ini dapat digunakan sebagai antigen vaksin. Domba yang divaksinasi menggunakan ekstrak kasar protein MP larva dapat mempengaruhi tanggap kebal anti-larva, sedangkan protein MP yang telah dimurnikan ketika disuntikkan pada domba, memberikan respon imun dengan cara menghambat perkembangan larva *L. cuprina*.

Satu pendekatan lain yang mungkin dilakukan adalah dengan melakukan vaksinasi inang agar dapat melawan infestasi serangga dengan menggunakan antigen yang berasal dari bagian tubuh serangga sendiri. Larva serangga dianggap stadium serangga yang paling mudah dan memungkinkan untuk dipakai dalam penelitian. Tubuh serangga terdiri atas kitin, proteoglikan dan protein. Dalam penelitian ini ingin dilakukan pemurnian protein dari larva *M. domestica* yang kemudian akan diinjeksikan pada domba untuk dapat menimbulkan respon imun dengan menghambat pertumbuhan larva *M. domestica* yang menginfestasi domba yang telah diimunisasi.

Penelitian untuk mendapatkan protein imunogenik larva *M. domestica* kemudian diaplikasikan sebagai bahan vaksin untuk myiasis cutaneus pada domba, menguji respon kekebalan pada domba terhadap larva *M. domestica* dan mengetahui pengaruh pemberian serum domba yang telah diimunisasi terhadap pertumbuhan larva *M. domestica* yang teraplikasi dalam penambahan berat badan. Hal inilah yang menjadi latar belakang penelitian ini, yaitu guna melihat dampak penghambatan pertumbuhan terhadap larva *M. domestica* yang disebabkan oleh pemberian antibodi domba yang mengandung serum anti-WPL (*Whole Protein Larva*).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang di atas maka rumusan masalah di dalam penelitian ini adalah :

Apakah serum anti-WPL (*Whole Protein Larva*) yang terdapat pada serum domba yang telah diimunisasi dengan antigen larva *M. domestica* dapat menghambat pertumbuhan larva *M. domestica* ?.

1.3. Landasan Teori

Lalat *M. domestica* dianggap sebagai hama pengganggu karena merupakan vektor mekanis pada beberapa penyakit pada manusia dan hewan dan juga dapat menyebabkan myiasis (Moreira *et al.*, 2004).

Menurut Jackson dan Opdebeeck (1990), sapi yang divaksin dengan antigen usus tengah caplak *B. microplus*, menyebabkan peningkatan yang berarti

pada imunoglobulin secara keseluruhan terutama Ig G1 dan Ig G2. Antibodi anti usus tengah (anti-GM) dari sapi yang telah divaksin menunjukkan bahwa Ig G1 dan Complemen berperan dalam melindungi sapi terhadap serangan caplak, sedangkan antibodi anti-GM jenis Ig G2 dan Ig M tidak ada peningkatan pada sapi yang divaksin atau tidak berperan sebagai pelindung. Respon imun humoral dan seluler berperan dalam menciptakan sistim kekebalan alami pada tubuh sapi untuk melawan caplak *B. microplus*.

Segala upaya juga telah dilakukan untuk mengurangi kerugian akibat infestasi lalat pada ternak antara lain dengan melihat perkembangan larva setelah pemberian vaksin secara *in vitro* dan *in vivo* (Partoutomo *et al*, 1998 ; Sukarsih *et al.*, 2000), teknik ini mengadaptasi dari penelitian pada lalat *Lucilia cuprina* yang telah dilakukan oleh Eisemann *et al.*, (1989). Penelitian pada lalat yang sama juga telah dilakukan oleh Eisemann *et al.*, (1990) melihat respon imun setelah pemberian antigen berupa larva.

Tellam dan Bowles (1997), telah melakukan vaksinasi dengan menggunakan bahan dari ekskretori dan sekreteri lalat *L. cuprina*. Bagian usus larva lalat *L. cuprina* yang disebut membran peritrofik mampu merangsang respon antibodi dan dapat menghambat perkembangan serta menimbulkan kematian. Vaksinasi telah dilakukan oleh Riding *et al.*, (2000) di Indonesia pada lalat *C. bezziana*, bahan protease serin sebagai antigen protektif cukup potensial pada lalat *C. bezziana* yang disuntikkan pada domba, pada uji *in vitro* dengan menggunakan serum domba yang telah divaksinasi tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan larva, sedang pada uji *in vivo* didapatkan penurunan berat larva, sedangkan

vaksinasi dengan membran peritrofik dari lalat *C. bezziana* memberikan respon imunologik yang efektif terhadap parasit yang ditunjukkan dengan penurunan bobot larva dan peningkatan mortalitas secara nyata.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan yang akan dicapai adalah :

Membuktikan peran serum anti-WPL *M. domestica* yang terdapat pada serum domba yang telah diimunisasi dengan antigen larva *M. domestica* sebagai penghambat pertumbuhan larva *M. domestica* dengan menggunakan uji *in vitro*.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan akan dapat :

- a. Memperoleh bukti bahwa antigen yang berupa *whole* protein dari larva *M. domestica* dapat digunakan sebagai bahan imunisasi pada domba untuk pencegahan myiasis cutaneus.
- b. Memberikan pertimbangan untuk pengembangan vaksin myiasis untuk pengendalian myiasis cutaneus.

1.6. Hipotesis

Terjadi penghambatan pertumbuhan dengan adanya penurunan rata-rata berat badan pada larva lalat *Musca domestica* yang mendapatkan perlakuan dengan penambahan serum dari domba yang telah di vaksin dengan antigen larva.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang Lalat *Musca domestica*

2.1.1. Etiologi

Musca domestica adalah lalat rumah atau sering disebut *housefly*, menurut Soulsby (1986) diklasifikasikan sebagai berikut :

Filum : Arthropoda

Kelas : Insecta

Ordo : Diptera

Famili : Muscidae

Genus : *Musca*

Spesies: *Musca domestica*

2.1.2. Morfologi lalat *M. domestica*

Menurut Soulsby (1986) *M. domestica* berukuran sebesar biji kacang tanah, berwarna hitam kekuningan. Lalat jantan berukuran panjang tubuh 5,8 - 6,5 mm dan lalat betina berukuran panjang tubuh 6,5 - 7,5 mm. Tubuh terbagi menjadi tiga bagian yaitu kepala dengan sepasang antena, thorak dengan tiga pasang kaki dan sepasang sayap serta abdomen. Lalat ini secara umum mempunyai ciri berwarna kelabu, bagian thorax berwarna abu-abu kekuningan sampai gelap dan mempunyai empat baris hitam longitudinal dengan lebar yang sama dan membentang sampai ke tepi skutum. Abdomen ditandai dengan warna dasar kekuningan serta didapatkan garis hitam di bagian median yang akan difus sampai

di segmen keempat. Pada lalat betina disamping ciri tersebut juga terdapat garis hitam yang difus di kedua sisi abdomen.

Kepala *M. domestica* relatif besar dengan dua mata majemuk yang bertemu di garis tengah untuk lalat jantan, sedang lalat betina dua mata majemuk terpisahkan oleh ruang muka. Bentuk mulut disesuaikan dengan jenis makanan yang berupa cairan. Bagian mulut lalat digunakan sebagai alat penghisap makanan yang disebut dengan labium. Pada ujung labium terdapat labella yang menghubungkan antara labium dengan rongga tubuh (*haemocoele*) (Soulsby, 1986).

2.1.3. Siklus hidup

Lalat *M. domestica* mempunyai metamorfosis yang sempurna meliputi telur, larva, pupa kemudian lalat dewasa. Lalat betina biasanya meletakkan telur secara berkelompok pada feses yang segar. Telur-telur tersebut biasanya terdiri dari empat kelompok, dimana tiap kelompok kurang lebih berjumlah 100-150 butir telur pada setiap kali peneluran (Hall, 1972)

Jumlah telur yang dihasilkan oleh satu ekor lalat betina dalam satu siklus hidupnya (sekitar 2,5 bulan) berkisar antara 600-1000 butir telur (Richard dan Davies, 1977). Lalat betina bertelur lima hingga enam kali selama hidupnya (Georgi dan Georgi, 1990).

Telur lalat menetas dalam waktu 24 jam dan berkembang menjadi larva berukuran 12 mm dalam waktu 3-7 hari tergantung temperatur lingkungan dan setelah mengalami pergantian kulit sebanyak tiga kali, larva akan berkembang

menjadi pupa. Stadium pupa berlangsung antara 3-26 hari tergantung temperatur sekitarnya dan akhirnya segera menjadi lalat dewasa (Hall, 1972; Soulsby, 1986).

Pada temperatur 25-35°C telur menetas dalam kurun waktu 8-12 jam. Larva instar I mempunyai panjang 2 mm, stadium ini berlangsung selama 24-36 jam tergantung pada temperatur dan tempat yang cocok. Larva instar II berlangsung selama 24 jam pada temperatur 25-35°C, yang kemudian dilanjutkan dengan larva instar III yang berlangsung selama 3-4 hari pada temperatur 35°C yang berukuran 12 mm (Richard dan Davies, 1977)

Larva lalat pada media feses ayam broiler didapatkan sebanyak 464 ekor jauh lebih banyak dibandingkan dalam media feses sapi, kambing dan kuda. Feses ayam broiler memiliki kandungan bahan kering 20,984 %, abu 3,196 %, protein kasar 6,156 %, serat kasar 3,376 % dan BETN 5,914 % (Dharmawati, 2005). Kandungan air yang tinggi merupakan tempat yang paling disukai oleh lalat (Murtijo, 1992).

Segera setelah stadium larva selesai, larva bermigrasi ke daerah yang lebih kering untuk menjadi pupa. Lalat dewasa hidup hanya beberapa minggu pada musim panas tetapi lebih lama pada cuaca dingin.

Fertilisasi dan oviposisi berlangsung beberapa hari setelah lalat muda keluar dari pupa dan menjadi lalat dewasa. Siklus lengkap menjadi lalat dewasa dapat berlangsung kira-kira delapan hari pada temperatur 33-35 °C sehingga sejumlah generasi berkembang pada musim panas (Richard dan Davies, 1977).

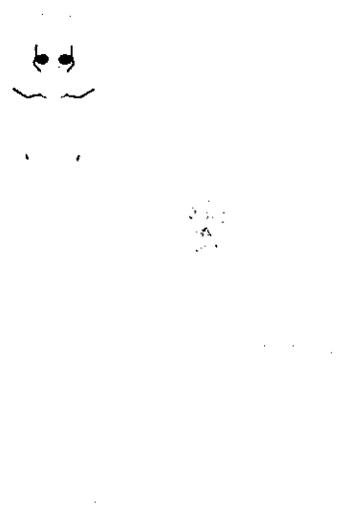
Keberadaan lalat ini di dunia perlu diperhatikan dengan 2 faktor penting yaitu siklus hidup dan tingkat pertumbuhan yang tinggi. Tingkat pertumbuhan

secara umum dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Suhu merupakan faktor lingkungan yang penting untuk pertumbuhan populasi *M. domestica*, khususnya di daerah equator dan tropis, dimana menunjukkan tingginya jumlah spesies. Suhu mempengaruhi siklus hidup dari insekta, termasuk *M. domestica* (Chapman dan Goulson, 2000).

Musca domestica adalah spesies lalat yang banyak terdapat diseluruh dunia dan di dunia kedokteran hewan merupakan vektor mekanis pada beberapa penyakit (Levine dan Levine, 1991). Telur, larva, dan pupa dapat bertahan hidup terhadap cuaca dingin tertentu sehingga dapat bertahan hidup dan ini bertanggung jawab atas populasi lalat pada musim berikutnya (Soulsby, 1986)



Gambar. 1. Lalat Dewasa



Gambar.2. Siklus Hidup lalat
Musca domestica

2.2. Tinjauan tentang Myiasis

Myiasis atau belatungan adalah infestasi larva lalat pada jaringan tubuh hewan hidup dan manusia. Larva atau biasa disebut belatung ini hidup dari makanan yang berupa jaringan hidup, jaringan nekrotik atau bahan makanan yang sedang dicerna di dalam saluran pencernaan inang pada kasus myiasis intestinal (Sigit, 1978)

Terdapat berbagai macam kerugian yang disebabkan oleh lalat, salah satu dari kerugian tersebut adalah adanya kemungkinan terjadinya myiasis atau belatungan yang disebabkan oleh lalat. Myiasis telah terdapat di Indonesia sejak lama. Myiasis sebagai masalah penyakit dilaporkan pada ternak lokal yang dipelihara secara semiintensif di NTT (Nusa Tenggara Timur), NTB (Nusa Tenggara Barat), Sulawesi Selatan dan Sulawesi Utara, sedangkan pada ternak yang dipelihara secara intensif seperti di P. Jawa, Madura dan Bali tidak banyak dilaporkan (Partoutomo, 2000)

Menurut jenisnya, lalat penyebab myiasis ada yang dikenal sebagai myiasis obligat atau belatung hanya dapat hidup di dalam jaringan inang. Larva ini dikenal

Di Indonesia terdapat dua jenis myiasis obligat ialah *klawmyiasis* atau *hoofmyiasis* yang disebabkan oleh lalat *Booponus intonsus*, penyebab myiasis pada kuku sapi di Minahasa dilaporkan terjadi pada tahun 1926, sedangkan penyebab myiasis lain yang mempunyai penyebaran luas hampir di seluruh Indonesia adalah *C. bezziana* pada ternak lokal yang dipelihara secara semiintensif atau ekstensif di daerah Nusa Tenggara dan Sulawesi bahkan mencapai 20 % pada ternak penarik yang terkena myiasis kuku (Muchlis dan Partoutomo, 1971)

Myiasis cukup menarik perhatian ketika sekitar 10 % sapi Brahman dan Brahman cross asal Australia yang dipelihara dalam sistim ranch di Sulawesi Selatan dan Sumba Timur terserang myiasis. Masalah myiasis juga ditemukan pada domba Merino yang dipelihara di daerah Bogor dan Jakarta, walaupun domba itu dipelihara secara intensif tetapi kejadian myiasis tidak dapat dicegah. Kejadian yang sama juga dilaporkan pada kuda *ponie sandelwood* yang dilaporkan rentan terhadap myiasis (16 %) (Sukarsih dkk., 1989). Kejadian myiasis untuk pertama kali dilaporkan pada sejumlah kuku (*klawmyiasis*) sapi di Sulawesi Utara pada tahun 1926, myiasis ini disebabkan oleh lalat *B. intonsus*. Dewasa ini myiasis jenis ini tidak menimbulkan masalah karena hanya terbatas di daerah Minahasa, populasi lalat tidak tinggi dan luka akibat myiasis ini yang biasa terjadi pada musim kering, secara spontan sembuh saat musim hujan tiba (Sigit, 1978).

Kejadian myiasis lain yang cukup punya arti ekonomis adalah myiasis yang disebabkan oleh *C. bezziana*, jenis ini lebih patogen dan mempunyai penyebaran

luas. Pada beberapa kasus myiasis kuku yang ditemukan di Bogor dilaporkan bahwa selain larva lalat obligat yaitu *C. bezziana* dan *B. intonsus* juga ada lalat *Sarcophaga* dan *Musca domestica*. Selain daerah kuku yang biasa diserang oleh lalat juga pada pusar pada anak sapi bali yang baru lahir (Sukarsih dkk., 1989). Serangan myiasis pada daun telinga kerbau bagian dalam di daerah Wajo, Sulawesi Selatan, bahkan tidak jarang berakibat putusnya daun telinga (Sembiring, 1991), myiasis juga dapat menyerang daerah vulva, anal dan rahang bawah. Di NTB kejadian myiasis cukup banyak dilaporkan pada sapi, kerbau, ayam, kuda dan babi.

Faktor pendorong terjadinya myiasis antara lain adanya agen penyakit, inang yang peka, lingkungan yang mendukung serta manajemen yang buruk. Sigit (1978), mengatakan bahwa kasus myiasis di Sulawesi Selatan digolongkan myiasis traumatika, myiasis yang didahului oleh adanya trauma pada bagian tubuh, dimulai adanya luka bekas gigitan caplak, luka ini menarik lalat primer untuk hinggap dan meletakkan telur. Telur diletakkan di pinggir luka, dan setelah telur menetas larva menembus jaringan sampai jauh ke dalam dari proses inilah dikenal istilah "*screwworm fly*". Luka tersebut mengundang datangnya sejumlah lalat yang hidup di sekitar ternak seperti *M. domestica*. Selain akibat gigitan caplak, myiasis muka dan badan juga terjadi akibat pemberian tanda (*cattle brands*), pemotongan ekor (*butt of tail*). Pada sapi dan babi myiasis dapat terjadi pada leher, telinga dan pusar (Sukarsih dkk., 1989).

Masalah myiasis yang muncul pada ternak import ternyata lebih peka dibandingkan ternak lokal, maka diperkirakan penyakit ini dapat menjadi

ancaman apabila kemudian hari dikembangkan peternakan domba, sapi, kerbau dan kambing secara modern dengan sistim *ranch*, terutama apabila bibit berasal dari luar negeri.

Lalat rumah merupakan parasit yang dapat menyerang hewan maupun manusia. Lalat ini bertindak sebagai lalat pengiring pada kejadian myiasis pada beberapa lokasi di Indonesia. Distribusinya lalat rumah meliputi daerah sub-tropis dan tropis di seluruh dunia. Kerugian yang ditimbulkan terhadap kesehatan manusia dan hewan serta biaya yang dihubungkan dengan pengendalian terhadap lalat *M. domestica* ternyata cukup besar.



Gambar 3. Larva Lalat pada Kasus Myiasis

2.3. Antigen Parasit

Istilah antigen sering kali muncul di dalam penulisan skripsi ini, pengertian antigen secara umum adalah substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing (*non self*) oleh sistim imun tubuh atau benda asing yang diukur berdasarkan kemampuan dalam mengikat antibodi (Abbas *et al.*, 2000). Antigen merupakan suatu bahan yang dapat bereaksi dengan produk respon imun dan merupakan sasaran respon imun (Baratawidjaya, 2000). Antigen dapat berasal dari organisme

atau molekul asing bagi tubuh. Tidak setiap bagian dari antigen dapat berinteraksi dengan molekul sistem imun. Bagian dari antigen secara langsung berikatan dengan molekul reseptor (seperti antibodi) yang dikenal dengan nama epitop.

Imunogen adalah suatu bahan atau molekul yang dapat menimbulkan respon imun humoral atau selular. Protein merupakan antigen yang terbaik karena ukuran dan kerumitan struktur, hampir semua protein yang mempunyai berat molekulnya (BM) lebih besar dari 10.000 Dalton (Da) adalah antigenik (Tizard, 1982).

Secara kimiawi zat imunogen parasit dapat berupa protein, lipida, karbohidrat, glikoprotein dan glikolipida. Menurut Anders *et al.*, (1982) setiap komponen kimiawi tersebut mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai dan jumlah determinan yang mungkin berbeda, sebagian antigen yang dihasilkan parasit dapat memicu respon imun inang (*host protective antigen*).

Antigen yang berasal dari parasit terdapat berbagai macam jenis yang dirinci berdasarkan sumber dan lokasi parasit maupun siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit terdiri dari : 1) exoantigen terlarut, berasal dari parasit hidup atau parasit dalam media buatan merupakan produk ekskresi berupa metabolit; 2) antigen somatik terlarut, berasal dari parasit stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati/fragmen tubuhnya; 4) parasit yang hidup secara utuh; 5) cairan tubuh parasit; 6) cairan kista larva. Berdasarkan siklus hidup parasit terdiri dari : 1) spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; 2) parasit yang mengalami perubahan bentuk (Tizard, 1982).

Pada lalat *M. domestica*, pengamatan terhadap protein lalat tersebut dapat dilakukan pada telur, larva pada berbagai instar (L1, L2, L3) dan dewasa. Pada stadium larva dan dewasa yang sering digunakan adalah eksresi-sekresi sebagai antigen, disamping itu juga ada beberapa sumber yang dipakai misal antigen somatik, *surface* antigen, ekstrak larva dan dewasa.

2.4. Antibodi

Antibodi adalah protein imunoglobulin yang disekresikan oleh limfosit B (sel B) yang teraktifasi oleh antigen pada sistim imun adaptif (Abbas *et al.*, 2000). Antibodi memiliki kemampuan berikatan khusus dengan antigen serta mempercepat penghancuran dan penyingkiran. Antibodi terdapat dalam berbagai cairan tubuh tetapi terdapat dalam konsentrasi tertinggi dan mudah diperoleh dalam jumlah banyak untuk analisis adalah dari serum darah .

Protein serum terlarut yang dihasilkan sebagai akibat keberadaan imunogen ini beredar di seluruh jaringan dan sirkulasi darah. Bila darah dibiarkan membeku, akan meninggalkan serum yang mengandung berbagai bahan larut tanpa sel. Bahan tersebut adalah molekul antibodi yang digolongkan protein yang disebut globulin atau lebih dikenal sebagai imunoglobulin yaitu suatu protein yang mempunyai aktivitas antibodi (Bellanti, 1993).

Tipe imunoglobulin yang umum diketahui ada 5 tipe yaitu M (makrogobulin), G, A, D dan E yang bertanggung jawab atas keberadaan antigen. Adapun fungsi antibodi ada dua yaitu : 1) mengikat imunogen, 2) berinteraksi

dengan jaringan inang dan sistim efektor untuk fasilitas penolakan imunogen (Abbas *et al.*, 2000).

Secara umum pada infeksi parasit yang berperan adalah imunoglobulin E (Ig E), sedangkan imunoglobulin G adalah imunoglobulin yang terdapat dalam konsentrasi tertinggi (9 mg/ml) dalam serum darah, dan karena itu memainkan peran utama dalam mekanisme pertahanan yang diperantarai oleh antibodi, karena ukuran yang relatif kecil maka zat ini mudah keluar dari pembuluh darah dibandingkan molekul imunoglobulin yang lain dan cepat mengambil bagian utama dalam mekanisme pertahanan pada jaringan dan permukaan tubuh. Imunoglobulin G dapat melakukan opsonisasi, aglutinasi dan presipitasi antigen, dapat mengaktifasi kaskade komplemen bila telah terkumpul cukup banyak molekul dalam konfigurasi yang tepat pada permukaan antigen (Abbas *et al.*, 2000).

2.5. Respon Imun

Respon imun adalah suatu sistim untuk menjaga homeostasis tubuh dan mempertahankan terhadap invasi penyakit. Kekebalan (imunitas) yang timbul merupakan reaksi tubuh terhadap benda asing secara molekular maupun seluler (Rantam, 2003). Respon tubuh mencakup semua mekanisme fisiologis yang membantu tubuh mengenal benda asing, untuk menetralkan, menyisihkan atau memetabolisme benda asing tersebut dengan atau tanpa kerusakan pada jaringan sendiri (Bellanti, 1993). Tidak semua suntikan antigen menimbulkan respon imun, ini tergantung dosis, waktu pemberian dan sifat antigen (Baratawidjaya, 2000).

Respon imun terdiri atas respon imun spesifik dan non spesifik. Respon imun spesifik (*Adaptive immunity*) merupakan reaksi inang terhadap benda asing yang mencakup rangkaian interaksi seluler yang diekspresikan dengan penyebaran produk spesifik. Respon imun non spesifik (*Innate immunity*) merupakan pertahanan terdepan dalam menghadapi serangan berbagai macam organisme yang memberikan respon langsung terhadap antigen (Abbas *et al.*, 2000).

2.6. Imunisasi

Imunisasi merupakan pemberian antigen yang diperoleh dari agen menular pada hewan sehingga tanggap kebal ditingkatkan dan tercapai resistensi terhadap agen menular (Tizzard, 1988). Imunisasi dilakukan sebagai upaya pengendalian untuk mengurangi infestasi serangga, dimana salah satu pendekatannya dengan melakukan imunisasi inang menggunakan antigen yang berasal dari bagian tubuh serangga sendiri. Imunisasi ini dilakukan sebagai kontrol terhadap ektoparasit secara imunologis, diantaranya yang telah dilakukan untuk melawan infestasi caplak dan lalat.

Imunisasi pada hewan maupun manusia akan menghasilkan respon imun spesifik dan non spesifik. Secara normal imunisasi akan menghasilkan antibodi yang spesifik terhadap molekul yang cocok terhadap pengenalan dan pengikatan antigen. Molekul ini terakumulasi dalam darah dan dapat digunakan sebagai reagen untuk teknik imunologi seperti diagnosis, analisis respon imun, analisis imunoglobulin serta teknik lainnya (Rantam, 2003).

Ada dua cara untuk membuat hewan kebal terhadap penyakit menular yaitu imunisasi aktif dan imunisasi pasif. Pada imunisasi pasif menghasilkan resistensi sementara dengan memindahkan antibodi dari hewan resisten ke hewan rentan. Antibodi ini memberikan perlindungan cepat, tetapi cepat dikatabolisis. Pada imunisasi aktif akan menghasilkan perlindungan yang berlangsung lama (Tizzard, 1988).

Ada dua macam vaksin yang digunakan di dalam imunisasi aktif yaitu vaksin hidup dan vaksin mati, keduanya mempunyai kelebihan dan kekurangan. Vaksin aktif bersifat imunitas kuat, tidak memerlukan *adjuvant*, tidak stabil dalam penyimpanan, dapat bereplikasi di dalam sel. Vaksin mati bersifat mantap dalam penyimpanan, tidak dapat bereplikasi di dalam tubuh sehingga cenderung menghasilkan tanggap kebal yang lebih rendah dibandingkan vaksin hidup (Tizzard, 1988).

Dalam proses imunisasi dimasukkan antigen secara berulang-ulang sehingga dihasilkan serum hiperimun atau antibodi poliklonal (Smith, 1995), untuk memproduksi serum hiperimun hewan harus diimunisasi dengan sengaja sehingga dalam pemanenan didapatkan titer antibodi yang tinggi. Dalam mendapatkan titer antibodi yang tinggi perlu ditambahkan *adjuvant* komplit pada saat imunisasi, diulang dengan menggunakan *adjuvant* inkomplit beberapa kali untuk mempercepat laju antibodi poliklonal (Tizzard, 1988).

Adjuvant adalah substansi-substansi tertentu yang dapat meningkatkan efektifitas imunologis dari agen pengimunisasi secara tidak spesifik. *Adjuvant* mempunyai sifat-sifat tertentu sebagai karakteristiknya terutama membuat depot

antigen dan melepas antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang pemaparan antigen dengan sistem imun dan memacu sistem imun dengan afinitas tinggi (Baratawidjaya, 2002). Salah satu *adjuvant* yang sering digunakan adalah *Freund's Complete Adjuvant* dan *Freund's Incomplete Adjuvant* yang digunakan sebagai *booster*. *Freund's Adjuvant* terdiri atas campuran minyak mineral dan pengemulsi dengan mikobakteria (FCA) atau tanpa mikobakteria (FIA) (Smith, 1995).

Segala upaya juga telah dilakukan untuk mengurangi kerugian akibat infestasi lalat pada ternak antara lain dengan melihat perkembangan larva setelah pemberian vaksin secara *in vitro* dan *in vivo* (Partoutomo *et al*, 1998 ; Sukarsih *et al.*, 2000), teknik ini mengadaptasi dari penelitian pada lalat *Lucilia cuprina* yang telah dilakukan oleh Eisemann *et al.*, (1989). Penelitian pada lalat yang sama juga telah dilakukan oleh Eisemann *et al.*, (1990) melihat respon imun setelah pemberian antigen berupa larva. Tellam dan Bowles (1997), telah melakukan vaksinasi dengan menggunakan bahan dari ekskretori dan sekreteri lalat *L. cuprina*. Bagian usus larva lalat *L. cuprina* yang disebut membran peritrofik mampu merangsang respon antibodi dan dapat menghambat perkembangan serta menimbulkan kematian (Willadsen, 1993). Vaksinasi telah dilakukan oleh Riding *et al.*, (2000) di Indonesia pada lalat *C. bezziana*, bahan protease serin sebagai antigen protektif cukup potensial pada lalat *C. bezziana* yang disuntikkan pada domba, pada uji *in vitro* dengan menggunakan serum domba yang telah divaksinasi tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan larva, sedang pada uji *in vivo* didapatkan penurunan bobot larva, sedangkan vaksinasi dengan

membran peritrofik dari lalat *C. bezziana* memberikan respon imunologik yang efektif terhadap parasit yang ditunjukkan dengan penurunan bobot larva dan peningkatan mortalitas secara nyata.

Imunisasi dengan menggunakan antigen yang mengandung protein dari kelenjer ludah lalat *Haematobia irritans*, menunjukkan bahwa respon antibodi sapi yang terserang oleh lalat tanduk ini mempunyai efek immunomodulatori pada inang. Respon ini ditandai dengan meningkatnya Ig G. Daya tahan imunisasi tersebut selain untuk lalat tanduk juga untuk melindungi dari ektoparasit lain (Baron dan Lysyk, 1995).

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai dari bulan Mei 2006 sampai dengan bulan Desember 2006. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Entomologi Veteriner, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu :

1. *Rearing* lalat *M. domestica*
2. Koleksi larva lalat *M. domestica*
3. Isolasi *whole* protein larva lalat *M. domestica*
4. Identifikasi profil *whole* protein larva lalat *M. domestica*
5. Imunisasi pada domba
6. Percobaan laboratorium pada larva lalat *M. domestica* dan lapangan pada domba.

3.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah lalat *M. domestica* dewasa jantan dan betina strain WHO yang diperoleh dari hasil pembiakkan lalat di Laboratorium Entomologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Berawal dengan stadium pupa kemudian dilakukan *rearing* lalat di dalam kandang buatan.

3.2.1. Rearing Lalat *Musca domestica*

Lalat dewasa diletakkan dalam kandang berukuran 40 x 40 x 40 cm, penelitian dilakukan dengan *merearing* satu generasi lalat yang berlangsung secara lengkap. Lalat jantan dan betina diletakkan dalam kandang lalat agar dapat melakukan perkawinan secara alami. Lalat dewasa akan diberi pakan berupa air gula 10 %, vitamin dan susu, hingga terjadi perkawinan dan lalat betina yang gravid siap untuk meletakkan telur. Telur diletakkan pada malam hari pada perangkat peletakan telur yang telah disiapkan di kandang. Telur-telur lalat yang dihasilkan dari perkawinan lalat jantan dan betina dipelihara di dalam kandang lalat.



Gambar. 4. Kandang Lalat

3.2.2. Koleksi larva lalat *M. domestica*

Telur yang dihasilkan dipisahkan dalam tempat tersendiri. Telur yang telah menetas menjadi larva 1 dipisahkan dan diletakkan dalam wadah tersendiri, pada tempat tersebut disediakan juga makanan untuk larva. Identifikasi larva

menggunakan kunci identifikasi menurut Hastutiek (2005). Larva 1 yang telah menjadi larva instar 3 kemudian di masukkan dalam tabung dan disimpan dalam refrigerator pada suhu 4 °C untuk kemudian dilakukan isolasi *whole* protein dan identifikasi profil *whole* protein larva *M. domestica*. Larva tersebut akan digunakan untuk mensuplai bahan-bahan pada percobaan imunisasi, demikian juga dengan lalat dari generasi baru.

3.2.3. Sonikasi Sampel Protein larva lalat *M. domestica*

Sebanyak 100 ekor larva lalat *M. domestica* dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah diisi PBS sebanyak 2 ml kemudian dihancurkan dengan cara sonikasi menggunakan sonikator selama 4 menit dan istirahat 2 menit sebanyak 10 kali, dengan frekwensi getaran 20 kHz (20 ribu putaran tiap detik). Saat disonikasi tabung reaksi direndam dalam gelas berisi es batu dan garam, hal ini dimaksudkan untuk meredam panas yang timbul saat disonikasi. Larutan hasil sonikasi disentrifuse dengan kecepatan 16.000 rpm selama 5 menit, kemudian diambil supernatannya. Keseluruhan supernatan dikumpulkan dan dihitung total proteinnya dengan spektrofotometer untuk menentukan dosis imunisasi. Supernatan diambil dan disimpan pada suhu – 20 °C dan siap untuk dilakukan fraksinasi protein.

3.2.4. Pengukuran Berat Molekul *whole* protein larva lalat *M. domestica*

Pengukuran berat molekul *whole* protein larva lalat *M. domestica* dilakukan dengan SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electroforesis*).

Analisis *whole* protein terhadap larva dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dengan komposisi *separating gel* 12 % yang terdiri atas : 2,5 ml Acrylamide; 1,2 ml Tris-HCL pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5 %; 1,1 ml Aquadest, 50 μ l TEMED dan 30 μ l APS 10 %.

Pencetakan *separating gel* yaitu dengan cara mencampurkan bahan tersebut diatas sampai homogen dan dimasukkan dalam *glass plate* model biometra dan ditambahkan butanol 5 % di atas *separating gel* untuk meratakan bagian atas *separating gel*, kemudian diinkubasi dalam suhu kamar selama 25 menit. Langkah selanjutnya adalah butanol 5 % dibuang dan *separating gel* dicuci dengan menggunakan elektroforesis buffer yang telah diencerkan sepuluh kali, *separating gel* yang sudah jadi dalam *glass plate* dikeringkan dan bagian atas dibersihkan dengan kertas Whatmann.

Pencetakan *stacking gel* 5 % adalah dengan mencampurkan bahan *stacking gel* sampai homogen yaitu 0,66 ml Acrylamide; Bisacrylamid 0,8 % 0,33 ml ; 0,8 ml Tris-HCL pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5 %; 0,74 ml Aquadest; 4 μ l TEMED dan 20 μ l APS 10 %).

Penyiapan sampel. Sampel dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* sebanyak 10 μ l yang telah ditambahkan *laemly buffers* dengan perbandingan 1 : 1. Tabung *ependorf* dilubangi dengan jarum, kemudian dilakukan perebusan pada suhu 100 °C selama 5 menit untuk proses denaturasi.

Elektroforesis. *Glass plate* yang telah berisi gel dimasukkan dalam *chamber* Bio-metra dan dituangi elektroforesis *buffer* sebanyak kurang lebih 400 ml dan *marker* dimasukkan dalam sumuran yang telah terbentuk gel. Kemudian

dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffer* dengan 100 volt, 40 mA sampai marker dan sampel turun (kurang lebih 2 jam). Setelah *running* selesai, gel dilepas perlahan dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah diisi larutan pencuci.

Pencucian. Gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari Methanol 25 ml, Asam asetat 3,7 ml dan Aquadest ad 100ml. Digoyang di atas *shaker* selama 30 menit. Dilakukan pencucian ulang dengan larutan yang sama dengan pengurangan komposisi Methanol dan penambahan Asam asetat setengah dari volume selama 30 menit dan dilakukan pencucian dengan larutan Glutaraldehyd 10 % dan Aquadest selama 30 menit.

Pewarnaan. Perak nitrat ditimbang sebanyak 0,8 gram dan dicampur dengan 4 ml aquades. Kemudian campuran tersebut dimasukkan kedalam larutan yang terdiri dari NaOH 0,36 % 21 ml, NH_3 1,4 ml dan aquades 73, 5 ml. Larutan perak nitrat disaring saat dimasukkan kedalam larutan amoniak dan dilakukan dalam *stiter* agar tercampur homogen. Larutan dimasukkan dalam cawan petri berisi gel yang telah dicuci, di atas *shaker* selama 15 menit. Kemudian gel dicuci dengan aquades 2 x 2 menit tetap dalam *shaker*. Gel dipindahkan kedalam petri baru yang telah dimasukkan larutan pengembang yang terdiri dari 200 μl Zitronsaure 5 %, 100 μl Formaldehyd 3,7 % dan tambahkan Aquades sampai 200 ml. Ditunggu sampai pita pada gel mulai tampak kurang lebih selama 15 menit, setelah pita-pita protein terlihat, reaksi dihentikan dengan menambahkan Asam asetat 10%. Hasil gel yang telah tampak pita proteinnya disimpan dalam larutan Gliserol 10 % dan siap untuk didokumentasikan. Perhitungan berat molekul dilakukan

dengan membandingkan dengan standart marker (Axelsen, 1983 yang sudah dimodifikasi).

3.2.5. Imunisasi pada domba

Imunisasi dilakukan pada 1 ekor domba jantan berumur 1 tahun dengan berat badan 30 Kg. Hasil perhitungan total protein larva dengan spektrofotometer sebesar 17,06 mg/ml pada OD 540. Domba diimunisasi dengan *whole protein* larva lalat *M. Domestica* sebanyak 88 µl yang dilarutkan dalam PBS sampai 1 ml kemudian ditambahkan dengan *complete Freud's adjuvant* (1:1). Pengambilan darah dilakukan sebelum penyuntikan pertama sebagai kontrol.

Penyuntikan dilakukan pada domba secara subkutan di daerah paha dengan 3 kali *booster* yaitu pada dua minggu sesudah imunisasi dan *booster* kedua dilakukan dua minggu kemudian dengan dosis yang sama serta penambahan *Freud's incomplete adjuvant*. *Booster* dilakukan untuk meningkatkan pembentukan antibodi dan menghindari reaksi hipersensitivitas. Pengumpulan serum dilakukan untuk melihat respon antibodi setelah dilakukan Imunisasi. Serum yang telah dikumpulkan disimpan dalam freezer (-20 °C) sampai dibutuhkan kembali.

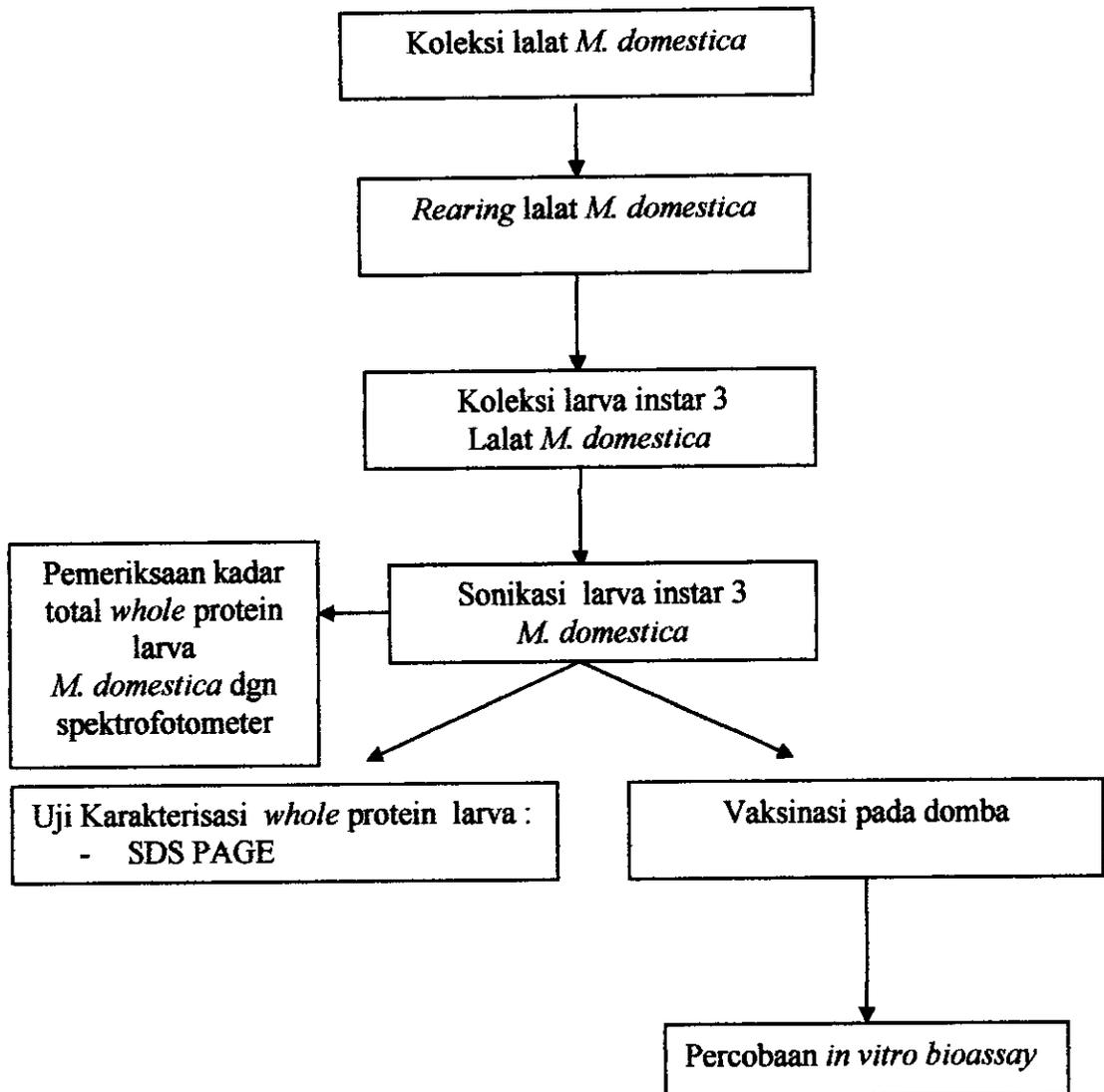
3.2.6. Percobaan laboratorium pada larva lalat *M. domestica*

Teknik *in vitro* diadopsi dari teknik yang digunakan untuk uji vaksin lalat myiasis yang disebabkan oleh *L. cuprina* di Australia (Eisemann *et al.*, 1990). Antigen berupa *Whole protein* larva dibuat vaksin dengan menggunakan *complete*

Freud's adjuvant. Respon larva dilihat melalui uji *in vitro* dengan menambahkan serum anti-WPL dan serum kontrol (serum domba tanpa imunisasi) dari hewan percobaan ke dalam medium tempat ditumbuhkan L3 lalat *M. domestica*. Efek imunisasi dilihat dengan uji perkembangan larva yang diberi serum anti-WPL dari domba yang telah diimunisasi dan larva yang diberi serum kontrol. Perkembangan larva diukur dengan melihat berat larva. Pada percobaan laboratorium ini serum anti-WPL hasil isolasi dari domba perlakuan memiliki titer antibodi dengan nilai rerata *Optical Density* (OD) 405 nm sebesar $2,0352 \pm 0,0338$ yang diukur menggunakan uji *indirect* ELISA oleh peneliti yang lain. Kontrol dilakukan dengan menumbuhkan 10 ekor larva pada media pakan ayam petelur 100 % seberat 4 gram dan serum kontrol dari domba sebanyak 3 cc. Selain kontrol ada dua perlakuan lain yaitu : perlakuan 1 (PI) adalah dengan menumbuhkan 10 ekor larva dengan pemberian serum anti-WPL 3 cc dalam media pakan ayam petelur 100 % seberat 4 gram ; perlakuan 2 (PII) adalah menumbuhkan 10 ekor larva dengan pemberian anti-WPL 3 cc dalam media pakan ayam petelur dan feses ayam petelur dengan perbandingan 3 : 1 dengan berat total 4 gram.

3.3 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini, ditabulasikan kemudian dianalisis dengan Analisis Regresi menggunakan *Statistical Program and Service Solution* (SPSS) real 10.0 for Windows. Untuk lebih jelas jalannya penelitian dapat dilihat pada Gambar 5 berikut ini :



Gambar 5. Kerangka Operasional Penelitian

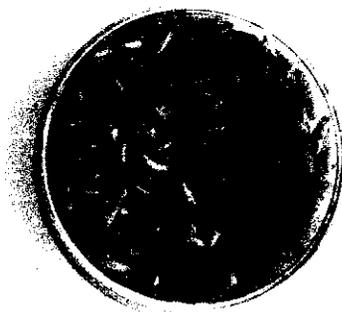
BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV HASIL PENELITIAN

4.1. *Rearing* Larva *Musca domestica*

Rearing lalat *M. domestica* telah dilakukan di laboratorium, telur lalat diletakkan sampai diperoleh larva, mulai larva instar 1 sampai larva instar 3, sebagian larva dikoleksi untuk ekstraksi *whole* protein larva, sebagian yang lain di-*rearing* sampai dewasa. Larva instar 3 dipilih karena memiliki ukuran tubuh besar sehingga memudahkan untuk identifikasi dan penanganan. Larva lalat untuk ekstraksi *whole* protein digabung dalam PBS, Larva instar 3 lalat *M. domestica* dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Larva Instar 3 Lalat *M. Domestica*

4.2. Penentuan Kadar *Whole* Protein Larva *M. domestica*

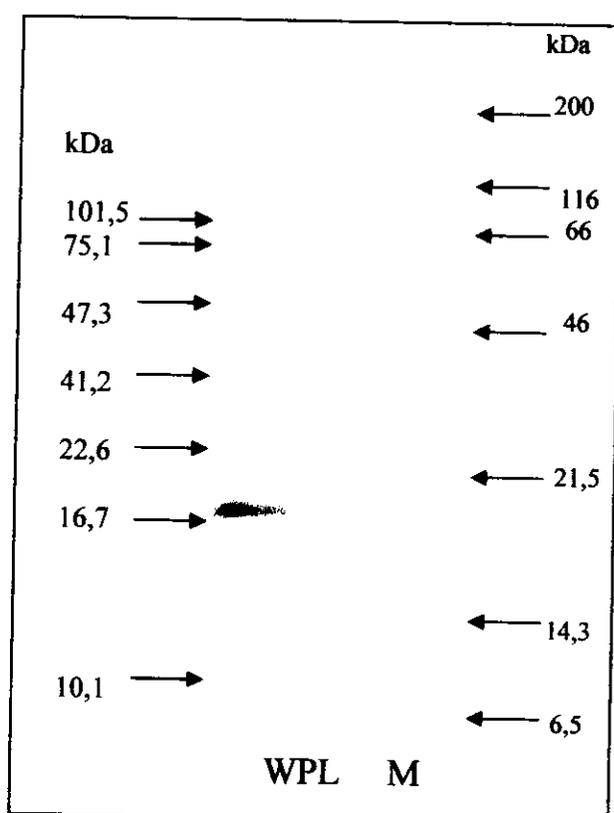
Hasil ekstraksi *whole* protein larva *M. domestica* diukur dengan alat spektrofotometer dengan OD₅₄₀, diketahui kadar proteinnya sebesar 17,06 mg/ml.

4.3. Hasil Pengukuran Berat Molekul *Whole* Protein Larva *M. domestica*

Metode SDS-PAGE

Tahapan ini adalah tahapan pendukung penelitian utama yang berguna untuk memberikan informasi tambahan tentang berat molekul *whole* protein larva.

Hasil fraksinasi *whole* protein larva *M. domestica* dengan menggunakan metode SDS PAGE 12 %, berupa separasi molekul berdasarkan berat fraksi protein yang tampak pada gel Polyacrylamid, telah didapatkan 7 fraksi protein yaitu : 101,5 kDa; 75,1 kDa; 47,3 kDa; 41,2 kDa; 22,6 kDa; 16,7 kDa dan 10,1 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Elektroforesis *Whole Protein Larva M. domestica* dengan SDS PAGE 12 % Pewarnaan Perak Nitrat
Keterangan : M = Marker ; WPL = *Whole protein larva*

4.4. Percobaan Laboratorium pada Larva Lalat *M. domestica* (*In vitro* bioassay) dengan Uji penurunan berat

Efek imunisasi dilihat dengan uji perkembangan larva diukur dengan melihat berat larva. Kontrol dilakukan dengan menumbuhkan larva pada media

pakan ayam petelur 100 % dan serum kontrol dari domba. Pada percobaan laboratorium ini selain kontrol (serum domba tanpa imunisasi) ada dua perlakuan lain yaitu : perlakuan 1 (PI) adalah larva dengan pemberian serum anti-WPL dalam media pakan ayam petelur 100 % ; perlakuan 2 (PII) adalah larva dengan pemberian serum anti-WPL dalam media pakan dan feses ayam petelur dengan perbandingan 3 : 1.

Pada Tabel 1. Terlihat bahwa rerata berat larva pada kontrol dan P (I), dan juga antara kontrol dan P (II) tidak ada perbedaan yang nyata, sedangkan antara P (I) dan P (II) ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Rerata berat larva instar 3 kontrol $0,022 \pm 0,004$ g dan mengalami penurunan 18,18 % ($0,018 \pm 0,006$ g). Pada P (I) mengalami penurunan 68 % sedangkan P (II) berat larva turun 50 %. Berdasarkan pada hasil pengamatan percobaan terhadap larva lalat didapatkan pula bahwa pemberian serum anti-WPL menyebabkan larva pada P (I) dan P (II), mengalami perubahan warna dari putih krem menjadi kehitaman.

Tabel 1. Rerata Berat Larva pada Penimbangan Harian (g)

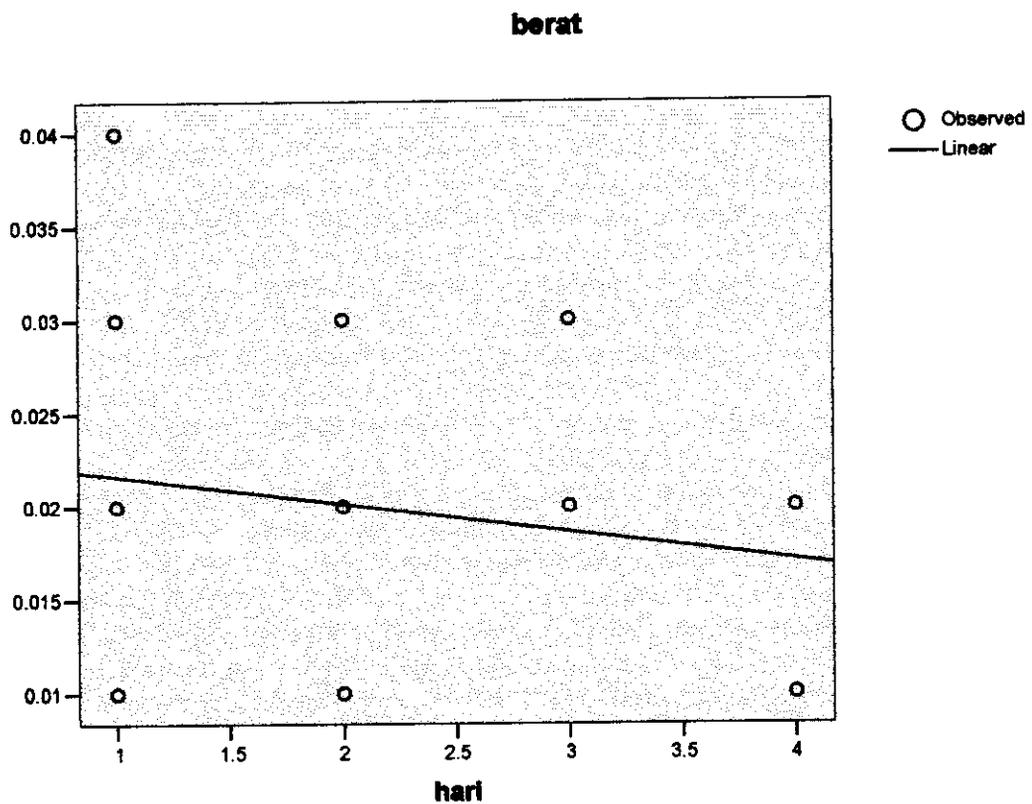
	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Hari 4	Hari 5	Hari 6
K	$0,022^{ab} \pm 0,004$	$0,190 \pm 0,006$	$0,022 \pm 0,004$	$0,018 \pm 0,006$		
PI	$0,025^b \pm 0,007$	$0,018 \pm 0,004$	$0,015 \pm 0,005$	$0,016 \pm 0,005$	$0,008 \pm 0,004$	
PII	$0,018^a \pm 0,004$	$0,022 \pm 0,004$	$0,020 \pm 0,000$	$0,018 \pm 0,004$	$0,020 \pm 0,000$	$0,009 \pm 0,003$

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Pada kontrol, larva berubah menjadi pupa pada hari kelima, pada P (I) dan P (II) masing-masing larva berubah menjadi pupa pada hari keenam dan ketujuh.

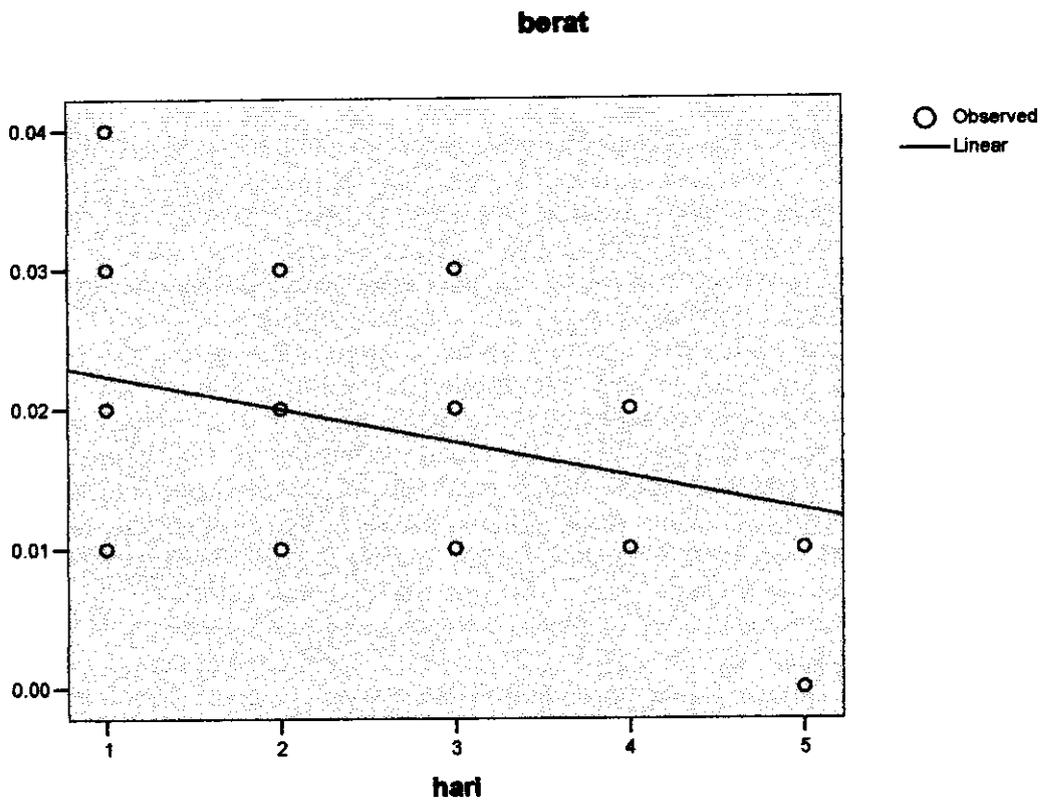
Data berat larva dapat dilihat pada Lampiran 4.

Pola berat larva pada kontrol terlihat mengikuti pola linear, dengan persamaan regresi $Y = 0,022 - 0,002 X$ seperti terlihat pada lihat Gambar 8. Berat rerata larva semakin hari semakin menurun ($p < 0,05$)



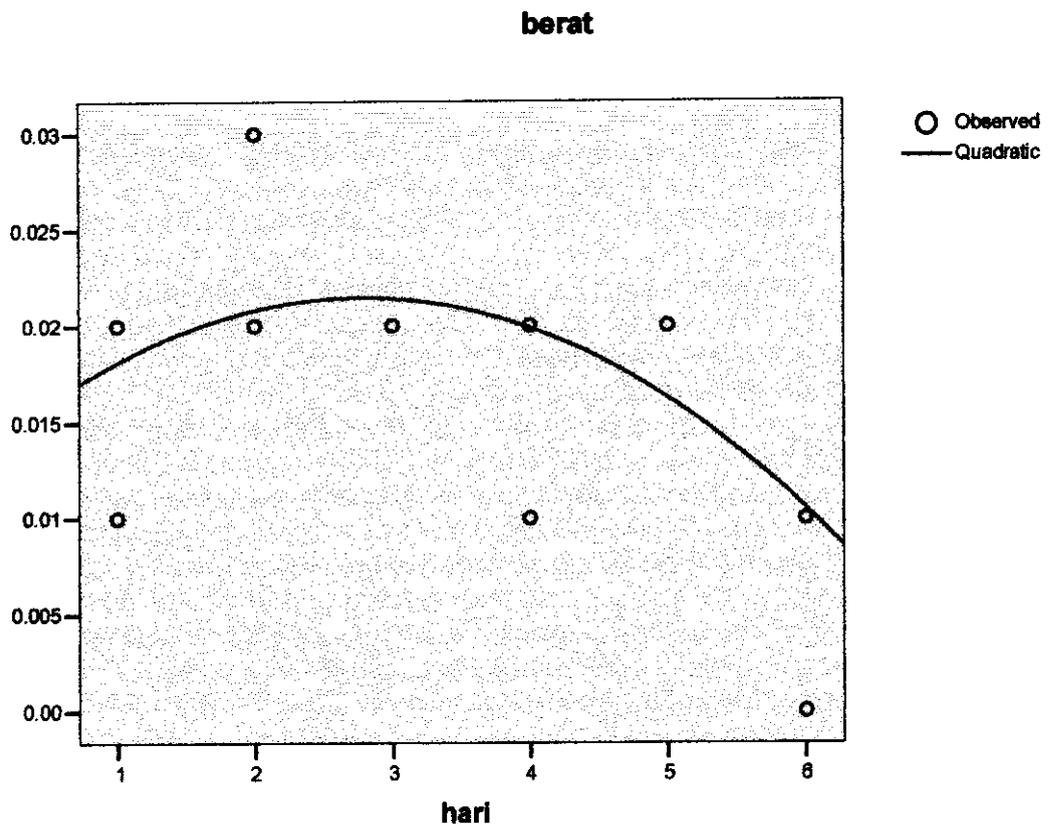
Gambar 8. Pola Rerata Berat Harian Larva pada Kontrol

Pola berat larva lalat pada P(I), larva dalam serum anti-WPL pada media pakan ayam petelur 100 %, mengikuti pola linear dengan persamaan regresi $Y = 0,025 - 0,002 X$ seperti terlihat pada Gambar 9. Berat rerata larva menurun tajam ($p < 0,01$), serum dapat menurunkan berat larva.



**Gambar 9. Pola Rerata Berat Harian Larva
pada Perlakuan I**

Pola berat larva lalat pada P(II), larva dalam serum anti-WPL pada media pakan dan feses 3:1, mengikuti pola kuadrat dengan persamaan regresi kuadrat $Y = 0,03 + 0,006 X - 0,001 X^2$. Berat rerata larva menurun secara nyata ($p < 0,05$).



Gambar 10. Pola Rerata Berat Harian Larva pada Perlakuan II

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V PEMBAHASAN

Proses ekstraksi Whole protein larva pada awal penelitian dilakukan menggunakan PBS, sedangkan bila akan dilakukan proses pengawetan larva yang baik adalah dengan cara membunuh dalam air panas kemudian disimpan di dalam etanol 70- 80 %, metode ini dapat melindungi protein larva dan mencegah larva menjadi hitam (Wardhana dkk., 2003), bila pengawetan menggunakan formalin menyebabkan jaringan larva menjadi rapuh sehingga tidak dianjurkan untuk keperluan analisis molekuler kecuali untuk kepentingan pembuatan preparat histologik.

Pada fraksi whole protein larva *Musca domestica* dengan SDS-PAGE 12 % terdapat suatu gambaran tebal tipis pita, hal ini merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penghasil protein tersebut. Semakin tebal pita protein, semakin banyak protein yang diekspresikan oleh gen tersebut.

Hasil elektroforesis pada Gambar 7, terlihat beberapa bagian yang kurang jelas dan masih terdapat *smear*, hal ini terjadi karena protein yang dipakai belum dilakukan pemurnian, kemungkinan masih ada fraksi protein yang belum tampak selain yang terlihat pada Gambar 7.

Pada Gambar 7. terlihat pita protein yang lebih tebal dibandingkan pita protein lain yaitu protein dengan berat molekul 101,5 kDa. Protein tersebut merupakan *major protein* yang diekspresikan lalat secara keseluruhan, sedangkan protein yang lain yaitu dengan berat molekul 16,7 kDa terlihat diekspresikan dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna sangat tajam. Pita-pita

protein tersebut merupakan protein yang ada pada tubuh lalat yang berasal dari protein somatik, visceral dan ekresi-sekresi.

Bellanti (1993) mengatakan bahwa parasit mengandung berbagai macam antigen somatik dan antigen metabolit, beberapa diantaranya adalah spesifik stadium dan bersifat sementara dan yang lain tetap ada pada seluruh daur hidup parasit dan dapat merangsang terus-menerus respon imunologik yang berbeda.

Pita protein tebal tidak selalu bersifat imunogenik seperti profil protein dengan BM 101, 5 dan 16,7 kDa ini, pada uji imunoblotting yang telah dilakukan pada penelitian lain, pita protein dengan BM 75,1 dan 22,6 kDa yang bersifat imunogenik.

Pada awal perlakuan dilakukan pengambilan larva *M. domestica* dari tempat pembiakan lalat secara acak. Hal ini terlihat pula pada data tabel 1 hari I yang terlihat tidak seragam. Dimana terlihat bahwa pada awal perlakuan, berat rerata larva antara kontrol dan perlakuan P (I) serta antara kontrol dan perlakuan P (II) tidak berbeda nyata, sedangkan antara P (I) dan P (II) berbeda nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan pada hasil penelitian secara keseluruhan, rerata berat larva kontrol mengalami penurunan sebesar 18,18 % ($0,022 \pm 0,004$ g menjadi $0,018 \pm 0,006$ g) pada akhir siklus sebelum terbentuk pupa, sebagaimana pola yang terlihat pada gambar 8. Sedangkan untuk perlakuan P (I) mengalami penurunan sebesar 68 % (dari $0,025 \pm 0,007$ g menjadi $0,008 \pm 0,004$ g), sebagaimana pola yang terlihat pada gambar 9. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian serum anti-Whole Protein Larva yang terdapat di dalam serum domba yang telah diimunisasikan memberikan dampak hambatan pertumbuhan.

Penelitian terhadap larva penyebab myiasis yaitu *L. cuprina* menunjukkan bahwa imunisasi yang dilakukan terhadap domba dengan beberapa glikoprotein membran intrinsik dari membran peritrofik larva, yang disebut peritrofin, menunjukkan adanya respon imun yang dapat menghambat pertumbuhan larva (East, *et. al.*, 1993). Mekanisme hambatan ini disebabkan adanya ikatan antibodi dengan peritrofik di dalam matrik peritrofin, sehingga memblokir lubang pada membran peritrofin usus dan mengganggu proses pencernaan yang normal pada larva (Casu *et. al.*, 1997; Tellam dan Eisemann, 1998). Percobaan imunisasi dengan menggunakan membran peritrofik yang utuh dari *C. bezziana* (Sukarsih *et. al.*, 2000), diduga mempunyai mekanisme yang hampir sama dengan vaksin yang menggunakan fraksi dari membran peritrofik *C. bezziana* terhadap lalat *screwworm* (Riding *et. al.*, 2000).

Hasil yang ditunjukkan pada P (II) terlihat adanya penurunan berat rerata larva sebesar 50 % (dari $0,022 \pm 0,004$ g menjadi $0,009 \pm 0,003$ g), sebagaimana yang terlihat pada gambar 10. Hal ini menunjukkan adanya penurunan berat larva yang cukup signifikan sebagaimana terlihat pada perlakuan P (1). Akan tetapi, apabila kita perhatikan pada gambaran pola rerata berat larva pada P (II) yang ditunjukkan oleh gambar 10, campuran media feses yang digunakan untuk menumbuhkan larva ternyata dapat meningkatkan berat larva pada awal proses perlakuan tetapi karena pengaruh serum maka berat larva turun sebagaimana perlakuan P (1).

Clark *et al.*, (1982) menyebutkan bahwa *M. domestica* memerlukan media yang sesuai untuk berkembang biak di alam. Tempat yang disenangi lalat adalah

feses ayam, terutama ternak ayam yang dikandangkan dengan sistem baterai. Pada peternakan ayam yang menggunakan sistem postal atau lantai, populasi lalat relatif lebih kecil (Murtidjo, 1992).

Menurut Dharmawati (2005), produksi larva lalat *M. domestica* yang tertinggi pada media feses ayam broiler dibandingkan dalam media feses lainnya. Feses ayam broiler memiliki kandungan bahan kering 20,9 %. Keadaan ini sesuai pendapat Murtidjo (1982), yang mengatakan bahwa lalat betina memilih tempat perkembangan telur pada bahan yang mudah membusuk dan lembab. Bahan dengan kandungan air yang tinggi merupakan tempat yang paling disukai oleh *M. domestica* untuk bertelur yang selanjutnya akan berkembang menjadi larva.

Ensminger *et al.*, (1990) menyebutkan bahwa makanan yang dibutuhkan hewan untuk berkembang-biak harus mengandung karbohidrat, lemak dan protein yang seimbang. Feses ayam broiler memiliki kandungan protein kasar 29,34 % dan lemak kasar 11,15 % lebih tinggi dibandingkan feses lain, hal ini sangat berpengaruh terhadap perkembangan larva *M. domestica* (Dharmawati, 2005).

Penelitian yang dilakukan oleh Riding *et al.*, (2000), *whole protein* membran peritrofik usus larva *C. bezziana* didapat 3 fraksi yang paling protektif yang telah dimurnikan dengan SDS PAGE yaitu pita protein yang kemudian dikenal dengan istilah Cb 15, Cb 42 dan Cb 48, dipakai sebagai kandidat vaksin.

Menurut Moreira *et al.*, (2004) bahwa di dalam tubuh lalat *M. domestica* mengandung hexamerin yang merupakan suatu protein dengan berat molekul besar dengan bobot rata-rata 80 kDa. Protein tersebut diidentifikasi sebagai hexamerin L (Hex-L) dan hexamerin F (Hex-F). Hexamerin adalah produk utama

yang disekresikan oleh lemak tubuh ke dalam hemolymph selama perkembangan larva dan sebagai sumber asam amino dan energi untuk metamorfosis, sedangkan Hex-F dipengaruhi oleh protein makanan dan hanya terjadi pada lemak tubuh serangga dewasa. Skrening genomic *M. domestica*, gen Hex-L dikenal sebagai MdHexL 1 terdiri atas dua exons 210 dan 2,133 bp yang dipisahkan oleh intron dengan 61 bp.

Pemberian serum anti-WPL tidak hanya dapat mengurangi berat larva dan pupa juga dapat mengurangi jumlah lalat, sehingga dapat mengendalikan populasi lalat, hal ini sesuai dengan pendapat Willadsen dan Kenna (1991), bahwa antigen rekombinan Bm 86 yang digunakan sebagai vaksin pada sapi terhadap infestasi caplak menyebabkan kerusakan usus berupa kebocoran eritrosit ke dalam hemolymph caplak. Pemberian vaksin menyebabkan perubahan warna normal caplak dari kelabu menjadi merah, terjadi kerusakan pada usus caplak. Efek vaksin tidak hanya dapat mengurangi banyaknya caplak, tetapi juga dapat mengurangi berat dan kapasitas telur caplak. Efek vaksin terhadap kesuburan caplak mengakibatkan berkurangnya caplak, sehingga dapat mengendalikan populasi caplak pada ternak yang sudah divaksin. Juga dibuktikan oleh Willadsen *et al* (1996), bahwa vaksinasi untuk ternak sapi menggunakan kombinasi dua rekombinan antigen Bm 86 dan Bm 91 dari *B. microplus*, menjadi lebih efektif dan meningkatkan kemampuan vaksin komersial yang ada. Berat telur per caplak dan kapasitas reproduksi caplak digunakan sebagai ukuran dari kemampuan vaksin.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Larva yang ditumbuhkan dalam media serum anti-WPL mengalami penghambatan pertumbuhan, hal ini ditunjukkan dengan adanya penurunan berat larva yang jauh lebih besar apabila dibandingkan dengan larva yang ditumbuhkan dalam media yang mengandung serum domba normal.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan pemurnian protein larva instar 3 *M. domestica* sehingga didapatkan protein tunggal yang bisa dianalisis dan dapat dikembangkan sebagai bahan vaksin.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui respon imun humoral dan seluler yang terjadi pada proses imunisasi dengan menggunakan protein yang lebih spesifik.
3. Dalam usaha pengembangan teknologi untuk pengendalian myiasis diperlukan koloni lalat yang permanen sehingga dari koloni ini dapat diproduksi vaksin, pupukan larva untuk uji potensi vaksin secara *in vitro* dan *in vivo*.

RINGKASAN

Banyak sekali permasalahan mengenai parasit yang dihadapi oleh para peternak. Salah satunya adalah kasus myiasis pada ternak domba. Penelitian ini dilakukan sebagai salah satu usaha pengembangan vaksin myiasis oleh larva Lalat Rumah (*Musca domestica*) pada domba, yaitu dengan melakukan pengujian *in vitro* terhadap larva *M. domestica* yang diberi serum anti-WPL (Whole Protein Larva) dari domba yang telah diimunisasi dengan antigen dari tubuh larva lalat rumah. Pada akhirnya diharapkan adanya penurunan berat larva pada media yang diberi perlakuan tersebut.

Segala upaya juga telah dilakukan untuk mengurangi kerugian akibat infestasi lalat pada ternak antara lain dengan melihat perkembangan larva setelah pemberian vaksin secara *in vitro* dan *in vivo* (Partoutomo *et al.*, 1998 ; Sukarsih *et al.*, 2000), teknik ini mengadaptasi dari penelitian pada lalat *Lucilia cuprina* yang telah dilakukan oleh Eisemann *et al.*, (1989). Penelitian pada lalat yang sama juga telah dilakukan oleh Eisemann *et al.*, (1990) melihat respon imun setelah pemberian antigen berupa larva. Tellam dan Bowles (1997), telah melakukan vaksinasi dengan menggunakan bahan dari ekskretori dan sekretori lalat *L. cuprina*. Bagian usus larva lalat *L. cuprina* yang disebut membran peritrofik mampu merangsang respon antibodi dan dapat menghambat perkembangan serta menimbulkan kematian (Willadsen, 1993). Vaksinasi telah dilakukan oleh Riding *et al.*, (2000) di Indonesia pada lalat *C. bezziana*, bahan protease serin sebagai antigen protektif cukup potensial pada lalat *C. bezziana* yang disuntikkan pada domba, pada uji *in vitro* dengan menggunakan serum domba yang telah

divaksinasi tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan larva, sedang pada uji *in vivo* didapatkan penurunan bobot larva, sedangkan vaksinasi dengan membran peritrofik dari lalat *C. bezziana* memberikan respon imunologik yang efektif terhadap parasit yang ditunjukkan dengan penurunan bobot larva dan peningkatan mortalitas secara nyata.

Larva *M. domestica* diekstraksi dalam media PBS untuk tujuan isolasi *whole* protein larva. Hasil isolasi *whole* protein kemudian dilakukan elektroforesis dengan SDS-PAGE untuk menentukan berat molekul dari fraksi *whole* protein yang dihasilkan. *Whole* protein larva (WPL) selanjutnya disuntikkan pada dua ekor domba secara subkutan di daerah paha dengan 3 kali booster yaitu pada dua minggu sesudah imunisasi. Pengumpulan serum anti-WPL dilakukan untuk melihat respon antibodi dan digunakan untuk menguji pengaruhnya apabila diberikan kepada larva Lalat Rumah (*M. domestica*) pada uji *in vitro*. Pada uji *in vitro* ditambahkan serum anti-WPL dan serum kontrol dari domba kedalam medium tempat ditumbuhkan L3 lalat *M. domestica*. Perkembangan larva diukur dengan melihat perubahan berat badan larva dengan 3 perlakuan yaitu kontrol, P(I) dan P (II).

Hasil uji *in vitro*, rata-rata berat larva kontrol dan P (I), dan antara kontrol dan P (II) tidak ada perbedaan yang nyata, sedang antara P (I) dan P (II) ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Rata-rata berat L3 kontrol $0,022 \pm 0,004$ g dan mengalami penurunan 18,18 % ($0,018 \pm 0,006$ g). Pada P (I) mengalami penurunan 68 % sedangkan P (II) berat larva turun 50 %.

Hal ini menunjukkan bahwa sebenarnya serum domba yang telah diimunisasi antigen larva lalat *M. domestica* mampu memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan larva lalat *M. domestica*. Oleh karena itu diperlukan penelitian lanjutan untuk menghasilkan sebuah vaksin myiasis cutaneus yang efektif dan efisien.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman and J.S. Pober. 2000. Cellular and Molekuler Immunology. 4th Ed. Saunders Company. United States of America.
- Anders R.F., R.J. Howard and G.F. Michell. 1982. Parasitic and Methods of analysis. In immunology of Parasite Infection. Oxford: Blackwell Scientific Publication. pp : 529-539
- Arroyo, H. S. 1998. Distribution and Importance – Life Cycle and descriptin-Damage- Economic Injury Level- Management - selected references. Univ. of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Depart. of Entomology Nematology. http://www.house_fly-Musca_domestica-Linnaeus.htm.
- Baratawidjaja K.G. 2000. Imunology Dasar. Balai Penerbit FKUI. Jakarta Hal 3-15.
- Baron, R.W and T.J. Lysyk.1995.Antibody Responses in Cattle Infested with *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J.Med.Entomol.* 32 (5): 630-635.
- Bellanti, J.A. 1993. Immunologi III (Terjemahan A.S. Wahab) Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Borror, D. J., Triplehorn, C. A., and Johson, N. F. 1992. Pengenalan Pelajaran Serangga. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Brown, H. W. 1979. Dasar Parasitologi Klinis. Terjemahan. Penerbit PT. Gramedia. Jakarta. 415 – 419
- Carina, A.T., W.A. Conde and P.F. Mancera. 2004. Population Dynamic of *M. domestica* (Diptera :Muscidae) :Experimental and Theoretical Studies at Different Temperatures. *Brazillian archives of Biol.and Technology. An International J.*47 :775-785
- Casa, R., C. Eisenmann, R. Pearson, G. Riding, I. East, A. Dinaldson, L. Cadogan and R. Tellam. 1997. Antibody-mediated inhibitian of The Growth of Larvae from sn Insect Causing Cutaneus Myiasis in a Mammalia host. *Proc. Of The National Academy of Sciences of The United States of America.* 94 (17) : 8939-8944.
- Chapman, J.W. dan D. Goulson. 2000. Environmental versus Genetic Influences on Fluctuating Asymmetry in the House Fly, *Musca domestica*.*Biol.J.Linn.*70 : 403-413.

- Dharmawati, A. 2005. *Rearing* (Perkembangbiakan) Larva Lalat Rumah (*Musca domestica*, Linneus) pada Beberapa Media Feses Ternak Di Laboratorium. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya.
- East, I.J., C.J. Fitzgerald, R.D. Pearson, R.A. Donaldson, T. Vuocolo, L.C. Cadogan, R.L. Tellam, and C.H. Eiseman. 1993. *Lucilia cuprina* : Inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritropic membrane Int. J. Parasitol. 23 : 221-229.
- Eisemann, C.H., L.A.Y. Johnston and J.D. Kerr. 1989. New Techniques for Measuring the Growth and Survival of Larvae of *Lucillia cuprina* on Sheep. Aust. Vet.J. 66(6): 187-189.
- Eisemann, C.H., L.A.Y. Johnston and M. Broadmeadow, B.M. O'Sullivan, R.A. Donaldson, R.D. Pearson, T. Vuocolo dan J.D. Kerr. 1990. Acquired resistances of sheep to larvae of *Lucillia cuprina*, assessed in vivo and in vitro. Int.J.Parasitol. 20:229-305.
- Ensminger, M.E., J.E. Oldfield dan W.W. Heinemann. 1990. Feed Nutrition. The Ensminger Publishing Company, California, USA.
- Georgi, J. R. and M. E. Georgi. 1990. Parasitology for Veterinarians. 5th ed. W. B. Saunders Company Harcourt Brace Jovano Vich Inc. 12.
- Hall, H.T.B. 1972. Disease and Parasitic Live Stock in the Tropics. Longman Group Ltd. London. 222-225.
- Hastutiek, P., R. Sasmita, R.N. Wahyuti dan A. Sunarso. Penuntun Praktikum Entomologi Veteriner S1 Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Jackson, L.A. and J.P. Opdebeeck. 1990. Humoral immune response of Hereford cattle vaccinated with midgut antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Parasite.Immunol. 12 :141-151.
- Krafsur, E.S., W.C. Black IV., C.J. Church, and D.A. Barnes. 1985. Age structure and reproductive biology of natural house fly (Diptera :Muscidae). Popul. Environ. Entomol. 14.159-164.
- Levine, N. D. 1990. Buku Pelajaran Parasitology Veteriner. Terjemahan oleh Gatut Ashadi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.

- Levine, O.S. and M.M. Levine. 1991. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vector of shigellosis. *Infect. Immun.* 31: 445-452.
- Moriera, C.K., M. de L. Capurro., M. Walter., E. Pavlova., H. Biesmann., A.A. James., A.G. de Bianchi and O. Marinotti. 2004. Primary characterization and basal promoter activity of two hexamerin genes of *Musca domestica*. *J. Insect Science* 4:2.
- Murtijo, B.A. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ayam. Penerbit Kanisius Yogyakarta. 98-101.
- Muchlis, A dan S. Partoutomo. 1971. Pemakaian Asuntol dalam Pengobatan Cascado dan Myiasis Kuku pada Sapi. *Bull. LPPH.* 2(2) : 1-5.
- Partoutomo, S., Sukarsih, E. Satria, and C.H. Eisemann. 1998. The Development of an in vivo assay technique as a tool for measuring protective immune response of vaccin against myiasis in sheep. *J. Ilmu Ternak Veteriner* 3(4):270-276.
- Partoutomo, S. 2000. Epidemiologi dan Pengendalian Myiasis di Indonesia. *Wartazoa.* 10(1) : 20-27.
- Rantam F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Richard, O.W and R.G. Davies. 1977. Imm's general Textbook of Entomology. Including Clasification and Biology. 10th Ed. The English Language Book Society and Chapman and Hall Ltd.
- Riding, G., S. Muharsini, R. Pearson, Sukarsih, E., Satria, G. Wijffels, and P. Willasen. 2000. Fractionation, identification and vaccination efficacy of native antigen from the sreworm fly, *Chrysomya bezziana*. *J. Ilmu Ternak dan Vet. (Edisi Khusus).* 5 (3) : 150-159.
- Safitri, D. G. 2005 Fluktuasi Jumlah Lalat Rumah (*Musca domestica*, Linn) Pada Peternakan Ayam Petelur di Desa Lemahbang, Dukuhsari dan Tejowangi, Kcamatan Pandaan, Kabupaten Pasuruan. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Hewan Universitas Airlangga.
- Sehgal, R., H.P.S. Bhatti, D.K. Bhasin, S.K. Sood, S. Nada, N. Malla and K. Singh. 2002. Intestinal Myiasis Due to *Musca Domestica*: A Report of Two Cases. *Jpn. Infect. Dis.* (55) 191-193.
- Sembiring, D.K. 1991. Kasus myiasis (screwworm) yang berhasil diamati di kabupaten Wajo, Sulawesi Selatan. Laporan Dinas Peternakan Kabupaten Tingkat II Wajo, Sulawesi Selatan.

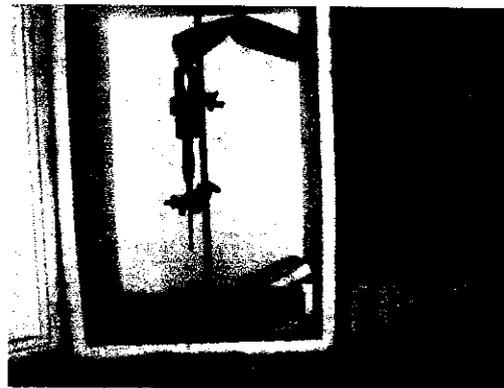
- Sigit, S.H.1978. Masalah Myiasis pada Sapi di Sulawesi Selatan. *Media Veteriner*.3(2):1-12.
- Soulsby, E.J.L. 1986. *Helminth, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animal*. 7th Ed. Bailere Tindall, London.
- Sukarsih, R.S. Tozer., and M.R. Knox.1989. Collection and case incidence of old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, in three localities in Indonesia. *Penyakit Hewan* 21 (38) : 114-117.
- Sukarsih, R.S., S. Partoutomo, G. Wijffels,R. Tozer, E. Satria, and G. Riding. 2000.Establishment and Maintenance of A Coloni of The Old World Screwworm Fly, *C. bezziana* at Balitvet in Bogor, West Java, Indonesia. *J. Ilmu Ternak dan Vet*. 5(3) : 144- 149.
- Tellam, R.M. and V.W. Bowles.1997. Control of blowfly strike in sheep : current strategies and future prospects. *Int.J. Parasitol*.27:261-273.
- Tizard.I.R. 1982. *Pengantar Imunologi Veteriner* (terjemahan : Masduki Partodirejo). Airlangga University Press.
- Tizard.I.R. 1988. *Pengantar Imunologi Veteriner*. Edisi 2. W. B. Saunders Company. Philadelphia. 46, 117-178.
- Wardhana, A.H., S. Muharsini dan Suhardono. 2003. Metode Pengawetan Larva dan Lalat Dewasa *Chrysomya bezziana* untuk Analisis DNA Mitokondria. *J. Ilmu Ternak dan Vet*. 8(4) : 264-275.
- Willadsen, P. and D.H.Kemp.1988. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. *Parasitology Today* 4.196
- Willadsen, P., G.A. Riding., R.V. McKenna, D.H. Kemp., R.L. Tellam., J.N. Nielsen and J.M. Gough.1989.Immulogical control of parasite arthropods:Identification of Protective Antigen from *Boophilus microplus*.*J.Immunol*.143:1346-1351.
- Willadsen, P., and R.V. McKenna.1991. Vaccination with ‘concealed’ antigens: myth or reality?.*Parasite Immunol*.13.605-616.
- Willadsen, P., C.H.Eisemann and R.L. Tellam. 1993. Concealed antigens: expanding the range of immunological targets. *Parasitol.Today* 9:132-135.
- Willadsen, P., and S. Partoutomo. 2000. An investigation of the Feasibility of Vaccinating agains the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner* (Edisi Khusus). 5(3): 141-143.

LAMPIRAN

Lampiran



Gambar. 11. Larva Sampel



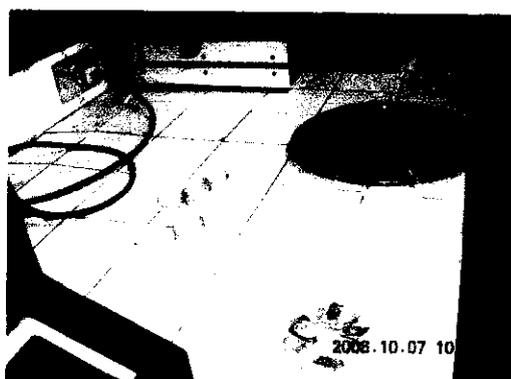
Gambar.12. Sonikator



Gambar.13. Imunisasi dan Pengumpulan Serum Domba



Gambar.14. Domba Penelitian



Gambar.15. Media, Perlengkapan Penelitian



Gambar.16. Proses Percobaan

Lampiran 1. Cara Kerja (Prosedur) dan Hasil Pemeriksaan Kadar *Whole Protein* Larva Lalat *M. domestica*

Total Protein

Cara Biuret

Pereaksi

1. Pereaksi Biuret

K-Na-Tartrat	0,18 M
CuSO ₄	0,012 M
NaOH.....	0,2 M

2. Standar protein

Bahan : Sampel hasil ekstraksi *whole protein* larva

Absorbance : 540 – 550 nm (546 nm)

Angka Normal : 6,6 – 8,5 gr%

Cara Kerja :

	Tes (t)	Standar (st)	Blanko (bl)
Pereaksi Biuret, ml	2,50	2,50	2,50
Whole protein, ml	0,05	-	-
Standar, ml	-	0,05	-
Aquadest, ml	-	-	0,05

Campur, tangguhkan selama 30 menit, lalu baca dalam Spektrofotometer.

$$\text{Perhitungan} = \frac{Dt}{Dst} \times \text{kadar standar}$$

$$= \frac{0,185}{0,696} \times 6,42 \%$$

$$= 0,2658 \times 6,42\%$$

$$= 1,706 \text{ g/dl} = 17,06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Lampiran 2. Penghitungan Dosis Imunisasi pada Domba**Dosis Imunisasi yang digunakan :**

$$\begin{aligned} & \text{Dosis antigen whole protein larva} \\ = & \frac{\text{Hasil perhitungan total protein larva}}{1500 \mu\text{g}} \\ = & \frac{1314,24 \mu\text{g}}{17,06 \mu\text{g}/\mu\text{l}} \\ = & 87,92 \mu\text{l} \\ = & 88 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Pada Imunisasi Domba Penelitian :

88 μl *whole protein larva* dilarutkan dalam PBS sampai 1 ml + 1ml adjuvant dengan perbandingan 1 : 1

Lampiran 3. Cara Kerja SDS -PAGE

Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis SDS-PAGE 12 %

1. Siapkan semua bahan yang diperlukan :

Acrylamid	Tris HCL pH 8,8
Tris HCL pH 6,8	SDS 0,5 %
Aquadest	Temed
APS 10 % 4 °C	E. Buffer
Methanol 50 %	Asam Asetat 7,5 %
Glutaraldehyd 10 %	NAOH 0,36 %
NH ₃	AgNo ₃
Formaldehid	Zitnesoure 5 %
Butanol	

2. Membuat running gel

Bahan : Acrylamid	2,5 ml
Tris HCL pH 8,8	1,2 ml
SDS 0,5 %	1,2 ml
Aquadest	1,1 ml
Temed	5,0 ul
APS 10 %	30 µl.

Cara Kerja : Masukkan lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas, tambahkan Butanol di atasnya sampai penuh. Fungsi Butanol adalah untuk meratakan permukaan running gel.

3. Membuat stacking gel.

Bahan : Acrylamid	0,66 ml
Tris HCL pH 6,8	0,8 ml
SDS 0,5 %	0,8 ml
Aquadest	0,8 ml.,
Temed	4,0 μ l
APS 10 %	20 ul.

Cara Kerja : Masukkan keatas cetakan running gel sampai penuh kemudian masukkan comb ke stacking gel dan inkubasi selama 25 menit.

4. Siapkan sampel (Laemli buffer + sampel) masukkan ke dalam ependorf dan tutup ependorf ditusuk dengan jarum setengah tusukan, langsung direbus pada suhu 100 °C selama 5 menit.
6. Setelah inkubasi selesai lepaskan comb dan cuci dengan E buffer 1 kali.
7. Masukkan cetakan tadi ke Biometra, tuangi dengan E buffer 1 kali (kira-kira 800 ml). Hilangkan gelumbang pada lubang dengan cara menusukkan dengan jarum.
8. Masukkan sampel kedalam lubang comb. Pasang listrik dengan voltase 125 V dan 40 VmA.
9. Tunggu sampai sampel turun seluruhnya.
10. Matikan listrik dan lepas gel pelan-pelan.
11. Tahap pencucian I :

- Metanol	25 ml	Asam asetat	3,75 ml
-----------	-------	-------------	---------

Aquadest 72,25 ml goyang dengan kecepatan 42 x selama 30 menit.

Tahap pencucian II :

- Metanol 25 ml Asam Asetat 3,75 ml

Aquadest 93,75 ml goyang dengan kecepatan 42 x selama 30 menit.

Tahap pencucian III : (Glutaraldehyd 10 %)

- Gutaraldehyd 10 ml

Aquadest 90 ml goyang dengan kecepatan 42 x selama 30 menit.

Tahap pencucian IV :

- Pencucian dengan aquadest @ 100 ml 3 kali selama 30 menit.

12. Tahap pewarnaan :

Timbang AgNo₃ 0.8 g + 4 ml DW, campur dan masukkan kedalam larutan yang

terdiri dari : NaOH 0,36 % 21 ml.,

NH₃ 1,4 ml

Aquadest 73,5 ml.

masukkan dalam petridish dan goyang dengan kecepatan 42 kali selama 15 menit. atau dalam Commasie Brilliant Blue R-250 Biorad

13. Cuci dengan Aquadest @ 100 ml 2 kali selama 2 menit.

14. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari :

- Formaldehyd 3,7 % 50 ul

Zitronensaure 5 % 100 ul

Aquadest 100 ml

tunggu 5 menit sambil goyang terus.

15. Masukkan stop reaksi dengan Acetic Acid 10 %
16. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2 kali selama 2 menit
17. Beri Gliserol 10 % (Gliserin 10 ml + Aquadest 90 ml)

Penentuan berat molekul. Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel de-ngan marker protein. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (Retardation factor) dari masing-masing pita dimana :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat sampel}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf srbagai sumbu x dan harga loga- ritma berat molekul sebagai sumbu y. Berat molekul sampel ditentukan dengan di-interpolasikan pada kurva standar dari protein marker.

Lampiran 4. Data Berat Larva *M. domestica*

Case Summaries

			berat1	berat2	berat3	berat4	berat5	berat6
pelakuan media1	1		,03	,02	,02	,01		
	2		,02	,02	,02	,01		
	3		,02	,01	,02	,01		
	4		,02	,02	,02	,02		
	5		,02	,02	,03	,02		
	6		,02	,02	,02	,02		
	7		,02	,03	,02	,03		
	8		,02	,01	,02	,02		
	9		,02	,02	,02	,02		
	10		,03	,02	,03	,02		
	Total	N	10	10	10	10		
	Mean	,0220	,0190	,0220	,0180			
	Std. Error of Me	,00133	,00180	,00133	,00200			
	Std. Deviation	,00422	,00568	,00422	,00632			
media2	1		,02	,02	,02	,01	,01	
	2		,02	,02	,01	,02	,01	
	3		,02	,02	,02	,02	,01	
	4		,02	,01	,02	,02	,00	
	5		,04	,02	,01	,02	,00	
	6		,02	,02	,02	,02	,01	
	7		,02	,02	,02	,01	,01	
	8		,03	,02	,01	,02	,01	
	9		,03	,01	,01	,01	,01	
	10		,03	,02	,01	,01	,01	
	Total	N	10	10	10	10	10	
	Mean	,0250	,0180	,0150	,0160	,0080		
	Std. Error of Me	,00224	,00133	,00167	,00163	,00133		
	Std. Deviation	,00707	,00422	,00527	,00516	,00422		
media3	1		,02	,02	,02	,02	,02	,01
	2		,02	,02	,02	,02	,02	,01
	3		,02	,02	,02	,02	,02	,00
	4		,02	,02	,02	,01	,02	,01
	5		,01	,02	,02	,02	,02	,01
	6		,02	,02	,02	,02	,02	,01
	7		,01	,02	,02	,02	,02	,01
	8		,02	,03	,02	,01	,02	,01
	9		,02	,02	,02	,02	,02	,01
	10		,02	,03	,02	,02	,02	,01
	Total	N	10	10	10	10	10	10
	Mean	,0180	,0220	,0200	,0180	,0200	,0090	
	Std. Error of Me	,00133	,00133	,00000	,00133	,00000	,00100	
	Std. Deviation	,00422	,00422	,00000	,00422	,00000	,00316	
Total	N	30	30	30	30	20	10	
	Mean	,0217	,0197	,0190	,0173	,0140	,0090	
	Std. Error of Mean	,00108	,00089	,00088	,00095	,00152	,00100	
	Std. Deviation	,00592	,00490	,00481	,00521	,00681	,00316	

a. Limited to first 100 cases.

Lampiran.5. Analisis Nisbah Berat Larva hingga Hari Ke 4

Case Summaries ^a

pelakuan	media1			b2relb1	b3relb2	b3relb1
		1		-,01	,00	-,01
		2		,00	,00	-,01
		3		-,01	,01	-,01
		4		,00	,00	,00
		5		,00	,01	-,01
		6		,00	,00	,00
		7		,01	-,01	,01
		8		-,01	,01	,00
		9		,00	,00	,00
		10		-,01	,01	-,01
		Total	N	10	10	10
			Mean	-,0030	,0030	-,0040
			Std. Error of Mean	,00213	,00213	,00221
			Std. Deviation	,00675	,00675	,00699
	media2	1		,00	,00	-,01
		2		,00	-,01	,01
		3		,00	,00	,00
		4		-,01	,01	,00
		5		-,02	-,01	,01
		6		,00	,00	,00
		7		,00	,00	-,01
		8		-,01	-,01	,01
		9		-,02	,00	,00
		10		-,01	-,01	,00
		Total	N	10	10	10
			Mean	-,0070	-,0030	,0010
			Std. Error of Mean	,00260	,00213	,00233
			Std. Deviation	,00823	,00675	,00738
	media3	1		,00	,00	,00
		2		,00	,00	,00
		3		,00	,00	,00
		4		,00	,00	-,01
		5		,01	,00	,00
		6		,00	,00	,00
		7		,01	,00	,00
		8		,01	-,01	-,01
		9		,00	,00	,00
		10		,01	-,01	,00
		Total	N	10	10	10
			Mean	,0040	-,0020	-,0020
			Std. Error of Mean	,00163	,00133	,00133
			Std. Deviation	,00516	,00422	,00422
	Total	N		30	30	30
		Mean		-,0020	-,0007	-,0017
		Std. Error of Mean		,00147	,00117	,00118
		Std. Deviation		,00805	,00640	,00648

a. Limited to first 100 cases.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Medianu	(J) Medianu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
berat1	1	2	-,00300	,00239	,432	-,0089	,0029
		3	,00400	,00239	,233	-,0019	,0099
	2	1	,00300	,00239	,432	-,0029	,0089
		3	,00700*	,00239	,018	,0011	,0129
	3	1	-,00400	,00239	,233	-,0099	,0019
		2	-,00700*	,00239	,018	-,0129	-,0011
berat2	1	2	,00100	,00213	,886	-,0043	,0063
		3	-,00300	,00213	,349	-,0083	,0023
	2	1	-,00100	,00213	,886	-,0063	,0043
		3	-,00400	,00213	,163	-,0093	,0013
	3	1	,00300	,00213	,349	-,0023	,0083
		2	,00400	,00213	,163	-,0013	,0093
berat3	1	2	,00700*	,00174	,001	,0027	,0113
		3	,00200	,00174	,494	-,0023	,0063
	2	1	-,00700*	,00174	,001	-,0113	-,0027
		3	-,00500*	,00174	,021	-,0093	-,0007
	3	1	-,00200	,00174	,494	-,0063	,0023
		2	,00500*	,00174	,021	,0007	,0093
berat4	1	2	,00200	,00237	,680	-,0039	,0079
		3	,00000	,00237	1,000	-,0059	,0059
	2	1	-,00200	,00237	,680	-,0079	,0039
		3	-,00200	,00237	,680	-,0079	,0039
	3	1	,00000	,00237	1,000	-,0059	,0059
		2	,00200	,00237	,680	-,0039	,0079
b2relb1	1	2	,00400	,00306	,402	-,0036	,0116
		3	-,00700	,00306	,074	-,0146	,0006
	2	1	-,00400	,00306	,402	-,0116	,0036
		3	-,01100*	,00306	,003	-,0186	-,0034
	3	1	,00700	,00306	,074	-,0006	,0146
		2	,01100*	,00306	,003	,0034	,0186
b3relb2	1	2	,00600	,00269	,085	-,0007	,0127
		3	,00500	,00269	,171	-,0017	,0117
	2	1	-,00600	,00269	,085	-,0127	,0007
		3	-,00100	,00269	,927	-,0077	,0057
	3	1	-,00500	,00269	,171	-,0117	,0017
		2	,00100	,00269	,927	-,0057	,0077
b3relb1	1	2	-,00500	,00284	,202	-,0120	,0020
		3	-,00200	,00284	,763	-,0090	,0050
	2	1	,00500	,00284	,202	-,0020	,0120
		3	,00300	,00284	,549	-,0040	,0100
	3	1	,00200	,00284	,763	-,0050	,0090
		2	-,00300	,00284	,549	-,0100	,0040

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Analisis Berat Badan Mutlak dan Nisbah Perlakuan

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
berat1	Between Groups	,000	2	,000	4,325	,023
	Within Groups	,001	27	,000		
	Total	,001	29			
berat2	Between Groups	,000	2	,000	1,918	,166
	Within Groups	,001	27	,000		
	Total	,001	29			
berat3	Between Groups	,000	2	,000	8,561	,001
	Within Groups	,000	27	,000		
	Total	,001	29			
berat4	Between Groups	,000	2	,000	,474	,628
	Within Groups	,001	27	,000		
	Total	,001	29			
b2relb1	Between Groups	,001	2	,000	6,643	,005
	Within Groups	,001	27	,000		
	Total	,002	29			
b3relb2	Between Groups	,000	2	,000	2,847	,076
	Within Groups	,001	27	,000		
	Total	,001	29			
b3relb1	Between Groups	,000	2	,000	1,569	,227
	Within Groups	,001	27	,000		
	Total	,001	29			

Lampiran. 6. Pola Berat Badan pada Media Pertama

Model Description

Model Name		MOD_2
Dependent Variable	1	berat
Equation	1	Linear
	2	Quadratic
	3	Cubic
Independent Variable		hari
Constant		Included
Variable Whose Values Label Observations in Plots		Unspecified
Tolerance for Entering Terms in Equations		,0001

Case Processing Summary

	N
Total Cases	120
Excluded Cases ^a	40
Forecasted Cases	0
Newly Created Cases	0

a. Cases with a missing value in any variable are excluded from the analysis.

Variable Processing Summary

	Variables	
	Dependent	Independent
	berat	hari
Number of Positive Values	80	80
Number of Zeros	0	0
Number of Negative Values	0	0
Number of Missing Values	0	0
User-Missing		
System-Missing	40	40

berat

Linear

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,293	,086	,074	,005

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,000	1	,000	7,317	,008
Residual	,002	78	,000		
Total	,002	79			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	-,002	,001	-,293	-2,705	,008
(Constant)	,023	,001		18,650	,000

Quadratic**Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,297	,088	,065	,005

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,000	2	,000	3,729	,028
Residual	,002	77	,000		
Total	,002	79			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	,000	,003	-,046	-,084	,934
hari ** 2	,000	,001	-,252	-,463	,644
(Constant)	,022	,003		7,628	,000

Cubic**Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,349	,122	,087	,005

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,000	3	,000	3,510	,019
Residual	,002	76	,000		
Total	,002	79			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	-,025	,015	-,4827	-1,685	,096
hari ** 2	,011	,007	10,726	1,655	,102
hari ** 3	-,002	,001	-,6369	-1,700	,093
(Constant)	,037	,009		4,018	,000

Lampiran.7.Pola Berat Badan pada Media Kedua

Model Description

Model Name		MOD_6
Dependent Variable	1	berat
Equation	1	Linear
	2	Quadratic
	3	Cubic
Independent Variable		hari
Constant		Included
Variable Whose Values Label Observations in Plots		Unspecified
Tolerance for Entering Terms in Equations		,0001

Case Processing Summary

	N
Total Cases	130
Excluded Cases ^a	0
Forecasted Cases	0
Newly Created Cases	0

a. Cases with a missing value in any variable are excluded from the analysis.

Variable Processing Summary

	Variables	
	Dependent	Independent
	berat	hari
Number of Positive Values	128	130
Number of Zeros	2	0
Number of Negative Values	0	0
Number of Missing Values	User-Missing System-Missing	0 0
		0 0

berat

Linear

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,519	,269	,264	,005

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,001	1	,001	47,188	,000
Residual	,003	128	,000		
Total	,004	129			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	-,002	,000	-,519	-6,869	,000
(Constant)	,025	,001		23,863	,000

Quadratic**Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,561	,314	,304	,005

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,001	2	,001	29,108	,000
Residual	,003	127	,000		
Total	,004	129			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	,002	,002	,484	1,362	,176
hari ** 2	-,001	,000	-,1025	-2,886	,005
(Constant)	,020	,002		9,674	,000

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,589	,347	,331	,005

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,002	3	,001	22,297	,000
Residual	,003	126	,000		
Total	,004	129			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	-,012	,006	-2,563	-2,024	,045
hari ** 2	,005	,002	5,736	2,106	,037
hari ** 3	-,001	,000	-3,837	-2,502	,014
(Constant)	,030	,004		6,690	,000

Lampiran.8.Pola Berat Badan pada Media Ketiga

Model Description

Model Name		MOD_9
Dependent Variable	1	berat
Equation	1	Linear
	2	Quadratic
	3	Cubic
Independent Variable		hari
Constant		Included
Variable Whose Values Label Observations in Plots		Unspecified
Tolerance for Entering Terms in Equations		,0001

Case Processing Summary

	N
Total Cases	150
Excluded Cases ^a	90
Forecasted Cases	0
Newly Created Cases	0

a. Cases with a missing value in any variable are excluded from the analysis.

Variable Processing Summary

	Variables	
	Dependent	Independent
	berat	hari
Number of Positive Values	59	60
Number of Zeros	1	0
Number of Negative Values	0	0
Number of Missing Values	User-Missing System-Missing	0 0
	90	90

berat

Linear

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,498	,248	,235	,005

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,000	1	,000	19,124	,000
Residual	,001	58	,000		
Total	,002	59			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	-,002	,000	-,498	-4,373	,000
(Constant)	,023	,001		17,154	,000

Quadratic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,710	,504	,487	,004

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,001	2	,000	28,963	,000
Residual	,001	57	,000		
Total	,002	59			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	,006	,001	1,927	4,220	,000
hari ** 2	-,001	,000	-2,477	-5,425	,000
(Constant)	,013	,002		6,265	,000

Cubic**Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,723	,522	,497	,004

The independent variable is hari.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,001	3	,000	20,401	,000
Residual	,001	56	,000		
Total	,002	59			

The independent variable is hari.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
hari	-,001	,005	-,293	-,184	,854
hari ** 2	,001	,002	2,781	,766	,447
hari ** 3	,000	,000	-3,121	-1,459	,150
(Constant)	,019	,004		4,406	,000