

Metode Pengawetan Larva dan Lalat Dewasa *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae) untuk Analisis DNA Mitokondria

APRIL H. WARDHANA, S. MUHARSINI dan SUHARDONO

Balai Penelitian Veteriner, PO BOX 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 31 Oktober 2003)

ABSTRACT

WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI and SUHARDONO. 2003. Reliable preservation methods of mitochondrial DNA analysis for larvae and adult flies of *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *JITV* 8(4): 264-275.

The Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana* is known as a myiasis agent in Indonesia. The aim of the study is to establish a reliable preservation methods for molecular analysis of insect. Cytochrom b (CB) and Cytochrome Oxidase sub unit I (COI) of mitochondrial DNA were used as markers. Drying method was used to preserve adult flies, while the larvae were kept in 10% formalin and 80% ethanol with or without soaked using hot water prior preservation. Two samples of each preservation were tested. Four primers were used to amplify samples using Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR product were then purified and sequenced. Sequence data analysis of all samples suggested no differences between all preservation methods except using 10% formalin. Preservation samples using 10% formalin is not suitable for collecting mitochondrial DNA of insect. The best methods was using 80% ethanol with killed using hot water prior preservation. This method was able to extract a stabile mitochondrial DNA.

Key words: *Chrysomya bezziana*, preservation, formalin, ethanol, mitochondrial DNA

ABSTRAK

WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI dan SUHARDONO. 2003. Metode pengawetan larva dan lalat dewasa dari *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae) untuk analisis DNA mitokondria. *JITV* 8(4): 264-275.

The Old World Screwworm Fly atau *Chrysomya bezziana* merupakan agen penyakit myiasis di Indonesia. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui metode pengawetan serangga yang baik guna kepentingan analisis molekuler. Gen sitokrom b (CB) dan sitokrom oksidase sub unit I (COI) dari DNA mitokondria digunakan sebagai marka. Metode pengawetan terdiri dari pengawetan kering untuk lalat dewasa sedangkan pada larva menggunakan formalin 10% dan etanol 80%. Pengawetan dengan etanol 80% dilakukan dengan dua cara, yaitu larva hidup langsung diawetkan dalam etanol 80% dan larva direndam dahulu dengan air panas kemudian diawetkan dalam etanol 80%. Masing-masing perlakuan menggunakan dua sampel. Empat jenis primer digunakan untuk mengamplifikasi fragmen CB dan COI dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil PCR dipurifikasi yang selanjutnya diseku. Data sekuen menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan pada semua sampel kecuali pada larva yang diawetkan dalam formalin 10%. Metode ini tidak sesuai untuk mengoleksi DNA mitokondria insekta. Metode pengawetan yang baik adalah larva instar III (L3) yang dibunuh dengan air panas dan disimpan di dalam etanol 80% karena menghasilkan ekstrak DNA mitokondria yang stabil.

Kata kunci : *Chrysomya bezziana*, pengawetan, formalin, etanol, DNA mitokondria

PENDAHULUAN

The Old World Screwworm Fly (OWSWF) atau *Chrysomya bezziana* merupakan salah satu agen penyakit myiasis (belatungan) yang bersifat parasit obligat. Larva lalat ini menginfestasi jaringan tubuh hewan berdarah panas maupun manusia. Larva hidup dan berkembang dengan cara memakan jaringan hidup pada luka induk semang. Lalat ini tersebar di kawasan Afrika bagian tropis dan sub tropis, subkontinen India, Asia Tenggara termasuk Filipina, Malaysia, Indonesia dan Papua New Guinea (NORRIS dan MURRAY, 1964; SUKARSIH *et al.*, 1989; SUTHERST *et al.*, 1989; SPRADBERY, 1991).

Salah satu metode pengendalian myiasis yang cukup efektif adalah pelepasan lalat jantan yang disterilisasi dengan teknik radiasi. Metode ini dikenal dengan nama *Steril Insect Technique* (SIT) dan telah dikembangkan sejak tahun 1950 (GLANVILLE, 2002; WHITTEN, 2002). Keberhasilan SIT sangat tergantung pada pemahaman yang jelas tentang variasi genetik di dalam populasi tersebut (ROEHRDANZ dan JOHNSON, 1988). Oleh karena itu data-data molekuler yang dapat menggambarkan adanya variasi genetik dalam suatu populasi hama mutlak diperlukan.

Keberhasilan cara mengoleksi, menyimpan dan mengarsip suatu sampel dari lapang dengan baik dan benar merupakan salah satu syarat untuk memperoleh

data molekuler yang berguna dalam studi taksonomi, filogenetik, identifikasi molekuler, populasi genetik, diagnosis dan vaksinasi (OTRANTO dan STEVENS, 2002). Metode pengawetan sampel dari lapang yang tepat akan memberikan data informasi genetik yang akurat (LORENZO *et al.*, 2003). Pernyataan ini didukung oleh ESPIN (1992) yang menyatakan bahwa pendekatan molekuler dalam pemberantasan hama terbukti cukup efektif untuk menghasilkan data yang cepat dan akurat termasuk mampu mendeteksi geografi asal usul suatu hama sehingga dapat diambil tindakan secara dini untuk mencegah penyebaran hama yang lebih luas.

Senyawa etil alkohol (etanol) dan formalin merupakan senyawa umum yang banyak digunakan untuk mengawetkan sampel yang diperoleh dari lapangan (SPRADBERY, 1991; SHAUFF, 2001). Metode ini telah lama digunakan dan dimodifikasi dengan senyawa-senyawa yang lain untuk memperpanjang masa penyimpanannya (SIMMONS, 1993). Beberapa data membuktikan bahwa metode penyimpanan dalam pendingin (*ultra cold freezing* -80°C) sangat efektif untuk studi molekuler insekta (POST *et al.*, 1993; REISS *et al.*, 1995). Kelemahan metode ini adalah tidak praktis untuk diterapkan di lapangan. SPRADBERY (1991) melaporkan bahwa pengawetan larva lalat penyebab myasis dapat dilakukan dengan cara membunuhnya di dalam air panas kemudian disimpan di dalam etanol 70-80% atau di dalam formalin. HALL *et al.* (2001) berhasil mengekstraksi DNA dari larva hidup yang langsung dimasukkan ke dalam etanol 70-80%. Menurut CRUICKSHANK (2002), pada umumnya pengawetan sampel secara kering (*drying*) tidak sesuai untuk analisis DNA.

Tujuan penelitian ini untuk membandingkan metode pengawetan yang telah dipakai oleh para peneliti terdahulu sekaligus memperoleh metode pengawetan yang tepat untuk analisis DNA mitokondria dari larva dan lalat *C. bezziana* dengan menggunakan marka gen sitokrom b (CB) dan sitokrom oksidase sub unit I (COI). Dalam tulisan ini akan dibahas kelebihan dan kekurangan masing-masing metode pengawetan tersebut untuk keperluan analisis molekuler.

MATERI DAN METODE

Sampel

Koloni lalat dan larva *C. bezziana* diperoleh dari Laboratorium Entomologi, Departemen Parasitologi, Balai Penelitian Veteriner (BALITVET), Bogor, Indonesia. Di samping itu, diuji juga koloni isolat lapang dari Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV), Maros, Sulawesi Selatan. Isolat yang diperoleh dari lapang, diidentifikasi berdasarkan SPRADBERY (1991) sebelum dilakukan ekstraksi DNA.

Pengawetan sampel

Pengawetan larva *Chrysomya bezziana*

Larva yang digunakan dalam penelitian ini diawetkan dengan tiga cara, yaitu :

1. Larva direndam dengan air panas selama 15 menit selanjutnya larva disimpan dalam tabung yang berisi etanol 80% (SPRADBERY, 1991).
2. Larva hidup langsung disimpan dalam etanol 80% (HALL *et al.*, 2001).
3. Larva hidup langsung disimpan dalam formalin 10% (SPRADBERY, 1991).

Semua larva yang sudah diawetkan disimpan pada suhu -20°C untuk analisis lebih lanjut.

Pengawetan lalat *Chrysomya bezziana*

Pengawetan lalat *C. bezziana* dilakukan secara kering. Lalat jantan dan betina dewasa dipuasakan semalam dan dibunuh dengan cara memasukkan lalat tersebut ke dalam pendingin -20°C selama 24 jam. Lalat yang telah mati dikeringkan di dalam inkubator dengan suhu 50°C sampai digunakan untuk analisis lebih lanjut (HALL *et al.*, 2001).

Pembedahan larva dan lalat

Pembedahan larva dan lalat untuk analisis DNA mitokondria dilakukan berdasarkan metode HALL *et al.* (2001) yaitu :

Pembedahan larva *Chrysomya bezziana*

Larva diletakkan ke dalam cawan kaca berdiameter 1,5 cm dan dicuci sebanyak 3 kali menggunakan *analar grade water* dengan selang waktu 5 menit. Setelah itu, larva dipindahkan ke dalam cawan kaca berdiameter 2,5 cm yang telah berisi *analar grade water* (VWR Internasional, Leicester, UK) untuk dilakukan pembedahan di bawah mikroskop stereo. Insisi dilakukan pada tubuh larva sepanjang 3 ruas (5 mm) yaitu dimulai dari ruas ke-dua hingga ke-empat dengan skalpel steril. Kulit tubuh larva dibuka menggunakan pinset steril sehingga terpisah antara kulit dan jaringan otot. Jaringan otot dipotong pada ujung-ujungnya menggunakan pinset steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disimpan pada -70°C untuk analisis lebih lanjut. Sisa tubuh larva dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 1,5 ml yang berisi etanol 80% dan disimpan pada -20°C.

2. Pembedahan lalat *Chrysomya bezziana*

Lalat dari pengawetan kering diambil dan dimasukkan ke dalam cawan kaca berdiameter 2,5 cm yang telah berisi *analar grade water* (VWR

Internasional, Leicester, UK). Punggung lalat dibedah di bawah mikroskop stereo dengan gunting mikro steril. Bagian kulit punggung digunting membentuk segi empat dan dikupas sehingga terlihat jaringan ototnya. Jaringan ini diambil dengan menggunakan pinset steril, dimasukkan ke dalam tabung mikro steril dan disimpan pada suhu -70°C untuk analisis lebih lanjut. Sisa tubuh lalat dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 1,5 ml dan disimpan pada suhu -20°C .

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA lalat dan larva *C. bezziana* dilakukan berdasarkan metode CHOMCZYNSKI *et al.* (1997) dengan sedikit modifikasi. Ekstraksi ini menggunakan reagen DNAzol[®] (Invitrogen, Paisley, UK). Jaringan otot asal larva dan lalat *C. bezziana* di ambil dari -70°C dan dihangatkan dengan cara digenggam selama 2 menit kemudian dibekukan kembali pada suhu -70°C selama 2 menit. Perlakuan ini diulang sebanyak 2 kali dengan tujuan melunakkan jaringan otot. Sebanyak 100 μl DNAzol[®] dimasukkan ke dalam tabung mikro yang telah berisi jaringan otot lalat atau larva dan dilumatkan menggunakan *pestles* steril, selanjutnya ditambahkan 150 μl DNAzol[®] dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang berisi DNA diambil dan ditransfer ke tabung mikro steril yang baru. DNA diendapkan dengan menambahkan etanol absolut dingin (disimpan dalam -70°C minimal 5 menit) dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Pelet DNA dicuci dan dihomogenisasi dengan 250 μl etanol 95% sampai pelet terlepas lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan pelet DNA dikeringkan ke dalam oven (80°C) selama 2 menit, selanjutnya ditambahkan 1XTE sebanyak 30 μl . Ekstrak DNA yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C untuk analisis lebih lanjut.

Amplifikasi gen penyandi dengan PCR

Dua gen penyandi digunakan untuk analisis DNA mitokondria yaitu sitokrom b (CB) dan sitokrom oksidase sub unit I (COI). Setiap sampel ekstrak DNA diamplifikasi dengan mesin *thermocycler* Perkin Elmer 9700 0,2 ml (PE 9700 0,2 ml) atau Techne 2 berdasarkan metode HALL *et al.* (2001) yang telah dimodifikasi. Setiap reaksi mengandung 33,7 μl ddH₂O; 5,0 μl 10 x dapar PCR (Promega PCR *buffer*); 5,0 μl dNTPs dengan konsentrasi 100 μmol ; 3,0 μl MgCl₂ (25 mM) dengan konsentrasi 1,5 mM; 1,0 μl primer *forward* 500ng/ μl ; 1,0 μl primer *reverse* 500 ng/ μl dan 0,3 μl enzim *Taq polimerase* dengan konsentrasi 1,5 Unit. Pencampuran ini dilakukan dalam *laminar flow* (Baissaire, Southampton,UK) dengan kondisi steril selanjutnya ditambahkan DNA sebagai cetakan sebanyak 1 μl pada tabung PCR sehingga volumenya menjadi 50 μl . Penambahan DNA ini dilakukan di luar *laminar flow*.

Empat pasang primer yang diperoleh dari *Natural History Museum* (NHM) - London digunakan untuk mengamplifikasi gen-gen penyandi (Tabel 1). Pasangan primer CB1SE-CB3R3A digunakan untuk mengamplifikasi 439 pasang basa (pb) yang mencakup daerah C terminal gen penyandi CB sedangkan pasangan primer CB3FC-NINFA digunakan untuk mengamplifikasi 499 pb yang terdiri dari 279 pb daerah N terminal gen penyandi CB dan sebagian gen tRNA^{ser} sepanjang 220 pb. Kedua primer ini dirancang sedemikian rupa sehingga terdapat daerah *overlap* antara kedua fragmen tersebut. Pasangan primer CB1SE-PDRWRO4 merupakan gabungan dari kedua primer di atas yaitu mengamplifikasi 717 pb. Gen penyandi COI sebesar 582 pb diamplifikasi menggunakan pasangan primer COIUEA7F-COI10R.

Kondisi PCR untuk masing-masing pasangan primer telah berhasil dioptimasi dan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Jenis-jenis primer yang digunakan untuk analisis gen sitokrom b (CB) dan sitokrom oksidase sub unit I (COI) pada larva dan lalat *C. bezziana*

No. Urut	Primer	Sekuen	Jumlah basa
1	CB1SE	5'- TATGTATTACCATGAGGACAAATATC-3'	439 pb
	CB3R3A	5'- AATAAGCTAGGAGGAGTAATTGC-3'	
2	CB3FC	5'- CATATTCAACCAGAATGATA-3'	499 pb
	NINFA	5'-TCATAACGAAATCGAGGTAAAGTCCC-3'	
3	CB1SE	5'- TATGTATTACCATGAGGACAAATATC-3'	717 pb
	PDRWRO4	5'- ATTTACGCTCATTA ACT-3'	
4	COIUEA7F	5'-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3'	582 pb
	COI10R	5'-TAATATGGCAGATTAGTGCAATGAA-3'	

Tabel 2. Kondisi PCR masing-masing pasangan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen sitokrom b (CB) dan sitokrom oksidase sub unit I (COI) pada larva dan lalat *C. bezziana*

Primer	Kondisi PCR
CB1SE-CB3R3A	[94°C (30 menit)] 1 siklus
CB1SE-PDRWRO4	[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]
CB3FC-NINFA	[94°C (30 menit)] 1 siklus [94°C (30 detik); 38°C (30 detik); 72°C (90 detik) 5 siklus [94°C (30 detik); 42°C (30 detik); 72°C (90 detik) 35 siklus [72°C (10 menit)] 1 siklus [4°C]
COIUEA7F-COI10R	[94°C (30 menit)] 1 siklus [94°C (30 detik); 48°C (30 detik); 72°C (90 detik) 35 siklus [72°C (10 menit)] 1 siklus [4°C]

Hasil amplifikasi fragmen gen CB dan COI dielektroforesis menggunakan agarose berkonsentrasi 1,5% (b/v). Alat elektroforesis dihubungkan dengan tegangan listrik 50 volt, 40 mA selama 90 menit. Fragmen gen yang berhasil diamplifikasi dideteksi menggunakan *Gene Snap (Syn Gene)* dan produk PCR dipurifikasi dengan *glassmilk* (GeneClean II, BIO 101., Anachem, Luton, U.K.).

Sekuensing dan analisis data

Direct sequencing produk PCR dilakukan dengan ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). Sebanyak 10-20 ng DNA produk PCR digunakan untuk menyekuen 100 pb. Total volume setiap reaksi adalah 20 µl yang terdiri dari 11 µl 10 ng/µl mtDNA murni, 1 µl 3,2 pmol/ml primer *forward* atau *reverse*, 4 µl 2,5 x larutan dapar dan 4 µl 0.5 x BigDey (BD). Formula ini diamplifikasi pada mesin *thermocycler* (Perkin Elmer 9700 0,2 ml atau Techne 2) dengan kondisi 96°C selama 2 menit sebanyak 1 siklus yang dilanjutkan 96°C, 30 detik; 50°C, 20 detik; 60°C, 4 menit sebanyak 25 siklus dan diakhiri dengan suhu 5°C. Sekuensing dilakukan menggunakan ABI sistem 377A dan 377 (*automated sequencing*). Data hasil sekuen diujarkan dan dikoreksi menggunakan *Sequence Navigator software* (ABI).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengawetan larva dan lalat *C. bezziana*

Formalin dan etanol dilaporkan dapat menyebabkan perubahan dimensi fisik pada sampel yang diawetkan. Perubahan tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: konsentrasi dan tipe senyawa kimia yang digunakan, lama periode penyimpanan, kadar garam dan temperatur penyimpanan. Faktor dari sampel seperti umur, tahap perkembangan dan ukuran, juga berpengaruh terhadap perubahan dimensi sampel (MAC DONAL *et al.*, 1997). DiSTEPHANO *et al.* (1994) membuktikan bahwa secara fisik tidak ada pengaruh yang nyata pada sampel yang diawetkan dengan etanol maupun formalin. Penemuan ini berbeda dengan hasil HJORLEIFSSON dan KLIEN-MACPHEE (1992) yang melaporkan bahwa sampel yang disimpan dalam formalin akan menyusut dibandingkan dengan etanol.

Umumnya sampel larva lalat penyebab myasis yang diperoleh di lapangan diawetkan dengan tiga metode, yaitu a) dibunuh dalam air panas dan diawetkan di dalam etanol 80%, b) langsung diawetkan di dalam etanol dalam 80% dan c) diawetkan di dalam formalin 10% sedangkan lalat dewasa diawetkan dalam bentuk kering (SPRADBERY, 1991; HALL *et al.*, 2001).

CHRUICKSHANK (2002) menyebutkan bahwa sampel yang diawetkan di dalam etanol dengan konsentrasi lebih rendah dari 70% akan memberikan hasil ekstrak DNA yang bervariasi. Seluruh hasil amplifikasi gen penyandi CB dan COI pada larva dan lalat *C. bezziana* dapat dilihat pada Tabel 3.

Ditinjau dari metode pengawetan larva *C. bezziana* menunjukkan bahwa pengawetan yang dilakukan dengan cara membunuh larva dengan air panas dan disimpan dalam etanol 80% lebih baik dibandingkan dengan metode yang lainnya (Tabel 3). Keuntungan membunuh larva dengan air panas adalah otot larva menjadi kontraksi sehingga didapatkan larva yang lurus dan tidak melengkung. Di samping itu, spina (bentukan duri) yang tumbuh disekitar tubuhnya dapat terbentuk dengan baik (SPRADBERY, 1991). Metode ini sangat membantu dalam upaya identifikasi larva dari lapangan sebelum melakukan ekstraksi DNA untuk analisis molekuler selanjutnya.

Untuk bahan perbandingan dilakukan pengawetan dengan cara larva dimasukkan langsung ke dalam etanol 80% (HALL *et al.*, 2001). Metode ini tidak mampu membunuh larva secara langsung sehingga diperoleh larva yang lemas. Selain itu larva cenderung

berubah warna menjadi hitam dibandingkan dengan metode yang direndam terlebih dahulu dengan air panas. Perubahan warna ini mengakibatkan identifikasi larva lebih sulit. Hasil ini sesuai dengan pendapat SHAUFF (2001) yaitu pengawetan larva insek yang baik adalah dengan cara membunuhnya di dalam air panas kemudian disimpan di dalam etanol 70-80%. Metode ini dapat melindungi protein larva dan mencegah larva menjadi hitam.

Hasil pengawetan dengan formalin 10% diperoleh larva yang baik untuk kepentingan identifikasi namun tidak lebih baik dari larva yang dibunuh dengan air panas. Pengawetan larva dengan formalin menyebabkan jaringan menjadi rapuh sehingga tidak dianjurkan untuk keperluan analisis molekuler kecuali untuk kepentingan pembuatan preparat histologik (SHAUFF, 2001).

Berbeda dengan pengawetan larva, lalat dewasa diawetkan dalam bentuk kering. Pengawetan ini merupakan metode standar yang praktis untuk insekta. Namun, SHAUFF (2001) menyatakan bahwa pengawetan ini tidak sesuai untuk jenis diptera karena dapat menyebabkan kerusakan pada kepala, kaki, dan antena yang mudah menjadi patah.

Tabel 3. Hasil amplifikasi gen penyandi DNA mitokondria dengan berbagai jenis primer pada larva dan lalat *C. bezziana* yang diawetkan dengan berbagai metode

No. sampel	Metode pengawetan	Jenis sampel	Konsentrasi DNA (ng) dan jenis primer			
			CB1SE-CB3R3A	CB3FC-NINFA	CB1SE-PDRWR04	COIUEA7F-COI10R
Ap71	Kering	btn	800	600	Td	800
Ap72	Kering	btn	800	700	Td	800
Ap81	Kering	jtn	-	250	Td	150
Ap82	Kering	jtn	800	700	Td	800
Ap111	Etanol	L3	800	700	Td	800
Ap112	Etanol	L3	600	500	Td	800
Ap161	Air/etanol	L3	450	700	300	400
Ap162	Air/etanol	L3	500	700	300	600
Ap175	Formalin	L3	-	-	-	-
Ap176	Formalin	L3	-	-	-	-
Ap177	Air/etanol	L2	Td	Td	400	150
Ap178	Air/etanol	L2	Td	Td	400	150

Jtn : Lalat dewasa jantan
Td : Tidak dikerjakan
Btn : Lalat dewasa betina
- : Tidak teramplifikasi

Ekstraksi dan amplifikasi DNA genom *C. bezziana*

Pemilihan jaringan atau bagian tubuh yang tepat untuk ekstraksi DNA sangat tergantung pada jenis organisme dan tipe karakterisasi molekuler yang akan dilakukan (LORENZO *et al.*, 2003). Tujuan pemilihan ini untuk menghindari kemungkinan adanya bahan-bahan kontaminan yang dapat mempengaruhi hasil analisis molekuler. KOCH *et al.* (1998) memilih bagian kepala untuk mengekstraksi DNA genom lalat hitam (*Simulium vittatum*) untuk mencegah kontaminan dari parasit nematoda.

Bagian tubuh lalat yang digunakan pada penelitian ini adalah otot punggung sedangkan pada larva diekstraksi DNA genom *C. bezziana* dari tubuh larva mulai ruas ke-dua hingga ke-empat. Menurut SPRADBERRY (1991), dalam perkembangan larva menjadi lalat dewasa, ruas ke-dua hingga ke-empat ini akan menjadi punggung lalat sehingga penentuan bagian tubuh antara lalat dewasa dan larva untuk ekstraksi DNA pada penelitian ini adalah sama.

Dasar pertimbangan dipilihnya bagian punggung untuk ekstraksi DNA genom karena dapat menghasilkan ekstrak DNA genom paling banyak dibandingkan bagian tubuh yang lain. Penentuan jaringan ini sesuai dengan HALL *et al.* (2001) dan WELLS dan SPERLING (2001) yaitu mengambil otot punggung untuk analisis molekuler menggunakan marka DNA mitokondria. JUNQUIERA *et al.* (2002) menyatakan bahwa ekstraksi DNA dari bagian punggung lalat menghasilkan produk PCR yang paling baik dibandingkan dengan bagian kaki dan abdomen sedangkan STEVEN (2002) menginformasikan bahwa untuk mencegah kontaminasi DNA lalat dari protein pencernaan (*ingested protein*), protein dari saluran pencernaan dan telur maka bagian punggung merupakan bagian yang sesuai sebagai sumber DNA.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan DNAzol[®]. CHOMCZYNSKI *et al.* (1997) menyebutkan bahwa reagen DNAzol[®] mengandung campuran *chaotropic agent guanidine thiocyanate* dan deterjen dalam larutan pelisisnya sehingga mampu melakukan seleksi secara spesifik pada presipitasi DNA dari lisat sel. Reagen ini merupakan “reagen siap pakai” untuk mengisolasi DNA genom sampel dari binatang, tumbuhan, yeast dan bakteri yang berbentuk cair atau padat.

Keuntungan metode ini antara lain mudah pelaksanaannya, cepat dan dapat mengisolasi DNA genom dari sampel yang banyak ataupun sedikit. CHOMCZYNSKI *et al.* (1997) melaporkan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk mengekstraksi DNA dengan DNAzol[®] berkisar 10–30 menit dengan perolehan ekstrak DNA sekitar 70–100%.

Berdasarkan alasan-alasan di atas maka ekstraksi DNA dilakukan menggunakan reagen DNAzol[®]. Hasil

yang diperoleh menunjukkan bahwa DNA genom sampel dapat diekstraksi dalam waktu relatif singkat. Keberhasilan ekstraksi DNA dapat dibuktikan pada saat melakukan amplifikasi gen marka dengan PCR yang selanjutnya divisualisasikan dalam gel agarose 1,5% yang mengandung etidium bromida.

Marka yang digunakan adalah gen CB dan COI. Gen-gen tersebut merupakan piranti yang sesuai untuk mempelajari variasi genetik dan karakterisasi molekuler suatu individu (READY *et al.*, 1997; ESSEGHIR *et al.*, 2000).

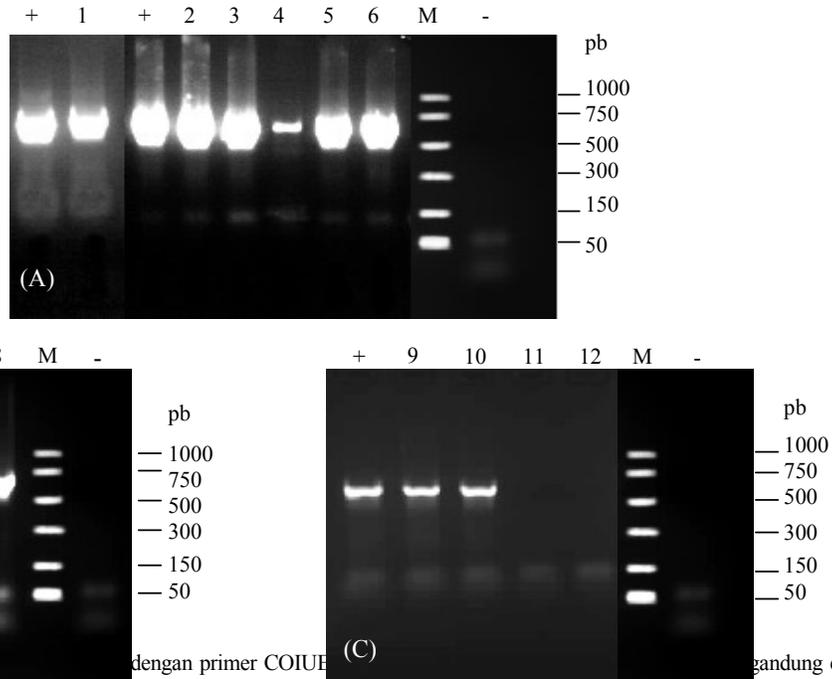
Amplifikasi pertama dilakukan menggunakan pasangan primer COIUEA7F-COI10R yang ditujukan untuk mengamplifikasi gen COI sebesar 582 pb. Pasangan primer lainnya ditujukan untuk mengamplifikasi fragmen-fragmen pendek CB yaitu 439 pb (CB1SE-CB3R3A) dan 499 pb (CB3FC-NINFA), karena diduga dalam proses ekstraksi DNA diperoleh berbagai macam ukuran fragmen akibat pengaruh metode pengawetan sampel. Pasangan primer CB1SE-PDRWR04 merupakan gabungan primer diatas yang ditujukan untuk mengamplifikasi fragmen gen CB yang panjang (717 pb).

Hasil amplifikasi fragmen COI dengan primer COIUEA7F-COI10R yang divisualisasikan ke dalam gel agarose 1,5% menunjukkan pola pita tunggal yang terletak di antara 500-750 pb (Gambar 1). Ukuran ini sesuai dengan fragmen yang dikehendaki yaitu 582 pb. Umumnya semua DNA genom sampel dapat diekstraksi dan diamplifikasi kecuali sampel yang diawetkan dalam formalin 10% (Gambar 1C, kolom 11 dan 12).

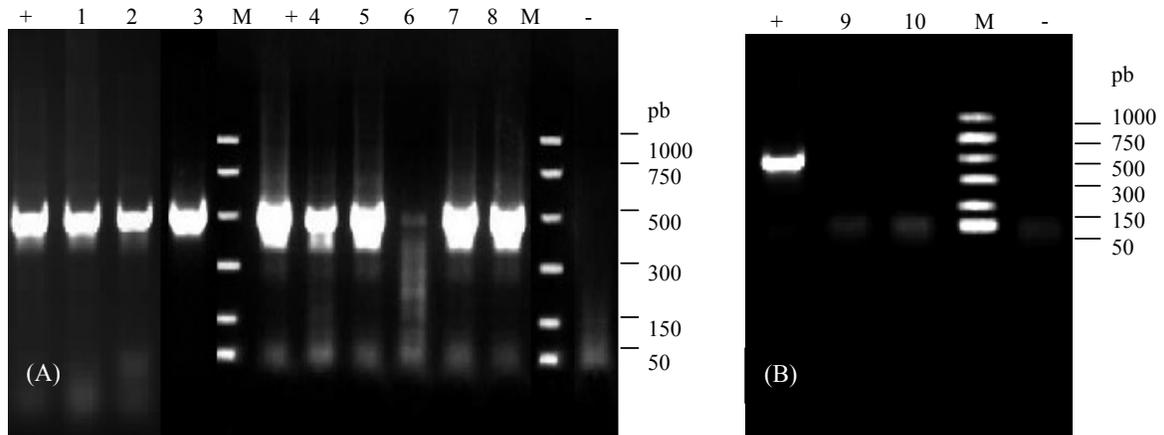
Hasil yang sama juga terjadi pada fragmen gen CB yang diamplifikasi dengan pasangan primer CB1SE-CB3R3A. Hasil visualisasi pada gel agarose 1,5% menunjukkan pola pita tunggal yang terletak dikisaran 300-500 pb. Posisi ini sesuai dengan ukuran fragmen DNA yang dikehendaki yaitu 439 pb (Gambar 2A). DNA sampel yang diawetkan dalam formalin 10% tidak berhasil diekstraksi dan diamplifikasi (Gambar 2B, kolom 9 dan 10).

Munculnya pola pita pada fragmen gen CB dan COI dengan intensitas yang bervariasi diduga karena jumlah fragmen yang teramplifikasi tidak sama. Fragmen DNA mitokondria yang memiliki konsentrasi dan tingkat kemurnian yang tinggi akan memunculkan pita yang tebal dan jelas sedangkan fragmen DNA mitokondria dengan konsentrasi rendah akan terlihat pita yang tipis (Gambar 1).

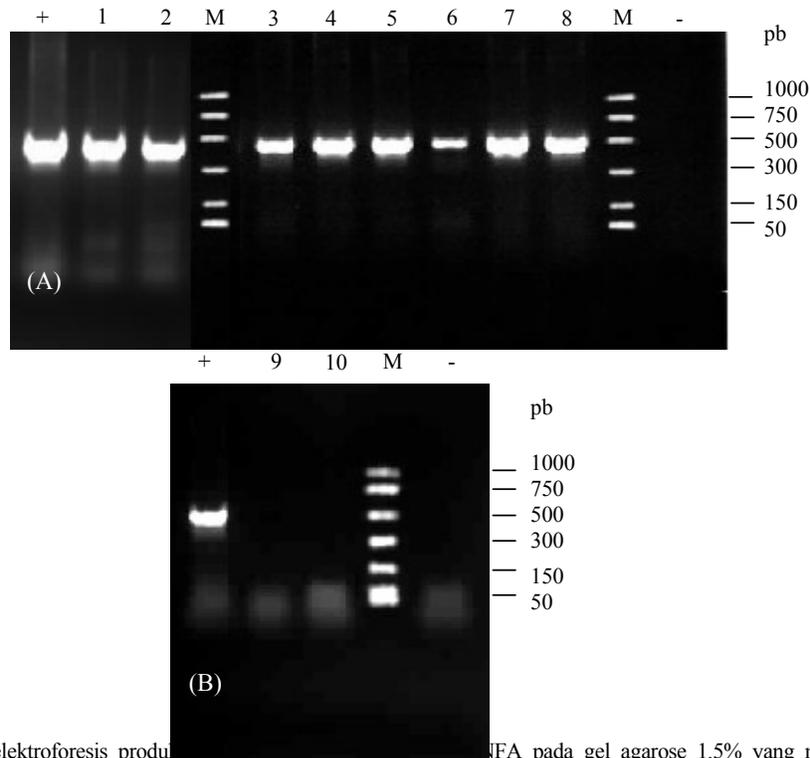
Hasil amplifikasi fragmen gen CB dengan pasangan primer CB3FC-NINFA dapat dilihat pada Gambar 3. Pola pita tunggal muncul di kisaran 500 pb pada gel agarose 1,5%. Berdasarkan hasil ini menunjukkan bahwa ekstraksi dan amplifikasi juga berjalan dengan baik kecuali sampel yang diawetkan dengan formalin 10% (Gambar 3B, kolom 9 dan 10).



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer COIU dan COII pada gel agarose 1,5% yang mengandung etidium bromida. (A). +: kontrol positif; M: Marka; -: kontrol negatif; 1: Ap112 [etanol]; 2: Ap111 [etanol]; 3: Ap82 [kering]; 4: Ap81 [kering]; 5: Ap72 [kering] dan 6: Ap71 [kering]. (B). 7: Ap162 [air/etanol] dan 8: Ap161 [air/etanol]; (C). 9: Ap178 [air/etanol]; 10: Ap177 [air/etanol]; 11: Ap176 [formalin]; 12: Ap175 [formalin].



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer CB1SE-CB3R3A pada gel agarose 1,5% yang mengandung etidium bromida. (A). +: kontrol positif; M: Marka; -: kontrol negatif; 1: Ap162 [air/etanol]; 2: Ap161 [air/etanol]; 3: Ap112 [etanol]; 4: Ap111 [etanol]; 5: Ap82 [kering]; 6: Ap81 [kering]; 7: Ap72 [kering] dan 8: Ap71 [kering]. (B) 9: Ap176 [formalin] dan 10: Ap175 [formalin]



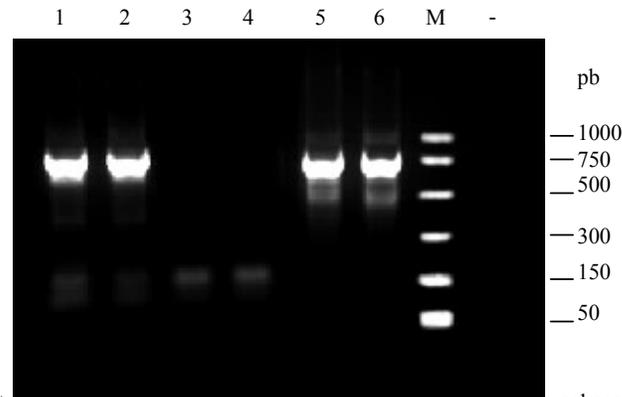
Gambar 3. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer CB1SE-PDRWR04 pada gel agarose 1,5% yang mengandung etidium bromida. (A). +: kontrol positif; M: Marka; -: kontrol negatif; 1: Ap162 [air/etanol]; 2: Ap161 [air/etanol]; 3: Ap112 [etanol]; 4: Ap111 [etanol]; 5: Ap82 [kering]; 6: Ap81 [kering]; 7: Ap72 [kering] dan 8: Ap71[kering]. (B) 9: Ap176 [formalin] dan 10: Ap175 [formalin]

Pola pita tunggal yang terbentuk pada sampel Ap 81 (lalat dewasa jantan) terlihat lebih tipis dibandingkan dengan sampel yang lainnya, bahkan pada fragmen gen CB yang diamplifikasi dengan primer CB1SE-CB3R3A tidak terlihat adanya pola pita tunggal (Gambar 2A). Ketidakberhasilan dalam mengekstraksi DNA pada sampel Ap 81 dikonfirmasi dengan sampel Ap 82 yang merupakan ulangan dari Ap 81. Sampel Ap 82 menunjukkan pola pita tunggal yang jelas. Kondisi ini diduga pada saat pengambilan cetakan DNA dari tabung mikro pada sampel Ap 81, homogenisasi tidak berjalan sempurna. Faktor lainnya adalah pada tahap ekstraksi DNA genom, penghancuran jaringan tidak berjalan baik sehingga hanya diperoleh cetakan DNA yang sedikit atau konsentrasi DNA rendah. Meskipun dengan primer CB1SE-CB3R3A tidak teramplifikasi dengan baik (Gambar 2A) tetapi sampel Ap 81 dapat teramplifikasi dengan pada pasangan primer COIUEA7F-COI10R (Gambar 1A) dan CB3FC-NINFA (Gambar 3A).

Berdasarkan hasil-hasil amplifikasi di atas menunjukkan bahwa metode pengawetan dengan etanol 80% pada larva instar III (L3) mampu mempertahankan

stabilitas DNA daripada sampel yang diawetkan dengan formalin 10%. Uji selanjutnya dicoba enam sampel untuk mengamplifikasi fragmen gen CB yang lebih panjang dengan primer CB1SE-PDRWR04. Uji ini menyertakan larva instar II (L2) yang dibunuh dengan air panas dan disimpan dalam etanol 80%.

Hasil amplifikasi fragmen gen CB dengan pasangan primer CB1SE-PDRWR04 menunjukkan bahwa semua sampel dapat teramplifikasi dengan baik kecuali sampel yang diawetkan dengan formalin 10% (Gambar 4). Tujuan penggunaan primer ini adalah untuk efisiensi waktu dalam menganalisis DNA mitokondria. Apabila dengan primer ini sudah dapat diamplifikasi dengan baik maka tidak diperlukan lagi mengamplifikasi dengan pasangan primer CB1SE-CB3R3A dan CB3FC-NINFA. Amplifikasi fragmen pendek hanya dilakukan jika amplifikasi dengan pasangan primer CB1SE-PDRWR04 tidak berhasil. Hasil ini juga menunjukkan bahwa DNA larva instar II (L2) yang mempunyai ukuran lebih kecil tubuh daripada L3 mampu diekstraksi dan diamplifikasi dengan pasangan primer ini.



Gambar 4. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer CBTSE-FDRWK04 pada gel agarose 1,5% yang mengandung etidium bromida. M: Marka; -: kontrol negatif; 1: Ap178 [air/etanol]; 2: Ap177 [air/etanol]; 3: Ap176 [formalin]; 4: Ap175 [formalin]; 5: Ap162 [air/etanol] dan 6: Ap161 [air/etanol]

Berdasarkan amplifikasi menggunakan empat jenis primer menunjukkan bahwa sampel yang diawetkan di dalam formalin 10% tidak memberikan hasil yang diharapkan. OVERTON dan MC COY (1994) melaporkan bahwa formalin mampu menghalangi *binding propidium iodide* (PI) dan *flourescent dye* terhadap DNA. Menurut PARAJ *et al.* (2002), formalin menyebabkan terjadinya *crosslinks* pada DNA dan protein. Kondisi ini mengakibatkan degradasi DNA dan juga berpengaruh jelek terhadap proses *blotting* DNA (WIRGIN *et al.*, 1997). Studi yang dilakukan KOSHIBA *et al.* (1993) menunjukkan bahwa degradasi DNA pada sampel yang disimpan dalam formalin disebabkan oleh suhu yang tinggi, kadar garam dan pH yang rendah dan adanya asam formik dalam formalin. Sampel yang disimpan dalam formalin 10% dengan *buffer* pospat (pH 7,4) yang mengandung 173 mM garam Na dan disimpan dalam 4°C mampu mempertahankan stabilitas DNA sampel.

Berbeda dengan formalin, sampel yang diawetkan dengan etanol 80% umumnya menunjukkan hasil yang lebih baik dan tidak ada perbedaan antara larva instar II (L2) maupun larva instar (L3) (Gambar 4). Menurut SHAUFF (2001) bahwa sampel yang akan digunakan untuk studi molekuler sebaiknya diawetkan dalam etanol 95% atau etanol 100% dan disimpan dalam -20°C. Formalin tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai pengawet sampel yang akan dikarakterisasi secara molekuler. Hasil yang lebih baik dapat diperoleh dengan menambahkan sedikit garam dalam etanol (SKRECKY, 1996).

FUKATSU (1999) membandingkan bahan pengawet insekta yaitu aseton, etanol, metanol dan kloroform untuk mengisolasi DNA insekta *Acyrtosiphon pisum*. Hasil PCR menunjukkan bahwa insekta yang diawetkan dengan kloroform dan metanol tidak mampu

mempertahankan stabilitas DNA dalam sampel. Hasil yang baik diperoleh pada insekta yang disimpan dalam aseton dan etanol, bahkan setelah penyimpanan selama 2 tahun masih dapat diisolasi DNANYA.

Sampel lalat yang diawetkan dengan cara kering menghasilkan ekstrak DNA mitokondria yang cukup stabil (Tabel 3). Namun, hasil penelitian ini bertentangan dengan CRUICKSHANK (2002) yang menyatakan bahwa pengawetan sampel secara kering tidak dianjurkan untuk analisis DNA. POST *et al.* (1993) membandingkan metode pengawetan lalat *Simulium damnosum* untuk studi molekuler yang diawetkan dalam nitrogen cair, larutan Carnoy's, formal saline, etanol, metanol, propanol dan pengawetan kering. DNA tidak dapat dideteksi pada sampel yang diawetkan secara kering dan dalam formal saline. DNA mengalami degradasi menjadi fragmen yang pendek-pendek pada sampel yang diawetkan dalam larutan Carnoy's, metanol dan propanol. Hasil yang baik diperoleh dari sampel yang diawetkan dalam nitrogen cair dan etanol. Kendati demikian, pengawetan insekta dengan nitrogen cair di Indonesia kurang dapat diterapkan karena harganya yang relatif mahal dibandingkan dengan etanol.

Untuk mengetahui informasi genetik yang terkandung pada lalat dan larva instar III (L3) maka dilanjutkan dengan sekuensing. Hasil penjabaran data sekuensing menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nukleotida antara larva instar II (L2), larva instar III (L3), lalat jantan dan betina (Gambar 5). Data sekuensing membuktikan bahwa stadium larva dan lalat dewasa yang disimpan masing-masing dengan metode etanol dan kering tidak mengurangi informasi genetik suatu sampel sehingga dapat digunakan untuk analisis molekuler.

Betina		TTTTGAGGA GCCACTGTTA TTACTIONACTT ATTATCAGCA ATCCCATATC TAGGAATTGA	
L 3		TTTTGAGGA GCCACTGTTA TTACTIONACTT ATTATCAGCA ATCCCATATC TAGGAATTGA	
L 2		TTTTGAGGA GCCACTGTTA TTACTIONACTT ATTATCAGCA ATCCCATATC TAGGAATTGA	
Jantan	61	TTTAGTTCAA TGAGTGTGAG GAGGATTTGC TGTTGATAAC GCTACACTAA CTCGATTCTT	120
Betina		TTTAGTTCAA TGAGTGTGAG GAGGATTTGC TGTTGATAAC GCTACACTAA CTCGATTCTT	
L 3		TTTAGTTCAA TGAGTGTGAG GAGGATTTGC TGTTGATAAC GCTACACTAA CTCGATTCTT	
L 2		TTTAGTTCAA TGAGTGTGAG GAGGATTTGC TGTTGATAAC GCTACACTAA CTCGATTCTT	
Jantan	121	TACATTCCAT TTCATTTTAC CATTATTGT TTTAGCTGCA ACTCTTATCC ATATTTTATT	180
Betina		TACATTCCAT TTCATTTTAC CATTATTGT TTTAGCTGCA ACTCTTATCC ATATTTTATT	
L 3		TACATTCCAT TTCATTTTAC CATTATTGT TTTAGCTGCA ACTCTTATCC ATATTTTATT	
L 2		TACATTCCAT TTCATTTTAC CATTATTGT TTTAGCTGCA ACTCTTATCC ATATTTTATT	
Jantan	181	TCTTCACGAA ACAGGATCAA ATAACCCAAT AGGATTAAT TCTAACATTG ATAAAATTCC	240
Betina		TCTTCACGAA ACAGGATCAA ATAACCCAAT AGGATTAAT TCTAACATTG ATAAAATTCC	
L 3		TCTTCACGAA ACAGGATCAA ATAACCCAAT AGGATTAAT TCTAACATTG ATAAAATTCC	
L 2		TCTTCACGAA ACAGGATCAA ATAACCCAAT AGGATTAAT TCTAACATTG ATAAAATTCC	
Jantan	241	ATTCCATCCT TACTTTACTT ACAAGGATAT TGTTGGATTT ATTATTATAA CAATAATCTT	300
Betina		ATTCCATCCT TACTTTACTT ACAAGGATAT TGTTGGATTT ATTATTATAA CAATAATCTT	
L 3		ATTCCATCCT TACTTTACTT ACAAGGATAT TGTTGGATTT ATTATTATAA CAATAATCTT	
L 2		ATTCCATCCT TACTTTACTT ACAAGGATAT TGTTGGATTT ATTATTATAA CAATAATCTT	
Jantan	301	AATTTTATTA GTATTAATTA ATCCTTATTT ACTTGGTGAT CCAGATAATT TTATTCCAGC	360
Betina		AATTTTATTA GTATTAATTA ATCCTTATTT ACTTGGTGAT CCAGATAATT TTATTCCAGC	
L 3		AATTTTATTA GTATTAATTA ATCCTTATTT ACTTGGTGAT CCAGATAATT TTATTCCAGC	
L 2		AATTTTATTA GTATTAATTA ATCCTTATTT ACTTGGTGAT CCAGATAATT TTATTCCAGC	
Jantan	361	AAATCCCTTA GTAACCCAG TTCATATTCA ACCTGAATGA TATTTCTTAT TTGCTTATGC	420
Betina		AAATCCCTTA GTAACCCAG TTCATATTCA ACCTGAATGA TATTTCTTAT TTGCTTATGC	
L 3		AAATCCCTTA GTAACCCAG TTCATATTCA ACCTGAATGA TATTTCTTAT TTGCTTATGC	
L 2		AAATCCCTTA GTAACCCAG TTCATATTCA ACCTGAATGA TATTTCTTAT TTGCTTATGC	
Jantan	421	TATTTTACGA TCTATTCCT	439
Betina		TATTTTACGA TCTATTCCT	
L 3		TATTTTACGA TCTATTCCT	
L 2		TATTTTACGA TCTATTCCT	

Gambar 5. Jajaran sekuen 439 pb gen CB dari DNA mitokondria pada lalat dewasa (jantan dan betina), larva instar III (L3) dan larva instar II (L2) berdasarkan primer CB1SE-CB3R3A

Larva instar II (L2) memberikan hasil yang sama dengan L3 tetapi dalam tahap ekstraksi DNA lebih sulit karena ukuran tubuhnya yang kecil. Lalat dewasa (jantan dan betina) juga menghasilkan ekstrak DNA mitokondria dan informasi genetik yang sama dengan L3, namun lalat dewasa lebih jarang dijumpai di lapangan kendati kasus myasis masih sering terjadi pada ternak dilokasi tersebut. Berdasarkan pertimbangan dari segi identifikasi suatu sampel yang merupakan tahap awal analisis molekuler maka bentuk sediaan larva instar III (L3) yang dibunuh dengan air panas dan disimpan dalam etanol 80% merupakan metode pengawetan yang paling tepat untuk diterapkan di lapangan. Metode pengawetan ini menghasilkan ekstrak DNA mitokondria yang stabil dan sampel-sampel yang diawetkan mudah untuk diidentifikasi dan tidak mengalami perubahan warna.

KESIMPULAN

DNA mitokondria larva *C. bezziana* berhasil diekstraksi dan dianalisis pada larva yang disimpan dengan metode direndam dalam air panas 15 menit kemudian disimpan dalam etanol 80% atau pengawetan dengan cara langsung disimpan dalam etanol 80%. Metode pengawetan secara kering pada lalat dewasa juga memberikan hasil yang sama, sedangkan pengawetan dengan formalin 10% tidak dapat digunakan untuk analisis DNA mitokondria. Untuk kemudahan identifikasi larva sebelum dianalisis secara molekuler maka metode pengawetan dengan etanol 80% yang direndam dalam air panas dapat diterapkan sebagai metode pengawetan larva yang diperoleh dari lapang. Di samping itu, etanol merupakan bahan pengawet yang mudah didapat dan harganya murah.

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) atas bantuannya dalam kelancaran mengoleksi larva di Maros, Makassar, Sulawesi Selatan.

DAFTAR PUSTAKA

- CHOMCZYNSKI, P., K. MACKAY, R. DREWS and W. WILFINGER. 1997. DNeazol[®]: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Bio Techniques*. 22: 550–553.
- CRUICKSHANK, R. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *System. Appl. Acar. Soc.* 7: 3-14.
- DISTEPHANO, R. J., J.M. ROELL, B.A. WAGNER and J.J. DECOSKE. 1994. Relative performances of four preservatives on fish and crayfish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 121: 817-823.
- 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: 161 – 165.
- ESSEGHIR, S., P.D. READY and R. BEN-ISMAIL. 2000. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larrousius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of Mediterranean subregion. *Biol. J. Linn. Soc.* 70: 189 – 219.
- FUKATSU, T. 1999. Aceton preservation: a practical technique for molecular analyses. *Mol. Ecol.* 8: 1935-1945.
- GLANVILLE, R. 2002. Screwworm fly – the risk of incursion, and economic studies in Australia. Proc. Screwworm Fly Emergency Preparedness Conference Canberra. Departement of Agriculture Fisheries and Forestry Australia. OCVO. 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.
- HJORLEIFSSON, E. and K. KLIEN-MACPHEE. 1992. Estimation of live standard length of winter flounder *Pleuronectes americanus* larvae from formalin-preserved, ethanol-preserved and frozen specimens. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 82: 13-19.
- JUNQUEIRA, A.C.M., A.C. LESSINGER and A.M.L.A. ESPIN. 2002. Methods for recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 16: 1 – 7.
- KOCH, D.A., G.A. DUNCAN, T.J. PARSONS and K. PRUESS P. 1998. Effects of preservation methods, parasites, and gut contents of black flies (Diptera: Simuliidae) on polymerase chain reaction products. *J. Med. Entomol.* 35: 314-318.
- KOSHIBA, M., K. OGAWA, S. HAMAZAKI, T. SUGIYAMA, O. OGAWA and T. KITAJIMA. 1993. The effects of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol. Res. Prac.* 189 : 66-72.

- LORENZO, P., R. HANNER and R. DESALLE. 2003. Obtaining, Storing and Archiving Specimen and Tissue Samples for Use in Molecular Studies. Percy FitzPatrick Institute. University of Cape Town, South Africa.
- MAC DONALD, J.S., C.J. WILLIAMSON, D.A. PATTERSON and H.B. HERUNTER. 1997. The shrinkage of sockeye salmon fry fixed in 10% formalin and preserved in 37.5% Isopropanol. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2198 : 22.
- NORRIS, K. R. and M.D. MURRAY. 1964. Notes on the screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae) as a pest of cattle in Papua New Guinea. *CSIRO. Aust. Div. Entomol. Tech. Pap.* 6.
- OTRANTO, D. and J.R. STEVENS. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int. J. Parasitol.* 32 : 1345-1360.
- OVERTON, W.R. and J.P. MC COY. 1994. Reversing the effect of formalin on the binding of Propidium Iodide to DNA. *Cytometry* 16 : 351-356.
- PARAJ, V.M., L. FLANAGAN and A. TEREBA. 2002. Forensic Extraction And Isolation of DNA from Hair, Tissue And Bone. *Promega Corporation.* 11-13 www.promega.com. [6 Agustus 2003].
- POST, R. J., P.K. FLOOK and A.L. MILLEST. 1993. Methods for preservation of insect for DNA studies. *Biochem. System. Ecol.* 21: 85-92.
- READY, P.D., J.C. DAY, A.A. DE SOUZA, E.F. RANGEL and C.R. DAVIES. 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bull. Entomol. Res.* 87 : 187 – 195.
- REISS, R.A., D.P. SCHWARTZ and A.C. ASHWORTH. 1995. Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environ. Entomol.* 24 : 716-719.
- 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.
- SHAUFF, M. E. 2001. Collecting and Preserving Insect And Mites: Techniques and Tools. Systematic Entomology Laboratory, USDA. National Museum of Natural History, NHB 168. Washington, D. C. 20560.
- SIMMONS, J. E. 1993. Blithe spirits: problems and potentials of fluid preservation. *In: The American Society of Ichthyologists and Herpetologists Workshop on Collections Care and Management Issues.* ASIH. 12 – 27.
- SKRECKY, D. 1996. Is permafrost burial a viable option? *Can. Cry. News.* 32.
- SPRADBERY, J.P. 1991. A Manual for the Diagnosis of Screw-worm Fly. CSIRO Division of Entomology. Canberra. Australia.
- STEVEN, J. 2002. Molecular methods for the study of myiasis-causing Calliphoridae: A phylogenetic approach *In: Enabling Technologies for the expansion of SIT for old and new world screwworm.* IAEA. Vienna. Austria.
- SUKARSIH., R. S. TOZER and M. R. KNOX. 1989. Collection and case incidence of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, in three localities in Indonesia. *Penyakit Hewan.* 21(38): 114–117.
- SUTHERST, R. W., J. P. SPRADBERY and G. F. MAYWALD. 1989. The potential geographical distribution of the Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. *Med. Vet. Entomol.* 3: 273 – 280.
- WELLS, J. and A.H. SPERLING. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *For. Sci. Inter.* 120: 110–115.
- WHITTEN, M. 2002. The sterile insect technique and its potential for Australia. Proc. of screwworm fly emergency preparedness conference Canberra. Departement of agriculture fisheries and forestry Australia. 58–64.
- WIRGIN, I., I. MACEDA, J. STABILE and C. MESING. 1997. An evaluation of introgression of atlantic coast striped bass mitochondrial DNA in a gulf of mexico population using formalin-preserved museum collections. *Mol. Ecol.* 6: 907-916.