

Keragaman Genetik Populasi Lalat Myiasis *Chrysomya bezziana* di Indonesia Berdasarkan Analisis DNA Mitokondria

APRIL H. WARDHANA¹, S. MUHARSINI¹ dan WIDYA ASMARA²

¹Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

²Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Jl. Tehnika Utara, Yogyakarta

(Diterima dewan redaksi 3 Maret 2004)

ABSTRACT

WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI and W. ASMARA. 2004. Genetic diversity of myiasis fly, *Chrysomya bezziana* population in Indonesia based on mitochondrial DNA. *JITV* 9(2): 108-114.

Chrysomya bezziana is a fly causing myiasis in most livestock in Indonesia. To date, the genetic diversity of *C. bezziana* has been argued among researchers. The aim of this study was to analyse genetic diversity of *C. bezziana* population in Indonesia using mitochondrial cytochrome b gene (cyt b) as a marker. The preliminary study showed that the larvae instar III stadium (L3) was the most appropriate sample for molecular analysis and identification. Twenty-four L3 were collected from cattles, buffalos and horses in Bogor, Makassar and East Sumba. DNA samples were isolated from muscle tissue of the larvae. The fragment of cyt b gene (279 bp) was amplified using primer CB3FC-NINFA. The PCR product was subsequently purified, sequenced and analysed using PAUP version 4. The results showed that *C. bezziana* from Indonesia was different with those from Asia, basically for DNA sequences, however it had similar to those from Papua New Guinea. Two haplotypes were identified i.e. haplotype 6 (Makassar haplotype that similar to those from Papua New Guinea) and haplotype 7 (Bogor haplotype that similar to those from Makassar and East Sumba).

Key words: *Chrysomya bezziana*, genetic diversity, mitochondrial DNA

ABSTRAK

WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI dan W. ASMARA. 2004. Keragaman genetik pada populasi lalat *Chrysomya bezziana* di Indonesia berdasarkan analisis DNA mitokondria. *JITV* 9(2): 108-114.

Chrysomya bezziana adalah lalat penyebab myiasis (belatungan) yang menyerang ternak di Indonesia. Selama ini, keragaman genetik *C. bezziana* masih menjadi perdebatan di kalangan para peneliti. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik pada populasi *C. bezziana* di Indonesia dengan analisis gen sitokrom b sebagai penanda. Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa stadium larva instar III (L3) merupakan stadium yang sesuai untuk analisis dan identifikasi molekuler. Sebanyak 24 ekor L3 yang dikoleksi dari sapi, kerbau dan kuda berasal dari daerah Bogor, Makassar dan Sumba Timur digunakan pada penelitian ini. Sampel DNA diisolasi dari dalam jaringan otot larva. Fragmen gen sitokrom b diamplifikasi dengan primer CB3FC-NINFA. Produk PCR dipurifikasi, disekuensi dan dianalisis dengan PAUP versi 4. Hasil penelitian menunjukkan bahwa populasi *C. bezziana* di Indonesia berbeda dengan populasi di Asia tetapi identik dengan populasi Papua New Guinea berdasarkan sekuensi DNANYA. Dua haplotipe diperoleh dari penelitian ini yaitu haplotipe 6 (haplotipe Makassar yang identik dengan Papua New Guinea) dan haplotipe 7 (haplotipe Bogor yang identik dengan populasi dari Makassar dan Sumba Timur).

Kata kunci: *Chrysomya bezziana*, keragaman genetik, DNA mitokondria

PENDAHULUAN

The old world screwworm fly (OWSWF) atau *Chrysomya bezziana*, adalah lalat penyebab utama penyakit myiasis (belatungan) yang bersifat parasit obligat dan menyerang semua jenis hewan dan manusia. Kasus myiasis di Indonesia banyak ditemukan di daerah kantung ternak seperti Makassar, Sumba Timur, Yogyakarta dan Kediri (WARDHANA *et al.*, 2003a).

Sejauh ini berbagai upaya pengendalian dan pemberantasan *C. bezziana* telah banyak dilakukan. Penggunaan insektisida atau pestisida dilaporkan kurang efektif untuk mengurangi populasi lalat ini

(PARTOUTOMO, 2000). Pembuatan vaksin rekombinan yang diekspresikan ke dalam *Escherichia coli* juga tidak mampu memberikan tanggapan kebal yang protektif (SUKARSIH *et al.*, 2000a; WUIFFELS *et al.*, 2000; VUOCOLO *et al.*, 2000).

Salah satu metode pengendalian yang cukup berhasil adalah *Sterile Insect Technique* (SIT), yaitu pelepasan lalat jantan yang disterilisasi dengan teknik radiasi dan telah dikembangkan sejak tahun 1950 (GLANVILLE, 2002; WHITTEN, 2002). ROEHRDANZ dan JOHNSON (1988) berpendapat bahwa di dalam program kontrol biologis seperti SIT, keberhasilannya sangat

tergantung pada pemahaman yang jelas tentang keragaman genetik yang ada di dalam populasi tersebut.

Selama ini analisis keragaman genetik *C. bezziana* masih menjadi perdebatan di kalangan para peneliti. COLLES, yang disitir oleh SPRADBERRY (1991) menuliskan hasil analisis morfologi bahwa *C. bezziana* di dunia dibagi menjadi tiga ras yaitu ras Afrika, Arab dan Asia Tenggara. Hasil ini bertentangan dengan BROWN *et al.* (1992) yang menyimpulkan bahwa *C. bezziana* merupakan spesies tunggal berdasarkan analisis hidrokarbon kutikular sedangkan analisis isoenzim dan sitologi menunjukkan tidak adanya *sibling species* dalam populasinya (STRONG dan MAHON, 1991; BEDO *et al.*, 1994).

Pernyataan-pernyataan tersebut berbeda dengan hasil penelitian HALL *et al.* (2001) yang membagi ras *C. bezziana* menjadi dua yaitu ras sub Saharan Afrika dan ras Asia termasuk kawasan Teluk berdasarkan analisis morfologi dan DNA mitokondria (gen sitokrom b). Data yang dianalisis berasal dari sebelas negara. Populasi *C. bezziana* di Indonesia (Makassar, Sumba Timur dan Bogor) belum pernah dianalisis sebelumnya. Kondisi ini menimbulkan suatu pertanyaan kemungkinan Indonesia menjadi wilayah perantara dari dua ras yang berbeda ataukah Indonesia mempunyai keragaman genetik sendiri dan berbeda dari populasi *C. bezziana* yang diketahui selama ini.

Rangkaian informasi genetik yang terkandung di dalam DNA mitokondria dilaporkan dapat menggambarkan karakteristik suatu populasi, filogenetik dan memungkinkan untuk merekonstruksi sejarah evolusi (AVISE *et al.*, 1987; ESPIN, 1992; LESSINGER *et al.*, 2000). Gen sitokrom b adalah salah satu gen yang terdapat di dalam genom mitokondria dan banyak digunakan untuk analisis molekuler.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik dari populasi *C. bezziana* di Indonesia (Makassar, Sumba Timur dan Bogor) sekaligus mengetahui apakah Indonesia mempunyai keragaman genetik tersendiri yang berbeda dengan negara lain. Hal ini bermanfaat untuk studi epidemiologi dan dapat dijadikan acuan dalam program SIT untuk mengontrol *C. bezziana* di Indonesia atau negara lain.

MATERI DAN METODE

Sampel larva *C. bezziana*

Stadium larva yang digunakan pada penelitian ini adalah larva instar III (L3) yang direndam dengan air panas selama 15 menit dan disimpan dalam etanol 80% (WARDHANA *et al.*, 2003b). Larva-larva tersebut diperoleh dari koloni laboratorium Entomologi, Departemen Parasitologi, Balai Penelitian Veteriner, Bogor (1 isolat). Di samping itu, larva juga dikoleksi

dari lapang, yaitu Makassar (5 isolat) dan Sumba Timur (6 isolat). Sebanyak 24 sampel berupa larva (L3) dikoleksi dari 12 ternak yang menderita *myiasis* (sapi, kerbau dan kuda) dan untuk analisis DNA mitokondria digunakan dua larva dari tiap-tiap sampel.

Identifikasi larva *C. bezziana*

Larva *C. bezziana* yang diperoleh dari lapang terdiri dari berbagai stadium, yaitu telur, larva instar I (L1), II (L2) dan III (L3). Larva diidentifikasi berdasarkan SPRADBERRY (1991) dan pemeliharannya mengacu pada metode yang dikerjakan oleh SUKARSIH *et al.* (2000b).

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA larva *C. bezziana* dilakukan berdasarkan metode CHOMCZYNSKI *et al.* (1997) dengan sedikit modifikasi menggunakan DNAzol[®], yaitu jaringan otot larva digerus dalam 100 µl DNAzol[®] sampai halus kemudian ditambah lagi 150 µl DNAzol[®] dan dicampur hingga homogen.

Amplifikasi gen sitokrom b dengan PCR

Primer CB3FC-NINFA diperoleh dari laboratorium molekuler Entomologi, *Natural History Museum*, United Kingdom dan digunakan untuk mengamplifikasi 499 pasang basa (pb) yang terdiri dari 279 pb daerah N terminal gen sitokrom b dan sebagian gen tRNA^{ser} sepanjang 220 pb. Urutan pasangan basa primer adalah 5'-CATATTCAACCAGAATGATA-3' (CB3FC) dan 5'-TCATAACGAAATCGAGGTAAAGTCCC-3' (NINFA). Setiap ekstrak DNA diamplifikasi dengan dua jenis mesin *thermocycler* yaitu Perkin Elmer 9700 0,2 ml (PE 9700 0,2 ml) atau Techne 2 berdasarkan metode HALL *et al.* (2001) yang telah dimodifikasi dan dioptimasi. Setiap reaksi mengandung 33,7 µl *analar grade water*; 5,0 µl 10 x dapar PCR; 5,0 µl dNTPs dengan konsentrasi 100 mM; 3,0 µl MgCl₂ 25 mM; 1,0 µl primer *forward* 500 ng/µl; 1,0 µl primer *reverse* 500 ng/µl dan 0,3 µl enzim Taq polimerase. Kondisi PCR yang digunakan adalah [94°C (30 menit)] 1 siklus; [94°C (30 detik); 40°C (30 detik); 72°C (90 detik)] 5 siklus; [94°C (30 detik); 40°C (30 detik); 72°C (90 detik)] 35 siklus; [72°C (10 menit)] 1 siklus; [4°C]. Produk PCR difraksinasi dalam agarosa 1,5 % dan dipurifikasi dengan *glassmilk* (GeneClean II, BIO 101 Inc., Anachem, Luton, UK) sesuai prosedur pabrik.

Sekuensing dan analisis

Direct sequencing produk PCR dilakukan dengan ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). Kedua untai

disekuen secara otomatis menggunakan ABI sistem 377A dan 377. Data hasil sekuensing dijabarkan dan dikoreksi, selanjutnya dipisahkan antara sekuen daerah N terminal gen sitokrom b (279 pb) dan daerah tRNA^{ser} (220 pb) menggunakan *Sequence Navigator software* (ABI). Semua data sekuen dibandingkan dengan data sekuen populasi *C. bezziana* di Papua New Guinea dan Asia yang diperoleh dari Departemen Entomologi, *Natural History Museum*, London, UK (tidak dipublikasi). Analisis filogenetik dilakukan pada 279 pb gen sitokrom b menggunakan *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) software* versi 4 (SWOFFORD, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi dan identifikasi larva *C. bezziana*

Larva *C. bezziana* telah berhasil dikoleksi dari daerah-daerah endemis penyakit *myiasis*, yaitu pada beberapa peternakan rakyat di Sumba Timur dan di suatu *ranch*, PT. Berdikari *United Livestock* Indonesia (PT. BULI), Kecamatan Pitu Riase, Kabupaten Sidenreng Rappang (Sidrap), Makassar, Sulawesi Selatan (Tabel 1). Kasus myiasis yang terjadi di

Makassar dan Sumba Timur tergolong dalam kategori myiasis traumatika dengan infestasi larva campuran. Dua jenis larva berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari luka ini, yaitu larva *C. bezziana* dan *Sarcophaga* sp., tetapi analisis molekuler dititikberatkan pada larva *C. bezziana* sebagai agen primer penyakit *myiasis*.

Penelitian pendahuluan yang dilakukan pada L2, L3, lalat dewasa jantan dan betina membuktikan bahwa perbedaan stadium tersebut tidak berpengaruh terhadap keberhasilan ekstraksi DNA genom, amplifikasi DNA mitokondria (gen sitokrom b) dan sekuensing (WARDHANA *et al.*, 2003b). Larva instar III (L3) adalah stadium yang paling mudah untuk diidentifikasi dan dikoleksi jaringannya untuk ekstraksi DNA genom sehingga dalam penelitian ini menggunakan L3 untuk mengamplifikasi fragmen gen sitokrom b.

Amplifikasi fragmen gen sitokrom b

Fragmen gen sitokrom b merupakan salah satu fragmen yang berada di dalam genom mitokondria dan banyak digunakan untuk mempelajari filogenetik (ESCALANTE *et al.*, 1998). Pernyataan ini juga dibenarkan oleh CASTRESANA (2001) yang menyatakan bahwa variasi susunan nukleotida di dalam gen

Tabel 1. Hasil koleksi dan identifikasi larva *C. bezziana* dari Sumba Timur, PT. BULI–Makassar dan koloni Laboratorium Entomologi, Departemen Parasitologi, Balai Penelitian Veteriner (Balitvet), Bogor yang diawetkan dan digunakan untuk analisis molekuler

Lokasi koleksi/No. isolat	Tanggal koleksi	Jenis ternak	Lokasi luka	Jenis isolat	Jumlah larva
Watu Hadang Sumba Timur 2	26/03/02	Pedet	Umbilikus	L2	3
Lewa Sumba Timur 3	28/03/02	Kuda	Kaki	L3	5
Matawai Maringu Sumba Timur 4	28/03/02	Kerbau	Femur	L1 + L2	6
Lewa Sumba Timur 5	28/03/02	Kuda	Kaki	L3	15
Matawai Maringu Sumba Timur 7	04/04/02	Kuda	Femur	Telur, L1+ L3	25
PT. BULI 1 Makassar 10	02/04/02	Sapi	Rektum	L3	11
PT. BULI 3 Makassar 11	02/04/02	Sapi	Vagina	L3	12
PT. BULI 4 Makassar 12	02/04/02	Sapi	Umbilikus	L1+L2+ L3	16
PT. BULI VO89 Makassar 16	02/04/02	Sapi	Telinga	L2	11
Koloni Sumba Timur 22	26/07/02	Koloni lab.	Luka insisi femur	L3	20
Koloni Makassar 25	26/07/02	Koloni lab.	Telinga	L3	20
Koloni Bogor 29	16/03/02	Koloni lab	-	L3	10

sitokrom b sangat berguna untuk membandingkan spesies pada genus ataupun famili yang sama.

Analisis yang dilakukan pada 24 ekor L3 menggunakan primer CB3FC-NINFA menghasilkan pita tunggal yang berukuran 500 bp (Gambar 1). Ukuran ini sesuai dengan fragmen gen DNA yang dikehendaki, yaitu 499 pb. Hasil ini membuktikan bahwa semua DNA dapat diekstraksi dan diamplifikasi dengan baik menggunakan primer tersebut.

Variasi sekuen fragmen sitokrom b

Semua isolat Indonesia dipurifikasi dan diseku. Hasil sekuen, selanjutnya diedit dan diujarkan untuk dibandingkan dengan data sekuen isolat Papua New Guinea dan Asia. Jajaran sekuen sepanjang 279 pb pada gen sitokrom b menunjukkan adanya variasi susunan nukleotida (sesi polimorfik) sebanyak tiga situs. Semua situs menunjukkan kejadian transisi, yaitu penggantian satu basa purin oleh basa purin lain (A ke G dan sebaliknya) atau basa pirimidin oleh pirimidin yang lain (T ke C dan sebaliknya) (Tabel 2).

Keragaman genetik dan hubungan filogenetik *C. bezziana*

Analisis filogenetik populasi *C. bezziana* di Indonesia dilakukan dengan menggunakan populasi Asia (Haplotip 5) dan Papua New Guinea (Haplotip 6)

sebagai *out group*. Pohon filogenetik yang terbentuk menggambarkan bahwa populasi Bogor (isolat Makassar [10, 11, 12 dan 16], Sumba Timur [2, 3, 4, 5 dan 7] dan koloni laboratorium [22, 25, 29]) berbeda dengan populasi Asia maupun Papua New Guinea dan dikelompokkan dalam haplotip 7 (Gambar 1).

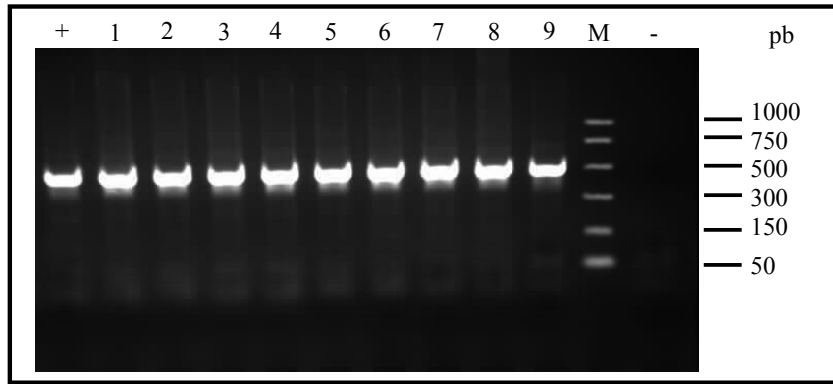
Hasil yang menarik terjadi pada populasi *C. bezziana* dari Makassar (*wild type*). Data sekuen semua isolat yang berasal dari Makassar menunjukkan data yang sama, kecuali isolat yang diperoleh dari sapi penderita *myiasis* di bagian umbilikus (isolat Makassar 12). Dua ekor larva yang dianalisis memberikan data sekuen yang berbeda. Satu larva (Ap163) mempunyai data sekuen yang diduga identik dengan populasi *C. bezziana* di Papua New Guinea sehingga dikelompokkan menjadi haplotip 6. Larva yang lainnya (Ap164) mempunyai sekuen yang identik dengan populasi koloni laboratorium Bogor dan dikelompokkan menjadi haplotip 7 (Gambar 2). Hasil ini mengindikasikan bahwa larva yang menginfestasi umbilikus sapi berasal dari dua jenis populasi *C. bezziana*, yaitu populasi Bogor dan Papua New Guinea.

Bukti ini memberi kesan bahwa di daerah Makassar terdapat populasi lalat yang identik dengan populasi Papua New Guinea atau populasi lalat Papua New Guinea merupakan bagian dari populasi lalat yang berasal dari Makassar. Dugaan ini perlu diteliti lebih lanjut apakah populasi lalat dari Makassar berasal dari

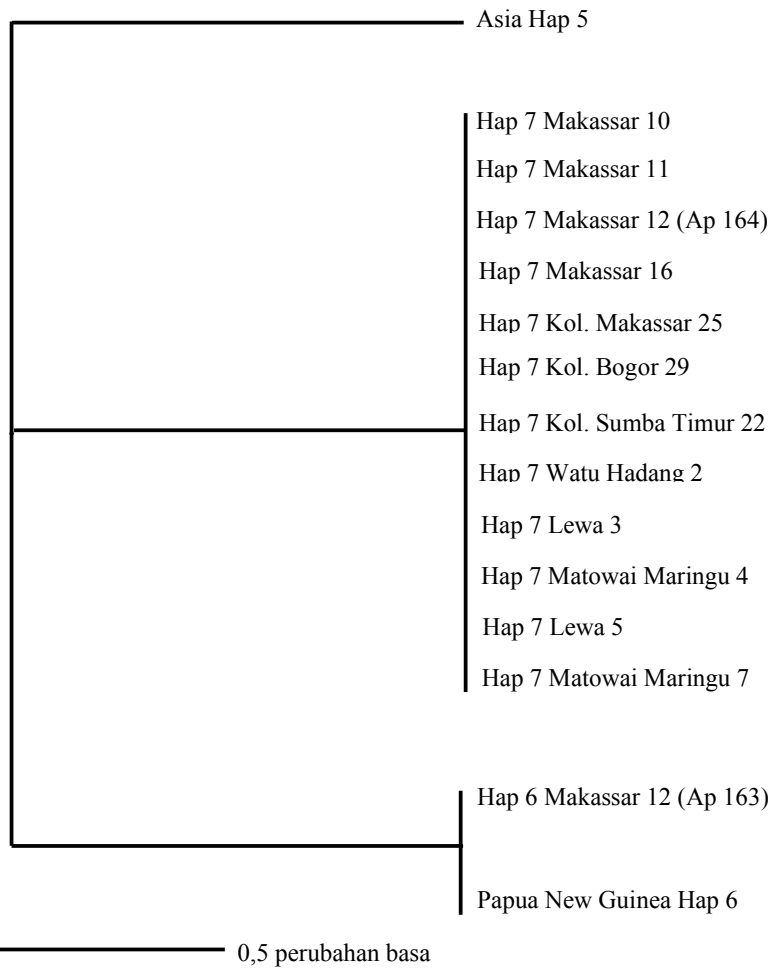
Tabel 2. Karakter haplotip fragmen gen sitokrom b yang diamplifikasi dengan primer CB3FC-NINIFA pada populasi *C. bezziana* yang berasal dari Asia, Papua New Guinea dan beberapa daerah di Indonesia

Jenis haplotipe	Lokasi/No.isolat	Posisi basa ke n		Jumlah sampel	
		57	192	210	
Hap. 5	Asia	C	T	G	-
Hap. 6	PNG	C	C	A	-
Hap. 6	Makassar 12	C	C	A	1(Ap163)
Hap. 7	Kol. Lab. Bogor 29	T	T	A	2
Hap. 7	Kol. Lab. Makassar 25	T	T	A	2
Hap. 7	Kol. Lab. Sumba Timur 22	T	T	A	2
Hap. 7	Makassar 10	T	T	A	2
Hap. 7	Makassar 11	T	T	A	2
Hap. 7	Makassar 12	T	T	A	1(Ap164)
Hap. 7	Makassar 16	T	T	A	2
Hap. 7	Watu Hadang 2 – S. Timur	T	T	A	2
Hap. 7	Lewa 3 – Sumba Timur	T	T	A	2
Hap. 7	M. Maringu 4 – S. Timur	T	T	A	2
Hap. 7	Lewa 5 – Sumba Timur	T	T	A	2
Hap. 7	M. Maringu 7 – S. Timur	T	T	A	2

Nomor analisis Ap 163 dan Ap 164 merupakan dua larva yang berasal dari ternak yang sama (Makassar 12) tetapi keduanya menunjukkan karakter haplotip yang berbeda yaitu haplotip 6 dan 7



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer CB3FC-NINFA pada gel agarosa 1,5% yang mengandung etidium bromida (10µg/µl). (+): kontrol positif; M: marker; (-): kontrol negatif; 1-2 : L3 *C. bezziana* (Koloni lab. Makassar 25); 3-4 : L3 *C. bezziana* (Makassar 10); 5-6 : L3 *C. bezziana* (Makassar 12); 7-8 : L3 *C. bezziana* (Koloni lab. Sumba Timur 22); 9 : L3 *C. bezziana* (Matowai Maringu 7)



Gambar 2. Pohon filogenetik yang menunjukkan hubungan di antara fragmen gen sitokrom b yang diamplifikasi dengan primer CB3FC-NINFA pada populasi *C. bezziana* berdasarkan analisis PAUP versi 4

Papua New Guinea atau sebaliknya. Penyebaran populasi ini diduga karena adanya transportasi ternak yang terjadi pada masa lampau atau sekarang. Ternak yang menderita *myiasis* atau mengandung larva *C. bezziana* pada masa itu terbawa ke lokasi penjualan ternak. Sepanjang perjalanan menuju daerah, larva yang sudah matang berpotensi untuk jatuh ke tanah, membuat terowongan kecil dan menjadi pupa kemudian berkembang menjadi lalat dewasa.

Analisis di atas sesuai dengan pernyataan TAYLOR *et al.* (1996) yang berpendapat bahwa pemasukan dan pemindahan ternak dari satu daerah ke daerah lain dapat menjadi jembatan penyebaran lalat penyebab *myiasis*. Laporan lain juga menyebutkan bahwa manusia diduga menjadi sarana penyebaran lalat *C. bezziana* dari lokasi geografisnya.

Pendapat ini dapat dianalogikan dengan kejadian *myiasis* di sungai Mississippi. Seperti yang dituliskan oleh WYSS (2000) bahwa sebelum tahun 1933 tidak pernah dilaporkan adanya kasus *myiasis* di sungai Mississippi, namun setelah adanya kiriman sapi yang terinfeksi ke Georgia pada Juli 1933 maka kasus *myiasis* tersebar dengan cepat di daerah sekitar sungai ini bahkan sampai mencapai Florida Selatan. Para peternak melaporkan adanya peningkatan jumlah ternak yang mati, kebutuhan insektisida, obat-obatan hewan dan penurunan berat badan serta produksi susu akibat serangan lalat *screwworm*.

Kondisi yang sama juga diinformasikan oleh ROEHRDANZ dan JOHNSON (1988) yang menuliskan bahwa kasus *myiasis* tidak pernah dilaporkan di Bahamas sampai tahun 1943. Wabah *myiasis* baru terjadi ketika mendatangkan kambing dari Kuba ke daerah Bahamas. Peristiwa ini dapat dijadikan bukti bahwa kiriman ternak dari daerah satu ke daerah yang lain dapat menjadi media penyebaran lalat *C. bezziana* di Indonesia. Adanya populasi lalat yang berasal dari Papua New Guinea di Makassar diduga karena terbawa pada saat transportasi ternak terjadi.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis 279 pb gen sitokrom b (DNA mitokondria), populasi *C. bezziana* di Indonesia (Makassar, Sumba Timur dan Bogor) mempunyai keragaman genetik yang berbeda dengan populasi Asia, tetapi identik dengan populasi Papua New Guinea terutama populasi dari Makassar. Sebanyak dua kelompok haplotip diperoleh dari penelitian ini, yaitu haplotip 6 (haplotip Makassar yang identik dengan populasi Papua New Guinea), haplotip 7 (haplotip Bogor yang identik dengan populasi Makassar dan Sumba Timur).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada *International Atomic Energy Agency* (IAEA) yang telah memberikan bantuan dana untuk penelitian ini. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Martin J. R. Hall, Dr. Paul D. Ready, Johan Ingle dan Adam Zoe atas sumbangan saran dan fasilitas selama analisis molekuler di *Natural History Museum*, London, United Kingdom. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Bapak Dr. Soegiarto, Drh. Effendy dan Damalele dari Balai Penyelidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV), Ir. H. Jundawi, Irsan dan Thamrin atas bantuan dan ijinnya untuk mengoleksi larva di PT. BULI, Sidrap, Makassar, Sulawesi Selatan.

DAFTAR PUSTAKA

- AVISE, J.A., J. ARNOLD, R.M. BALL, E. BERMINGHAM, J.E NEIGEL, C.A. REEB and N.C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489–522.
- BEDO, D. G., J. P. SPRADBERRY and R. J. MAHON. 1994. Cytogenetic variation in natural populations of the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *Genomea* 37: 390–398.
- BROWN, W. V., R. MORTON and J.P. SPRADBERRY. 1992. Cuticular hydrocarbons of the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae). Chemical characterization and quantification by age and sex. *Comp. Biochem. Physiol.* 101: 665–671.
- BROWN, M. V., R. MORTON, M. J. LACEY, J. P. SPRADBERRY and R. J. MAHON. 1998. Identification of the geographical source of adults of the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae) by multivariate analysis of cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.* 199: 391–399.
- CASTRESANA, J. 2001. Cytochrome b phylogeny and taxonomy of great apes and mammals. *Mol. Biol. Evol.* 18: 465–471.
- CHOMCZYNSKI, P., K. MACKEY, R. DREWS and W. WILFINGER. 1997. DNazol[®]: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Bio Techniques* 22: 550–553.
- ESCALANTE, A. A., E. E. FREELAND, E. W. COLLINS and A. A. LAL. 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 8124–8129.

- ESPIN, A. M. L. A. 1992. Mitochondrial DNA variability in geographical populations of the Brazilian screwworm fly. *In: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques*. Vienna. pp. 161–165.
- GLANVILLE, R. 2002. Screwworm fly– the risk of incursion, and economic studies in Australia. Proc. of screwworm fly emergency preparedness conference. Canberra. 12–15 November 2001. Department of Agriculture Fisheries and Forestry Australia. OCVO. pp. 73–84.
- HALL, M. J. R., W. EDGE, J. M. TESTA, Z. J. O. ADAMS and P.D. READY. 2001. Old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, occurs as two geographical races. *Med. Vet. Entomol.* 15: 393–402.
- LESSINGER, A.C., M. A. C. JUNQUIERA, T. A. LEMOS, E. L. KEMPER, F. R. DA SILVA, A. L. VETTORE, P. ARRUDA and A. M. L. A. ESPIN. 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Ins. Mol. Biol.* 9: 521–529.
- PARTOUTOMO, S. 2000. Epidemiologi dan pengendalian myiasis di Indonesia. *Wartazoa* 10: 20–27.
- ROEHRDANZ, R. L. and D. A. JOHNSON. 1988. Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* 25: 136–141.
- SPRADBERY, J.P. 1991. A Manual for the Diagnosis of Screwworm Fly. CSIRO Division of Entomology. Canberra. Australia.
- STRONG, K. L. and R. J. MAHON. 1991. Genetic variation in the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *Bull. Entomol. Res.* pp. 491–496.
- SUKARSIH, S. PARTOUTOMO, G. WEIJFFELS and P. WILLADSEN. 2000a. Vaccination trials in sheep against *Chrysomya bezziana* larvae using the recombinant peritrophin antigens Cb 15, Cb 42, and C 48. *JITV* 5: 192–196.
- SUKARSIH, S. PARTOUTOMO, R. TOZER, E. SATRIA, G. WIJFFELS and G. RIDDING. 2000b. Establishment and maintenance of a colony of the old world screwworm fly *Chrysomya bezziana* at Balitvet in Bogor, West Java, Indonesia. *JITV* 5: 144–149.
- SWOFFORD, D.L. 2000. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP), Version 4.0b 10. Illinois Natural History Survey, Urbana, Illinois.
- TAYLOR, D. B., A. L. SZALANSKI and R. D. PETERSON. 1996. Mitochondrial DNA variation in screwworm. *Med. Vet. Entomol.* 10: 161–169.
- VUOCOLO, T., F. SUPRIYANTI, S. MUHARSINI and G. WIJFFELS. 2000. cDNA library construction and isolation of genes for candidates vaccine antigens from *Chrysomya bezziana* (old world screwworm fly). *JITV* 5: 160–169.
- WARDHANA, A. H., S. MUHARSINI dan SUHARDONO. 2003a. Koleksi dan kejadian myiasis yang disebabkan oleh Old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana* di daerah endemik di Indonesia. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2003. Bogor, 29–30 September 2003. hlm. 235–239.
- WARDHANA, A. H., S. MUHARSINI and SUHARDONO. 2003b. Metode pengawetan larva dan lalat *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae) untuk analisis DNA mitokondria. *JITV* 8: 264–275.
- WEIJFFELS, G., T. VUOCOLO, S. MUHARSINI and F. SUPRIYANTI. 2000. Bacterial expression of larval peritrophin of *Chrysomya bezziana*. *JITV* 5: 170–176.
- WHITTEN, M. 2002. The sterile insect technique and its potential for Australia. Proc. of screwworm fly emergency preparedness conference Canberra. Department of Agriculture Fisheries and Forestry Australia. pp. 58–64.
- WYSS, J. H. 2000. Screwworm eradication in the America. *In: Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests*. Universiti Sains Malaysia, Penang. pp. 79–86.