

**PREDIKSI SILSILAH POPULASI LALAT *Chrysomya bezziana* BERDASARKAN
PARSIMONI STATISTIK (PROGRAM TCS) MENGGUNAKAN DATA SEKUEN GEN
DNA MITOKONDRIA DAN INTI**

***Genealogical Estimation of Chrysomya Bezziana Population Based on Statistical Parsimony
(TCS Program) Using Mitochondrial and Nuclear DNA Gene Sequence Data***

April H. Wardhana

Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, Jl R.E. Martadinata No. 30, Bogor
E-mail: a_hwardhana@yahoo.com

(Makalah diterima, 17 Nopember 2012 – Disetujui, 6 Juni 2013)

ABSTRAK

Pemberantasan agen penyakit myiasis (lalat *Chrysomya bezziana*) melalui program *Sterile Insect Technique* (SIT) dapat dilakukan apabila tidak terdapat “*complex sibling*” didalam populasinya. Oleh karena itu, studi penentuan spesies dan silsilah turunannya menjadi dasar penting sebelum program ini dilaksanakan. Sejauh ini, konsep spesies lalat *C. bezziana* masih menjadi perdebatan dikalangan peneliti. Makalah ini akan membahas tentang aplikasi parsimoni statistik dan keuntungannya serta intepertasi data dalam memprediksi silsilah populasi lalat *C. bezziana* di dunia sehingga pendekatan program SIT dalam pemberantasan kasus myiasis dapat direkomendasikan. Parsimoni statistik (program TCS) adalah salah satu piranti statistik yang berfungsi untuk memprediksi silsilah target gen pada tingkat populasi genetik. Analisis ini menggunakan data sekuen gen baik dari DNA mitokondria (haplotipe) ataupun DNA inti (allele). Secara garis besar, parsimoni statistik dibagi menjadi 2 tahap. Pertama adalah batas parsimoni dikalkulasi untuk mendapatkan jarak minimum perbedaan antara haplotipe/allele yang diuji. Kedua adalah mengkonstruksi jejaring (network) silsilah spesies dengan cara menghubungkan haplotipe/allele yang berbeda satu basa, dua basa, tiga basa dan seterusnya sampai jejaring parsimoni terbentuk. Apabila jarak haplotipe melebihi batas parsimoni maka jejaring tidak dapat dihubungkan. Hasil studi pada 754 spesimen lalat *C. bezziana* yang dikoleksi dari 359 lokasi di 11 negara (termasuk Indonesia) berdasarkan gen sitokrom b/cyt b (DNA mitokondria), dan *white eyes color/wec* (DNA inti) menunjukkan bahwa populasi lalat *C. bezziana* didunia terbagi menjadi dua ras, yaitu Asia dan Afrika sehingga dapat dipertimbangkan sebagai dua spesies yang berbeda atau sub-spesies. Adapun gen *Elongation Factor 1 alpha/EF1α* (DNA inti) tidak dapat membedakan kedua ras tersebut. Analisis parsimoni statistik juga mampu mengidentifikasi sub garis keturunan (modal haplotipe/allele) lalat *C. bezziana*, yaitu 3 sub garis keturunan pada gen cyt b dan 2 sub garis keturunan pada gen wec.

Kata kunci: *Chrysomya Bezziana*, Myiasis, Parsimoni Statistik, Program TCS, Silsilah.

ABSTRACT

Eradication of myiasis agent (Chrysomya bezziana fly) using Sterile Insect Technique (SIT) program could be effective if there are no sibling complexes within its extensive geographical range. Accordingly, the study of species determination and genealogical network of the flies is fundamental components for supporting the SIT program. So far, the species concept of the flies remains controversial among scientists. This paper reviews application of statistical parsimony, its advantages and data interpretation on estimating gene genealogies of C. bezziana populations, so that the SIT program approach for myiasis eradication could be recommended. The statistical parsimony (TCS Program) is a statistical tool for estimating genealogical relationship among genes at the genetic population level. The analysis uses sequence data of mitochondrial (haplotype) and nuclear (nuclear) DNA. Basically, the analysis consists of two steps. Firstly, the limit of parsimony is evaluated to determine the minimum number of differences among tested haplotypes/allele. Secondly, the network summarizing all most parsimonious results is constructed from connecting of haplotypes differing by one change, then those differing by two, by three and so on until a single network or parsimony connection limit is reached. If the haplotypes distant is more than the parsimony limit, the connection is not joined. A study on 754 specimens of the flies collected from 359 locations in 11 countries (including Indonesia) based on cytochrome b/cyt b (mitochondrial DNA) and white eyes color/wec genes (nuclear DNA) demonstrated that the population of C. bezziana in the world occurs as two races, Asian and African. It could be considered as two different species or sub-species. In addition, Elongation Factor 1 alpha/EF1α (nuclear DNA) failed to distinguish those races. The analysis also enabled to identify sub-lineages (modal haplotypes/allele) of the flies, 3 sub-lineages for cyt b and 2 sub-lineages for wec genes.

Key words: *Chrysomya Bezziana*, Genealogy, Myiasis, Statistical Parsimony, TCS Program, Genealogy.

PENDAHULUAN

Sejak dilaporkan pertama kali pada tahun 1937 oleh peneliti berkebangsaan Belanda di Minahasa, Sulawesi Utara (Kraneveld dan Schaaf, 1937), penyakit myiasis terus menyebar ke seluruh wilayah Indonesia, baik menyerang peternakan intensif maupun ekstensif (Partoutomo, 2000). Penyakit ini ditandai dengan adanya infestasi larva lalat ke dalam jaringan hidup hewan dan manusia. Berdasarkan daerah penyebarannya, penyebab myiasis di dunia terbagi menjadi tiga, yaitu lalat *Cochliomya hominivorax* yang tersebar di benua Amerika dan lalat *Wohlfahrtia magnifica* yang ditemukan di Eropa, daerah Mediterranean dan China. Adapun lalat *Chrysomya bezziana* merupakan penyebab myiasis di Afrika dan Asia, termasuk Indonesia serta Papua New Guinea (PNG) (Spradbery, 1991; Hall and Farkas, 2000; Wardhana, 2006; Geal et al., 2009; Hall et al., 2009a; Hall et al., 2009b). Beberapa pulau seperti Sulawesi, Sumba, Sumbawa, Jawa dan pulau lainnya telah diidentifikasi sebagai daerah endemis myiasis (Wardhana dan Muharsini, 2005; Wardhana, 2011). Kasus myiasis pada manusia juga pernah dilaporkan pada anak perempuan berumur 12 tahun di daerah Mamuju, Sulawesi Barat dan pada seorang nenek berumur 78 tahun di Bangkalan, Pulau Madura (Wardhana, 2011).

Berbagai upaya pengobatan dan pengendalian myiasis telah banyak dilakukan, tetapi masih memberikan hasil yang bervariasi. Potensi vaksin rekombinan yang diekspresikan ke dalam *Escherichia coli* tidak memberikan daya protektif yang efektif (Sukarsih et al., 2000; Wijffels et al., 2000; Vuocolo et al., 2000). Obat-obat yang berbasis pada herbal juga telah diuji efek cerna dan efek kontakannya sebagai insektisida termasuk pemanfaatan bio-insektisida dari *Bacillus thuringiensis* yang dikoleksi dari kandang ternak, namun hasilnya masih belum stabil dan perlu penyempurnaan dalam pembuatan formula obat (Muharsini et al., 2003; Wardhana et al., 2007; Wardhana et al., 2011).

Salah satu pendekatan alternatif yang efektif untuk mengendalikan kasus myiasis, baik di Indonesia maupun di dunia adalah dengan cara memberantas lalat penyebab myiasis melalui program *Sterile Insect Technique* (SIT), yaitu pemandulan lalat jantan dengan radiasi, yang selanjutnya dilepas di lapang agar kawin dengan lalat betina liar sehingga tidak memproduksi telur yang fertil. Akibatnya, populasi lalat myiasis akan cepat menurun (FAO, 2005; Dyck et al., 2005). Program ini telah diadopsi di beberapa negara, termasuk untuk pembebasan wabah myiasis di Libya akibat transportasi ternak pada tahun 1992 (Lindquist and Abusowa, 1992; Whitten, 2002). Namun demikian, program ini hanya efektif apabila dalam populasi serangga target tidak memiliki *complex sibling* sehingga hanya membutuhkan satu koloni lalat

saja untuk memberantas populasi lalat dari daerah/negara lain (Ready et al., 2009; Torres and Azeredo-Espin, 2009). Kegagalan program SIT untuk pemberantasan lalat myiasis *C. hominivorax* di Jamaica diduga akibat belum diketahuinya pola populasi genetik lalat sehingga terjadi ketidaksesuaian antara lalat yang diradiasi dengan lalat liar (*mating incompatibility*) (McDonagh et al., 2009). Oleh karena itu, studi penentuan spesies, populasi genetik dan silsilah turunannya menjadi dasar yang penting sebelum program SIT diaplikasikan dalam suatu daerah.

Dalam studi sistematika berdasarkan filogenetika molekuler, prediksi hubungan silsilah antar gen pada tingkat populasi genetik seringkali menghadapi permasalahan ketika dibandingkan dengan metode tradisional konstruksi pohon filogenetika seperti *maximum parsimony* (MP), *neighbor-joining* (NJ) dan *maximum likelihood* (ML) (Clement et al., 2000). Metode tradisional ini dilaporkan tidak mampu memprediksi nenek moyang (ancestral) dari populasi yang diuji. Menurut Salzburger et al. (2011), penaksiran silsilah berdasarkan data genetik (haplotipe) mempunyai peran yang sangat penting dalam berbagai disiplin ilmu biologi (taksonomi, evolusi molekuler), khususnya pada studi filogeografi, filogenetika dan populasi genetik. Salah satu analisis yang dikembangkan untuk mengontruksi hubungan silsilah suatu gen adalah parsimoni statistik atau dikenal dengan nama program TCS. Sejauh ini, konsep spesies lalat *C. bezziana* di dunia masih menjadi perdebatan dikalangan para peneliti.

Makalah ini akan membahas tentang aplikasi parsimoni statistik (program TCS) dalam memprediksi hubungan silsilah gen dari populasi lalat myiasis *C. bezziana* berdasarkan data sekuen DNA mitokondria dan inti, termasuk keuntungan serta intepertasi hasil analisisnya sehingga pendekatan program SIT dalam pemberantasan kasus myiasis dapat direkomendasikan. Disamping itu, makalah ini diharapkan dapat menjawab perdebatan konsep species *C. bezziana* dikalangan para peneliti di dunia dengan didukung bukti-bukti ilmiah terbaru.

Kontroversial keragaman genetik populasi *C. bezziana*

Berbeda dengan lalat myiasis di Amerika (*C. hominivorax*) yang telah terdokumentasi dengan baik, studi keragaman genetik lalat *C. bezziana* masih sangat terbatas dan mengundang kontroversial (Batista et al., 2009; McDonagh et al., 2009; Torres and Azeredo-Espin, 2009). Berdasarkan analisis kutikular hidrokarbon (Brown et al., 1998), politene kromosom (Bedo, 1992) dan analisis sitologi (Bedo et al., 1994) disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan filogenetika diantara populasi lalat *C. bezziana* yang diuji. Studi isoenzim pada

sampel yang lebih bervariasi, yaitu dari Timur Tengah, Afrika dan Asia Tenggara juga menunjukkan tidak adanya perbedaan sehingga mengindikasikan adanya *sibling species* dalam populasi *C. bezziana* (Strong and Mahon, 1991; Mahon 2002).

Berdasarkan studi morfologi, Colles yang disitir oleh Spradbery (1991) menyebutkan bahwa populasi *C. bezziana* terbagi menjadi tiga ras, yaitu ras Afrika, Arab dan Asia Tenggara. Hasil ini bertentangan dengan studi morfologi yang dilakukan oleh Wardhana *et al.* (2012a), yaitu populasi *C. bezziana* terbagi menjadi ras Afrika dan Asia. Studi tersebut melibatkan sampel yang lebih banyak dan beragam dari populasi lalat di Afrika sampai Asia, termasuk PNG. Karakter morfologi yang diuji juga lebih banyak, yaitu dari kepala, abdomen, thorax sehingga kesimpulan yang diperoleh lebih kuat secara ilmiah dibandingkan dengan studi Colles (Spradbery, 1991).

Menurut Strong dan Mahon (1991), secara genetik populasi *C. bezziana* dari Afrika, Oman dan PNG sangat dekat, tetapi hasil ini bertentangan dengan studi molekular yang dilakukan oleh Hall *et al.* (2001) dan Ready *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa populasi *C. bezziana* terbagi menjadi ras Asia dan ras Afrika berdasarkan sekuen 279 bp dan 715 bp gen sitokrom b (*cyt b*, DNA mitokondria). Kelemahan studi diatas adalah sampel *C. bezziana* yang diuji kurang merepresentasikan daerah penyebaran lalat tersebut di dunia, bahkan hanya menggunakan dua sampel Indonesia yang berasal dari Pulau Sumba dan Sulawesi. Kondisi ini masih membuka celah perdebatan dikalangan para peneliti penyakit myiasis di dunia dan belum mampu menjawab apakah SIT dapat diaplikasikan untuk pemberantasan lalat myiasis *C. bezziana*.

Parsimoni Statistik (Program TCS)

Parsimoni statistik adalah piranti untuk memprediksi hubungan silsilah gen pada tingkat populasi genetik yang diimplementasikan pada program TCS. Nama TCS ini merupakan kumpulan tiga nama peneliti, yaitu Templeton, Crandall dan Sing's yang telah merancang aplikasi parsimoni statistik (Clement *et al.*, 2000). Piranti tersebut menggunakan data sekuen DNA dalam format nexus atau phylip. Secara ringkas, proses komputasi parsimoni statistik dengan TCS program diawali pembacaan data sekuen masing-masing data, selanjutnya menghitung jarak (perbedaan) setiap taksa terhadap taksa-taksa lainnya. Perhitungan ini dilakukan dengan membandingkan karakter setiap data sekuen dan mencatat perbedaan antara sekuen dalam suatu baris. Kemudian, sistem komputasi akan menghubungkan setiap taksa kedalam kladogram berdasarkan algoritma

sehingga terbentuk jejaring silsilah (*genealogical network*) berdasarkan matrik jarak terpendek.

Dalam analisis filogenetika tradisional (MP, NJ dan ML), setelah sekuen DNA dijajarkan, haplotipe (DNA mitokondria) atau allele (DNA inti) diidentifikasi secara manual. Data sekuen DNA yang diolah dan direkonstruksi menjadi pohon filogenetika hanyalah sekuen haplotipe atau allele saja. Namun pada analisis parsimoni statistik (TCS program), sekuen data DNA dari seluruh sampel yang akan diolah, semuanya dimampatkan menjadi beberapa haplotipe atau allele secara komputasi berdasarkan kesamaan urutan basa nukleotida sehingga prosesnya lebih cepat dan sederhana.

Penggunaan sekuen DNA dalam piranti ini memiliki beberapa keuntungan antara lain, sekuen DNA menghasilkan data informasi genetika yang akurat melalui pengujian homologi yang lebih baik terhadap karakter-karakter yang ada, mampu menyediakan banyak *character states* akibat perbedaan laju perubahan basa-basa nukleotida di dalam lokus yang berbeda, dan telah terbukti menghasilkan sebuah hubungan kekerabatan yang lebih natural atau hubungan filogenetika yang benar.

Aplikasi parsimoni statistik untuk memprediksi silsilah gen dari lalat *C. bezziana*

Parsimoni statistik (program TCS) dilakukan pada sampel populasi lalat *C. bezziana* yang berasal dari 359 lokasi di 11 negara, yaitu Zimbabwe, Afrika Selatan, Yaman, Oman, Saudi Arabia, Iraq, Iran, India, Hong Kong, Malaysia, Indonesia termasuk diantaranya 228 sampel yang berasal dari 10 pulau di Indonesia (Wardhana *et al.*, 2012b). Sebanyak tiga marka molekuler dengan tingkat angka evolusi yang berbeda-beda digunakan untuk mengamplifikasi untaian DNA *C. bezziana*. Gen sitokrom b (*cyt b*) adalah gen yang berada didalam sel mitokondria yang mempunyai angka evolusi relatif cepat, sedangkan *gen white eye colour (wec)* adalah gen yang berada didalam sel inti dengan angka evolusi *moderate/*sedang. Adapun *gen Elongation factor 1 alpha (EF1a)* juga terdapat didalam sel inti tetapi merupakan gen yang *conserve* atau angka evolusinya sangat rendah/relatif tidak berubah. Penggunaan ketiga marka ini diharapkan mampu memberikan gambaran yang lebih jelas tentang konsep spesies dan silsilah gen dari populasi *C. bezziana* di dunia.

DNA mitokondria - gen *cyt b*

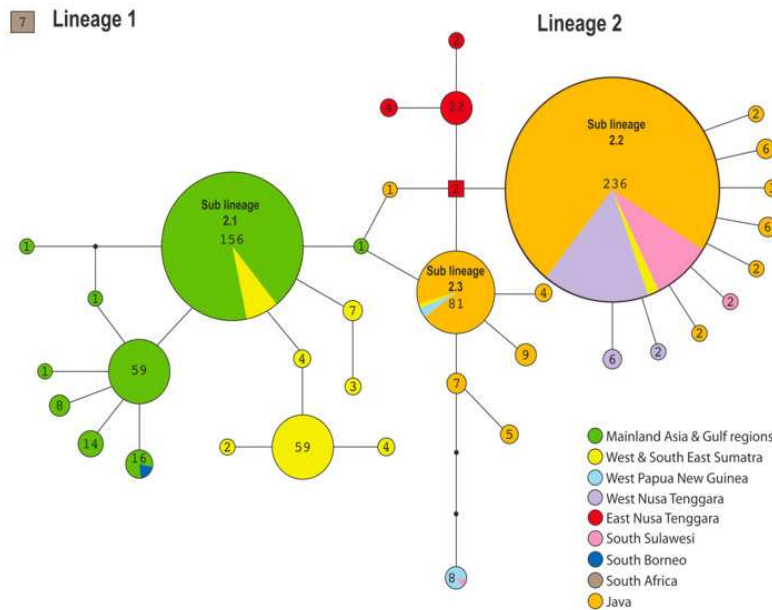
Berdasarkan analisis parsimoni statistik terhadap 715 bp gen *cyt b* dari 754 sampel dengan taraf kepercayaan 95%, telah teridentifikasi sebanyak 37 sekuen DNA yang unik (haplotipe), yaitu 28 (75,7%) diantaranya ditemukan di kepulauan Indonesia. Jejaring silsilah

(*genealogical network*) gen *cyt b* terlihat kompleks karena DNA mitokondria memiliki angka evolusi yang tinggi. Nenek moyang (*ancestor* = yang berbentuk kotak, berwarna coklat) *C. bezziana* dari Afrika terlepas dari jejaring silsilah (*genealogical network*) populasi Asia (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa populasi *C. bezziana* di dunia terjadi dari dua garis keturunan (*lineage*), yaitu Afrika (*lineage 1*) dan Asia (*lineage 2*), yang mengindikasikan adanya dua spesies atau sub spesies yang berbeda.

tidak dapat memberikan informasi perbedaan genetika dalam populasi *C. bezziana* di dunia yang ditandai dengan satu jejaring silsilah tanpa adanya langkah mutasi yang jauh (Gambar 2). Hal ini terkait dengan angka evolusi yang dimilikinya sangat rendah atau relatif tidak berubah.

DNA inti – gen *wec*

Analisis parsimoni statistik terhadap sekuen DNA *gen wec* (577 bp) mampu mengidentifikasi 21 allele yang



Gambar 1. Hubungan silsilah populasi lalat myiasis, *C. bezziana* yang berasal dari Afrika, daratan Asia termasuk daerah Teluk (Timur Tengah) dan Indonesia berdasarkan haplotipe *cyt b* yang diestimasi dengan TCS program versi 1.21. Terlihat adanya 2 *lineages* (2 garis keturunan), yaitu Afrika dan Asia. Ukuran lingkaran mengidentifikasi jumlah spesimen yang tergabung dalam satu haplotipe tertentu. Satu cabang mengindikasikan adanya satu mutasi. Titik-titik kecil mengindikasikan dugaan haplotipe lain yang belum teridentifikasi dalam studi ini.

Populasi *C. bezziana* Asia sendiri terbagi menjadi tiga *sub lineages* yang terpisahkan oleh 2 – 4 langkah mutasi dan masing-masing *sub lineage* terpendar sebanyak 1 – 4 langkah mutasi. *Sub lineage* 2.1 terdapat di Yaman, Oman, Saudi Arabia, Iraq, Iran, India, Hong Kong, Malaysia, Kalimantan dan Sumatra (Bukit Tinggi dan Lampung), sedangkan *sub lineage* 2.2 dan 2.3 hanya ditemukan di Indonesia, yaitu dari Pulau Sumatra hingga Papua Barat (Gambar 1).

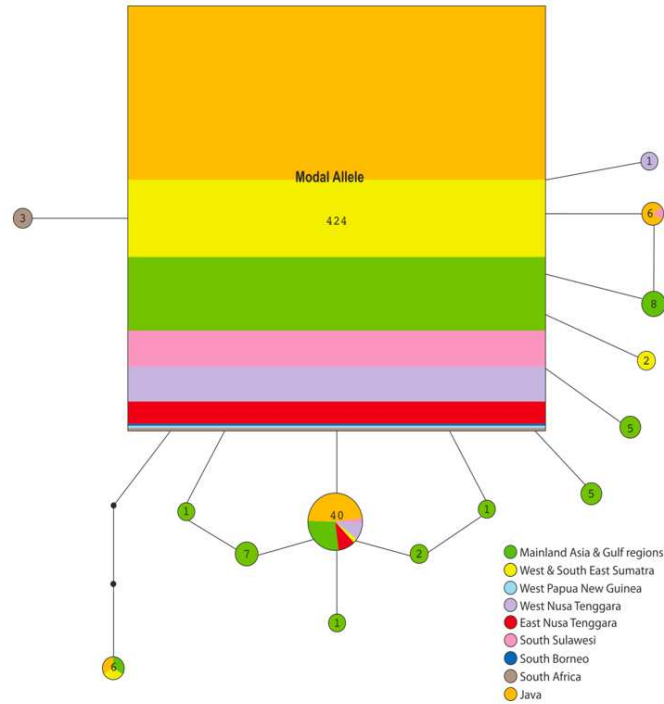
DNA inti – gen *EF1α*

Jejaring silsilah (*genealogical network*) gen *EF1α* terlihat lebih sederhana dibandingkan dengan gen *cyt b*. Analisis parsimoni statistik dari 361 bp teridentifikasi 15 allele dengan frekuensi allele tertinggi tersebar hampir diseluruh dunia. Hasil ini mengindikasikan bahwa gen ini

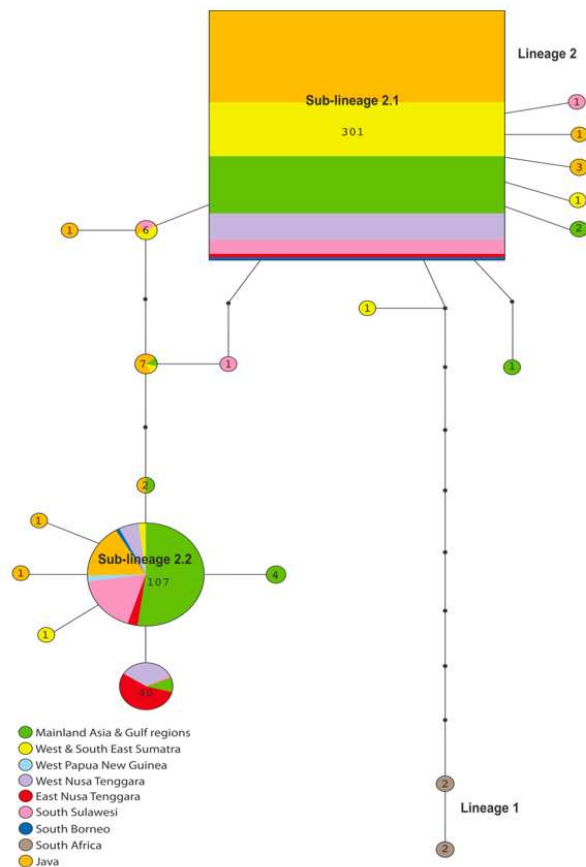
tersebar di Afrika hingga Asia termasuk PNG. Sama halnya dengan gen *cyt b*, dua garis keturunan (*lineage*) *C. bezziana* juga dibuktikan oleh marka molekuler ini. Garis keturunan 1 (*lineage 1*) terjadi hanya di Afrika yang terpisah sejauh 9 langkah mutasi, yang berarti bahwa populasi *C. bezziana* di Afrika telah terisolasi dalam jangka waktu yang sangat lama. Adapun garis keturunan 2 (*lineage 2*) tersebar di daratan Asia, kepulauan Indonesia dan PNG. Adanya 2 garis keturunan yang berbeda ini mengindikasikan bahwa populasi *C. bezziana* di Asia dan Afrika diduga merupakan dua spesies atau sub spesies yang berbeda.

Di dalam garis keturunan Asia, populasi *C. bezziana* terbagi menjadi dua *sub lineage*, yaitu *sub lineage* 2.1 dan 2.2 (Gambar 3). Keduanya banyak ditemukan didaratan Asia termasuk kepulauan Indonesia, tetapi populasi *C. bezziana* dari Papua Barat hanya memiliki *sublineage* 2.2.

Prediksi Silsilah Populasi Lalat *Chysomya Bezziana* Berdasarkan Parsimoni Statistik (Program TCS)
Menggunakan Data Sekuen Gen DNA Mitokondria dan Inti
(April H. Wardhana)



Gambar 2. Hubungan silsilah populasi lalat myiasis, *C. bezziana* yang berasal dari Afrika, daratan Asia termasuk daerah Teluk (Timur Tengah) dan Indonesia berdasarkan allele EF1 alpha yang diestimasi dengan parsimoni statistik TCS program versi 1.21. Ukuran lingkaran mengidentifikasi jumlah spesimen yang tergabung dalam satu allele tertentu. Satu cabang mengindikasikan adanya satu mutasi. Titik-titik kecil mengindikasikan dugaan allele lain yang belum teridentifikasi dalam studi ini.



Gambar 3. Hubungan silsilah populasi lalat myiasis, *C. bezziana* yang berasal dari Afrika, daratan Asia termasuk daerah Teluk (Timur Tengah) dan Indonesia berdasarkan allele wec yang diestimasi dengan parsimony TCS program versi 1.21. Ukuran lingkaran mengidentifikasi jumlah spesimen yang tergabung dalam satu allele tertentu. Satu cabang mengindikasikan adanya satu mutasi. Titik-titik kecil mengindikasikan dugaan allele lain yang belum teridentifikasi dalam studi ini.

Kesesuaian hasil analisis parsimoni statistik dengan analisis lainnya

Untuk mendapat hasil kesimpulan yang lebih tangguh, umumnya analisis parsimoni statistik disandingkan dengan hasil analisis lain. Wardhana *et al.* (2012b) telah melakukan studi filogeografi populasi *C. bezziana* berdasarkan sekuen DNA mitokondria (*cyt b*) dan DNA inti (*EF1 α* dan *wec*) dengan melibatkan sampel dari 11 negara, termasuk 10 kepulauan di Indonesia menggunakan metode filogenetika tradisional, yaitu MP dan NJ. Hasil yang diperoleh tidak bertentangan dengan hasil analisis parsimoni statistik (program TCS). Berdasarkan kedua analisis tersebut, pohon filogenetika yang dikonstruksi dari sekuen *cyt b* menunjukkan bahwa haplotipe tunggal dari Afrika bercabang di daerah basal dengan persentase 100%. Gambaran ini mengindikasikan adanya dua kelompok, yaitu Asia dan Afrika (Wardhana *et al.*, 2012b). Meskipun analisis MP dan NJ terhadap gen *EF1 α* tidak menunjukkan adanya perbedaan ini, tetapi gen *wec* mampu memberikan gambaran yang jelas tentang dua kelompok yang berbeda antara Afrika dan Asia.

Perbedaan ini dapat dipahami karena ketiga marka molekuler tersebut memiliki angka evolusi yang berbeda-beda. Marka DNA mitokondria (*cyt b*) mempunyai angka evolusi yang paling cepat sehingga keragaman banyak teridentifikasi pada populasi *C. bezziana* yang diuji. Hal ini dapat terlihat dari banyaknya haplotipe yang terdeteksi dan terbentuk jejaring silsilah yang kompleks (Gambar 1). Sebaliknya, marka DNA inti (*EF1 α*) memiliki angka evolusi yang rendah (conserve) sehingga jejaring silsilahnya sangat sederhana. Adapun marka DNA inti yang lain (*wec*) mempunyai angka evolusi yang tergolong sedang sehingga hasilnya lebih kompleks daripada *EF1 α* dan lebih sederhana daripada *cyt b*.

Disamping hasil itu, studi morfologi juga menunjukkan hasil yang sama dengan analisis parsimoni statistik. Berdasarkan *the unweighted pair-group method using arithmetic average* (UPGMA) terhadap 10 karakter morfologi tubuh membuktikan populasi lalat *C. bezziana* Afrika berbeda dengan lalat Asia (Wardhana *et al.*, 2012a). Kesesuaian hasil analisis parsimoni statistik dengan analisis MP, NJ dan morfologi semakin memperkuat kesimpulan bahwa populasi *C. bezziana* di dunia terbagi menjadi dua garis keturunan (*lineage*), yaitu Afrika dan Asia sehingga dapat meluruskan perdebatan yang selama ini terjadi.

Implikasi hasil analisis parsimoni statistika terhadap program SIT

Hasil analisis silsilah gen dari populasi lalat myiasis *C. bezziana* menggunakan parsimoni statistik mempunyai implikasi yang penting terhadap keberhasilan program SIT. Lalat yang diradiasi harus sesuai dengan lalat liar

yang akan diberantas. Analisis terhadap DNA mitokondria dan inti (gen *cyt b* dan *wec*) telah mampu membedakan populasi lalat *C. bezziana* di dunia. Pemberantasan myiasis di Afrika dengan program SIT relatif lebih mudah diaplikasikan daripada di Asia, karena populasi Afrika tidak membentuk beberapa *sub lineages* seperti pada populasi Asia. Satu koloni yang berasal dari salah satu daerah di Afrika dapat dikembangkan, diradiasi dan digunakan untuk pemberantasan lalat *C. bezziana* dikawasan Afrika.

Lain halnya dengan populasi di Asia yang memiliki kompleksitas di sepanjang daerah penyebarannya. Adanya *sub lineages* yang diidentifikasi melalui analisis parsimoni statistik mengindikasikan bahwa program SIT di Asia tidak dapat bertumpu pada satu koloni lalat saja. Di Indonesia, setidaknya memerlukan dua koloni untuk program SIT, yaitu koloni lalat Sumba atau Jawa untuk pemberantasan dikawasan pulau Jawa ke wilayah Timur hingga Papua, sedangkan pemberantasan di kawasan Sumatra dan Kalimantan harus menggunakan koloni lalat yang berasal dari Sumatra. Koloni lalat ini juga dapat digunakan untuk pemberantasan dikawasan daratan Asia termasuk Malaysia dan daerah Teluk.

Pemberantasan lalat *C. bezziana* secara global dengan program SIT sebaiknya dimulai dari pulau-pulau kecil dengan dampak ekonomis yang besar. Hendrichs *et al.* (2005) menyatakan bahwa posisi Indonesia yang berada diantara dua benua dan berbentuk kepulauan merupakan lokasi strategis dalam upaya inisiasi aplikasi program SIT. Dengan melakukan pengendalian dan pemberantasan myiasis di Indonesia, maka dapat mencegah reintroduksi lalat ini ke benua Asia atau introduksi ke benua Australia. Disamping itu, pembebasan lalat *C. bezziana* yang berbasis pulau relatif lebih mudah dilakukan daripada berbasis benua.

Analisis parsimoni statistik menunjukkan bahwa populasi lalat di Pulau Sumba memiliki keragaman yang rendah sehingga sangat ideal untuk dijadikan tempat inisiasi aplikasi program SIT di Indonesia. Pertimbangan yang lain adalah Pulau Sumba merupakan salah satu daerah sentra ternak di Indonesia dengan kasus myiasis yang cukup tinggi dan ternaknya dipelihara secara ekstensif (Wardhana dan Muharsini, 2005; Wardhana, 2011). Dengan mengembangkan isolat Sumba sebagai cikal bakal koloni yang akan diradiasi akan mempunyai banyak keuntungan karena dapat digunakan untuk pemberantasan lalat di seluruh Indonesia, kecuali pulau Sumatra dan Kalimantan.

KESIMPULAN

Silsilah lalat myiasis *C. bezziana* pada tingkat populasi genetik dapat diperkirakan dengan menggunakan analisis parsimoni statistik (program TCS). Berdasarkan data sekuen DNA mitokondria (gen *cyt b*) dan DNA inti (gen

wec) menunjukkan bahwa populasi lalat *C. bezziana* didunia terjadi dalam dua kelompok garis keturunan (lineage) yang mengindikasikan adanya dua ras (Afrika dan Asia) atau dua spesies atau sub spesies yang berbeda. Analisis ini juga didukung oleh hasil studi-studi yang lain, seperti studi morfologi dan phylogeographi yang dianalisis menggunakan filogenetika klasik.

DAFTAR PUSTAKA

- Batista, M. R. D., Ananina, G., Azeredo –Espin, A. M. L. and Klaczko, L. B. 2009. Photographic map of the polytene chromosome of *Cochliomyia hominivorax*. *Medical and Veterinary Entomology* 23 (1): 92-97.
- Bedo, D. G. 1992. Polytene chromosome of the Old World screwworm fly (*Chrysomya bezziana*) (Diptera, Calliphoridae). *Genome* 34(4):631 – 637.
- Bedo, D. G., Spradbery, J. P. and Mahon, R. J. 1994. Cytogenetic variation in natural populations of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera, Calliphoridae). *Genome* 37(3):390 – 398.
- Brown, M. V., Morton, R., Lacey, M. J., Spradbery, J. P. and Mahon, R. J. 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 – a tale of two species. *Comparative Biochemistry and Physiology part B. Biochemistry and Molecular Biology* 119(2):391-399.
- Clement, M., Posada, D. And Crandall, K. A. 2000. TCS, A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659.
- Dyck, V. A., Hendrichs, J. and Robinson, A. S. 2005. Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer. Dordrecht. The Netherland.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2005. Provisional additions, Glossary of phytosanitary terms. Secretariat of the International Plant Protection Convention (IPPC), FAO, Rome, Italy.
- Gealh, W. C., Ferreira, G.M., Farah, J. G., Teodoro, U, and Camarini, E. T. 2009. Treatment of oral myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax*, two cases treated with ivermectin. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 47 (1):23-26.
- Hall, M.J.R. and Farkas, R. 2000. Traumatic myiasis of humans and animals. Chapter 1.18. pp. 751-768, In: L. Papp and B Darvas (Eds.) Contributions to a Manual of Palaearctic Diptera Volume 1. General and Applied Dipterology. Science Herald, Budapest. 978 pp.
- Hall, M. J. R., Edge, W, Testa, J. M, Adams, Z. J. O. and Ready, P.D. 2001. Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, occurs as two geographical races. *Medical Veterinary Entomology* 15(4):393–402.
- Hall, M. J. R., Wardhana, A. H., Shahhosseini, G., Adams, Z. J. O. And Ready, P. D. 2009a. Genetic diversity of populations of Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, causing traumatic myiasis of livestock in the Gulf region and implications for control by sterile insect technique. *Medical and Veterinary Entomology* 23 (1): 51-58.
- Hall, M. J., Testa, J. M, Smith, L, Adams, Z. J, Khallaayoune, K, Sotiraki, S, Stefanakis, A, Farkas, R. and Ready, P.D. 2009b. Molecular genetic analysis of populations of Wohlfahrt's wound myiasis fly, *Wohlfahrtia magnifica*, in outbreak populations from Greece and Morocco. *Medical and Veterinary Entomology* 23 (1): 72-79.
- Hendrichs, J., Vreysen, M. J. B., Enkerlin, W. R. and Cayol J. P. 2005. Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management, in, Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S. (Eds.). Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management, Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 563-600.
- Kraneveld, F. C. and Schaaf, A. V. D. 1937. Een myiasis van de klauwen en hun omgeving by runderen. *Ned. Ind. Blad. Dierg.* 49:360-369.
- Lindquist, D. A. and Abusowa, M. 1992. Eradicating the New World Screwworm from the Libyan Arab Jamahiriya. *IAEA Bulletin* 4:17-24.
- Mahon. 2002. A trial of the sterile insect release method against the Old World Screwworm fly in Malaysia. In Proceedings of the International Conference on Control of Old World Screwworm Fly in some Countries of the Middle East. AOAD Bahrain. April 4.
- McDonagh, L., Garcia, R. and Stevens, J. R. 2009. Phylogenetic analysis of New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*, suggests genetic isolation of some Caribbean island populations following colonization from South America. *Medical and Veterinary Entomology* 23 (1):14-22.
- Muharsini, S., Wardhana, A. H, Habib and Bahagiawati, A. 2003. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from several localities of Java and South Sulawesi for Biological Control of myiasis, *Chrysomya bezziana*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 8 (3): 256-263.
- Partoutomo, S. 2000. Epidemiologi dan pengendalian myiasis di Indonesia. *Wartazoa* 10 (1): 20–27colonization from South America. *Medical and Veterinary Entomology*. 23 (Suppl.1), 14-22.

- Ready, P. D., Testa, J. M, Wardhana, A. H, Al-Izzi, M, Khalaj, M. and Hall, J. R. 2009. Phylogeography and recent emergence of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology* 23 (1):43-50.
- Salzburger, W., G. B. Ewing and A. von Haeseler. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20:1952-1963.
- Spradbery, J.P. 1991. A Manual for the Diagnosis of Screwworm Fly. CSIRO Division of Entomology. Canberra. Australia.
- Strong, K. L. and Mahon, R. J. 1991. Genetic variation in the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera, Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research* 81(4):491-496.
- Sukarsih., Partoutomo, S, Weijffels, G. and Willadsen, P. 2000. Vaccination trials in sheep against *Chrysomya bezziana* larvae using the recombinant peritrophin Antigens Cb 15, Cb 42, and C 48. *JITV. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner Special Edition* 5(3):192-196.
- Torres, T. T. and Azeredo-Espin, A. M. L. 2009. Population genetics of New World screwworm from Caribbean, insights from microsatellite data. *Medical and Veterinary Entomology* 23 (1):23-31.
- Vuocolo, T., Supriyanti, F, Muharsini, S. and Wijffels, G. 2000. cDNA library construction and isolation of genes for candidates vaccine antigens from *Chrysomya bezziana* (Old World screwworm fly). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner Special Edition* 5 (3): 160 – 169.
- Wardhana, A. H. dan Muharsini, S. 2005. Kasus Myiasis yang disebabkan oleh *Chrysomya bezziana* di Pulau Jawa. Dalam: Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor 12 - 13 September 2005. Hlm.1078-1084.
- Wardhana, A. H. 2006. *Chrysomya bezziana*, the cause of myiasis on animal and human, Problem and control. *Wartazoa* 16 (3): 146-159.
- Wardhana, A. H., Kumarasinghe, S. P. W, Arawwawala, L. D. A. M. and Arambewela, L. S. R. 2007. Larvicidal efficacy of essential oil of betel leaf (*Piper betle*) on the larvae of the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana* *in vitro*. *Indian Journal of Dermatology* 52 (1): 43-47.
- Wardhana, A. H. 2011. Phylogeography of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*, and its implications for myiasis control. Thesis. London School of Hygiene and Tropical Medicine. University of London.
- Wardhana, A. H., S. Muharsini, Santosa, A, Lakshmi, S. R. Arambewela, and S. P. Kumarasinghe. 2011. Myiasis treatment using essential oil cream of green *Piper betle* on sheep infested with *Chrysomya bezziana* larvae. National Seminar for Livestock and Veterinary Technologies. BBalitvet. Bagor. 6 – 7 June 2011.
- Wardhana, A. H., S. Muharsini, P. D. Ready, M. M. Cameron and M. J. R. Hall. 2012a. Geographical characteristics of *Chrysomya bezziana* based on external morphology study. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 17(1):36 – 48.
- Wardhana, A. H., M. J. R. Hall, S. S. Mahamdallie, S. Muharsini, M. M. Cameron and P. D. Ready. 2012b. Phylogenetics of the Old World screwworm fly and its significance for planning control and monitoring invasions in Asia. *International Journal for Parasitology* 42:729-738.
- Whitten, M. 2002. The sterile insect technique and its potential for Australia. In: Proceedings of screwworm fly emergency preparedness conference Canberra. Departement of agriculture fisheries and forestry Australia. OCVO, Canberra, 12-13 November 2001. pp. 58–64.
- Wijffels, G., Vuocolo, T., Muharsini, S. and Supriyanti, F. 2000. Bacterial expression of larval peritrophin of *Chrysomya bezziana*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (3): 170-176.