

## Deteksi Mutasi pada Gen Tubulin $\beta$ Isotype-1 Cacing *Haemonchus contortus* Isolat Resisten terhadap Benzimidazole dengan *Single Strand Conformation Polymorphism*

DYAH HARYUNINGTYAS

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 28 Maret 2005)

### ABSTRACT

HARYUNINGTYAS, D. 2005. Mutation detection on isotype-1  $\beta$  tubulin genes of *Haemonchus contortus* resistant strain to benzimidazole using single strand conformation polymorphism. *JITV* 10(3): 200-207.

Evidence of anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* to benzimidazole groups based on Larval development assay (LDA) and Fecal egg count reduction test (FECRT) test has been reported in some areas in Indonesia. Studies on sheep parasite *H. contortus* have shown that resistance to benzimidazole drugs is correlated with selection for individuals in the population possessing a specific isotype-1  $\beta$  tubulin gene. The aim of this study was to determine mutation on central part of isotype-1  $\beta$  tubulin gene of benzimidazole resistant strain *H. contortus* using Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). *H. contortus* worms were isolated from four sheep from two government farms that resistance to benzimidazole have been occurred (SPTD Trijaya, Kuningan, West Java and UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta) and one sheep that susceptible from Cicurug, Bogor, West Java as a kontrol. Resistance status to benzimidazole was reexamined individually with LDA and FECRT before sheep slaughtered. DNA was extracted from female *H. contortus* worms. A fragment of 520 bp isotype-1  $\beta$  tubulin gene was amplified using Polymerase chain reaction (PCR) and then analyze using SSCP. The results showed that there were polymorphism in isotype-1  $\beta$  tubulin gene among *H. contortus* susceptible (Cicurug, Bogor, Jawa Barat) and two *H. contortus* resistant strains from SPTD Trijaya, Kuningan, West Java and UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Mutation occurred in the different nucleotide of the two resistant strain.

**Key Words:** *Haemonchus contortus*, Benzimidazole, Isotype-1  $\beta$  tubulin gene, SSCP

### ABSTRAK

HARYUNINGTYAS, D. 2005. Deteksi mutasi pada gen tubulin  $\beta$  isotype-1 cacing *Haemonchus contortus* isolat resisten terhadap benzimidazole dengan *single strand conformation polymorphism*. *JITV* 10(3): 200-207.

Kasus resistensi cacing *Haemonchus contortus* terhadap antelmentika golongan benzimidazole yang diuji dengan metode *Larval development assay* (LDA) dan *Fecal egg count reduction test* (FECRT) telah dilaporkan terjadi di beberapa daerah di Indonesia. Studi pada *H. contortus* diketahui resistensi terhadap antelmentika golongan benzimidazole terkait dengan seleksi spesifik secara individual pada gen tubulin  $\beta$  isotype-1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya mutasi pada fragmen gen tubulin  $\beta$  isotype-1 pada cacing *H. contortus* yang resisten terhadap benzimidazole dengan metode *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP). Cacing *H. contortus* diisolasi dari 4 domba yang berasal dari 2 peternakan milik pemerintah yang diketahui telah terjadi resistensi terhadap benzimidazole yaitu SPTD Trijaya Kuningan, Jawa Barat dan UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta dan 1 ekor domba yang peka sebagai kontrol milik peternak yang berasal dari Cicurug, Bogor, Jawa Barat. Status resistensinya dicek ulang secara individual dengan LDA dan FECRT sebelum hewan dipotong. DNA genom diisolasi, selanjutnya dilakukan amplifikasi terhadap fragmen gen tubulin  $\beta$  isotype-1 dengan *Polymerase chain reaction* (PCR) sepanjang 520 bp. Hasil amplifikasi dianalisis dengan SSCP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan metode SSCP diketahui ada polimorfisme pada gen tubulin  $\beta$  isotype-1 antara cacing *H. contortus* isolat peka dengan dua isolat resisten terhadap benzimidazole yaitu dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat dan UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Mutasi terjadi pada nukleotida yang berbeda dari kedua isolat resisten tersebut.

**Kata Kunci:** *Haemonchus contortus*, Benzimidazole, Gen tubulin  $\beta$  isotype-1, SSCP

### PENDAHULUAN

Pengobatan infestasi cacing nematoda gastrointestinal terutama *Haemonchus contortus* dengan antelmentika golongan benzimidazole (BZ) perlu diwaspadai terhadap kemungkinan terjadinya resistensi. Penggunaan antelmentika secara rutin dengan dosis

yang tidak tepat diduga sebagai penyebab utama terjadinya resistensi. Di Indonesia efikasi pemberian antelmentika jarang diketahui karena keterbatasan metode deteksi yang ada. Uji laboratorium terhadap 39 sampel feses yang berasal dari beberapa peternakan di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Yogyakarta yang diperiksa menggunakan *Larval Development Assay*

menunjukkan bahwa 25% dari sampel tersebut telah terjadi resistensi (HARYUNINGTYAS *et al.*, 2001).

SILVESTRE dan HUMBERT (2000) menyatakan bahwa ada tiga proses yang menyebabkan adanya alel resisten terhadap benzimidazole yaitu (1) migrasi dan aliran gen yang memicu penyebaran alel resisten dari satu populasi ke populasi yang lain, (2) alel resisten sudah ada dalam populasi dalam jangka waktu yang lama, (3) alel resisten yang baru muncul karena adanya mutasi spontan. Studi pada *H. contortus* diketahui bahwa resistensi terhadap benzimidazole berhubungan dengan seleksi individual dalam populasi yang melibatkan gen tubulin  $\beta$  isotope-1 yang merupakan target dari benzimidazole (LACEY, 1988; ROOS *et al.*, 1990). Studi ini mengindikasikan bahwa genom *H. contortus* memiliki *single* lokus gen tubulin  $\beta$  isotope-1 dengan beberapa varian alel dalam populasi yang peka terhadap benzimidazole (BZ-P). Peningkatan resistensi terhadap benzimidazole (BZ-R) selalu berhubungan dengan peningkatan frekuensi yang signifikan terhadap satu dari beberapa alel yang sudah ada pada populasi yang peka. Penghilangan satu atau dua alel pada populasi yang peka terhadap benzimidazole mengindikasikan terjadi seleksi resistensi. Alel yang hilang mengubah kepekaan terhadap obat.

ELARD *et al.* (1996); ELARD dan HUMBERT (1999) menyatakan bahwa mutasi tunggal pada asam amino 200 yaitu fenilalanin menjadi tirosin dari gen tubulin  $\beta$  isotope-1 menyebabkan resistensi terhadap benzimidazole pada tiga spesies cacing yang dominan dari familia *Trichostrongylida* yaitu *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* dan *Teladorsagia circumcincta*. Asam amino 200 berlokasi dekat dengan salah satu dari *binding domain* (*binding domain* II: asam amino 205-208), dan perubahan ini mempengaruhi polimerisasi dan stabilitas dari mikrotubulus (FARR dan STRENLICHT, dikutip oleh KWA *et al.*, 1994). Mutasi ini juga ditemukan pada strain yang resisten terhadap benzimidazole pada protozoa dan fungi (JUNG dan OAKLEY, 1990; JUNG *et al.*, 1992). Lokasi mutasi yang terkait dengan resistensi terhadap benzimidazole pada nematoda dan fungi ditunjukkan bahwa sebagian besar terletak pada daerah sentral dari protein yang merupakan bagian yang paling *conserved*, yaitu antara asam amino 165-257 (ELARD *et al.*, 1996). Lebih lanjut, PRICHARD (2001) menyatakan bahwa selain mutasi Phe200Tyr, pada populasi benzimidazole resisten juga terjadi perubahan asam amino Phe167Tyr atau Phe167His.

Ada beberapa uji deteksi resistensi secara klasik yang biasa dilakukan yaitu *Fecal Egg Count Reduction Test* (FECRT), *Egg Hatch Assay* (EHA) dan *Larval Development Assay* (LDA) (COLES *et al.*, 1992; JOHANSEN dan WALLER, 1989). Uji deteksi resistensi secara molekuler berbasis PCR telah dikembangkan di berbagai negara di dunia karena mempunyai beberapa

keuntungan antara lain (1) metode PCR memerlukan waktu yang lebih cepat, (2) frekuensi alel pada area yang bermasalah dapat diestimasi, (3) Lebih sensitif yaitu dapat mendeteksi resistensi dengan jumlah cacing resisten dalam populasi kurang dari 1% (SILVESTRE dan HUMBERT, 2000; HUMBERT *et al.*, 2001). FECRT dapat mendeteksi resistensi hanya ketika proporsi dari individu yang resisten pada populasi lebih dari 25% (ROOS *et al.*, 1995). GASSER dan CHILTON (2001) menyatakan bahwa metode *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) dapat digunakan untuk menganalisa variasi sekuens pada individu parasit dan populasinya yang ditunjukkan dengan adanya polimorfisme. Metode PCR-SSCP akan mendeteksi substitusi, delesi atau insersi nukleotida dengan adanya perbedaan migrasi (*mobility shift*) dari fragmen DNA untai tunggal sehingga dengan mudah mendeteksi mutasi titik (*point mutation*) kurang dari 10% dari total DNA. Kombinasi *Polymerase Chain Reaction* dengan SSCP menghasilkan efisiensi biaya untuk analisis sampel dalam jumlah besar (COTTON, 1997; GASSER dan ZHU, 1999).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat polimorfisme gen tubulin  $\beta$  isotope-1 pada regio sentral sepanjang 520 bp dari cacing *H. contortus* isolat lokal Indonesia dengan metode SSCP. Selain itu juga untuk mengetahui apakah isolat resisten mempunyai pola mutasi yang spesifik dibandingkan dengan isolat peka.

## MATERI DAN METODE

### Pemilihan domba yang terinfeksi cacing

Pada penelitian ini dipilih 4 ekor domba dengan *egg per gram* (*epg*) tinggi (>2000) dan efikasi terhadap benzimidazole <80%, dari peternakan milik pemerintah yang diketahui telah terjadi resisten terhadap antelmintika golongan benzimidazole yaitu albendazole (BERIAJAYA *et al.*, 2002). Dua ekor domba dengan kode Kn dan K dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat dan 2 ekor domba dengan kode H dan C dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Satu ekor domba dengan kode Ccr yang masih peka berasal dari peternak di Cicurug, Bogor, Jawa Barat sebagai kontrol.

Keempat domba selanjutnya diuji ulang dengan LDA dan FECRT, sedangkan domba kontrol diuji dengan LDA.

### Fecal egg count reduction test (FECRT)

Hewan uji tidak diobati sebelumnya selama 8-12 minggu untuk memperoleh populasi cacing normal pada domba. Domba kontrol (tidak diobati) diperlukan untuk mengetahui perubahan alami dalam penghitungan telur selama uji dilakukan. Sebanyak 5 g feses diambil dari

tiap-tiap domba secara langsung dari rektumnya. Hewan selanjutnya diberi obat cacing yang berisi albendazole sesuai dosis rekomendasi 1 ml/5 kg BB (tiap ml mengandung albendazole 19 mg/ml). Sampel feses kemudian dikoleksi kembali 10 hari setelah pengobatan. Penghitungan *epg* dilakukan dengan metode McMaster yang dimodifikasi (COLES *et al.*, 1992). Interpretasi data dilakukan dengan menghitung persentase reduksi untuk mengetahui efikasi antelmintika dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Efikasi} = 100\% - \frac{X}{Y} \times 100\%$$

keterangan:

X = EPG 10 hari setelah pengobatan

Y = EPG kontrol

Persentase yang digunakan untuk menentukan efikasi antelmintika pada uji FECRT dan LDA adalah sesuai dengan standar WOOD *et al.* (1995) yaitu kriteria efikasi obat ditentukan sebagai berikut: sangat efektif jika efikasinya bernilai lebih dari 98%; efektif jika efikasinya 90-98%; cukup efektif jika efikasinya 80-89% dan tidak efektif jika efikasinya kurang dari 80%.

#### Larval development assay (LDA)

Sampel feses domba sebanyak 100-200 g ditampung langsung dari rektum masing-masing domba terpilih dan dipersiapkan untuk diuji LDA sesuai dengan prosedur Drenchrite (DRENCHRITE<sup>R</sup>, dikutip oleh HARYUNINGTYAS *et al.*, 2001). Penentuan efikasi dilakukan dengan melihat perkembangan larva stadium 3 (L3) yang diblokir 50%-nya (LD<sub>50</sub>) dari jumlah L3 yang tumbuh pada sumuran kontrol sesuai Tabel protokol Drenchrite<sup>®</sup>. Tingkat resistensinya ditentukan jika LD<sub>50</sub> terletak pada sumuran dengan agar berwarna hijau berarti cacing adalah peka, jika LD<sub>50</sub> terletak pada sumuran dengan agar berwarna kuning berarti cacing adalah resisten dengan tingkat resistensi rendah-sedang dan jika LD<sub>50</sub> terletak pada sumuran dengan agar berwarna merah berarti cacing adalah resisten tinggi.

Penentuan persentase spesies cacing yang dominan dilakukan dengan identifikasi L3 dari kultur larva dan L3 yang tumbuh pada sumuran berwarna kuning-merah pada *plate* LDA.

#### Isolasi DNA genom

Sebanyak 5 ekor cacing *H. contortus* betina masing-masing berasal dari abomasum domba Kn, K, H dan C serta domba Ccr diisolasi DNA-nya sesuai metode yang digunakan oleh ROOS *et al.* (1990) serta SILVESTRE dan HUMBERT (2000) yang dimodifikasi. Masing-masing cacing betina telurnya dikeluarkan terlebih dahulu dari ovariumnya kemudian diletakkan pada tabung dan ditambah larutan ekstraksi sebanyak 50  $\mu$ l yang terdiri 1

mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; 10% SDA; 5 mg/ml proteinase K, kemudian diinkubasi pada 41°C selama semalam. Jaringan cacing yang telah larut selanjutnya ditambahkan 200  $\mu$ l larutan TE yang terdiri dari 10 mM Tris HCl, pH 8 dan 1mM EDTA. Phenol dengan volume yang sama (200  $\mu$ l) ditambahkan dan diinkubasi pada *shaker* pada temperatur kamar selama 2 jam. Tabung disentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dikoleksi dan segera diekstraksi dengan chloroform/isoamylalkohol (CIAA, 24:1). Presipitasi DNA dilakukan dengan penambahan 2,5 volume etanol absolut dan natrium asetat 3M sebanyak 10% volume kemudian diletakkan pada suhu -80°C selama 1 jam. Tabung kemudian disentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit, etanol absolut pada supernatan dibuang. Pelet DNA kemudian dilarutkan kembali pada 10 $\mu$ l larutan TE dan disimpan pada -20°C (ROOS *et al.*, 1990; SILVESTRE dan HUMBERT, 2000).

#### Polymerase chain reaction (PCR)

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen tubulin  $\beta$  isotype-1 sepanjang 520 bp disusun menggunakan software Primer 3 online dari internet ([http://www\\_genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer3.html](http://www_genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer3.html)) yaitu Phc-1 (5''AGG GAG CCG AGC TAG TTG AT 3'') dan Phc-2 (5''GAG TTT CAA AGT GCG GAA GC 3''). *Polymerase Chain Reaction* dilakukan menggunakan kit *Ready To Go PCR (Amersham Bioscience)* dengan komposisi larutan terdiri dari 2  $\mu$ l DNA cacing sebagai *template*, primer Phc-1 (*forward*) dan primer Phc-2 (*reverse*) masing-masing 50 pmol (dalam 2  $\mu$ l) ditambah 19  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O sehingga volume akhir adalah 25  $\mu$ l. *Polymerase Chain Reaction* dijalankan dengan mesin *thermal cycler (Perkin Elmer 2400)* pada suhu denaturasi 95°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus, diikuti denaturasi 95°C selama 2 menit, *annealing* 56°C selama 40 detik dan ekstensi pada 72°C selama 1 menit sebanyak 36 siklus. Ekstensi terakhir pada 72°C selama 7 menit dan *hold* pada 4°C. Hasil PCR selanjutnya dielektroforesis menggunakan gel agarosa (Promega, *analytical grade*) 2% selama 20 menit kemudian divisualisasi dengan ultraviolet transluminator.

#### Single strand conformation polymorphism (SSCP)

*Single strand conformation polymorphism* merupakan suatu metode deteksi mutasi pada fragmen DNA menggunakan gel poliakrilamid tidak terdenaturasi. Prinsip SSCP adalah jika fragmen DNA untai ganda didenaturasi jadi untai tunggal, masing-masing untai membentuk struktur tersier yang spesifik tergantung pada sekuens nukleotida. Untai tunggal yang komplementer dengan konformasi yang berbeda dapat dipisahkan dan dideteksi dengan elektroporesis pada gel

poliakrilamid tidak terdenaturasi karena adanya perbedaan migrasi (MAXAM dan GILBERT, 1980; ORITA *et al.*, 1989). Adanya polimorfisme pada analisis SSCP merupakan indikator adanya mutasi.

*Single Strand Conformation Polymorphism* dilaksanakan menggunakan gel poliakrilamid tidak terdenaturasi konsentrasi 8% dengan komposisi gel terdiri dari akrilamid dan bis akrilamid dengan perbandingan 49:1, 10% gliserol, buffer TBE 1x, 45 µl 10% APS, 5 µl TEMED dan dH<sub>2</sub>O. *Running* dilaksanakan menggunakan bufer elektroforesis (TBE1x), dimana sebelumnya dilakukan *pre-run* selama 30 menit pada tegangan 150 volt. Sampel PCR diambil sebanyak 3 µl kemudian ditambah dengan 9 µl *loading dye* yang terdiri dari 95% formamid, 20 nM EDTA, 0,05% bromophenol blue, dan 0,05% xylene cyanol dalam tabung 1,5 ml kemudian disentrifus sesaat. Selanjutnya tabung diletakkan dalam air mendidih selama 10 menit untuk menghasilkan DNA untai tunggal kemudian segera dicelup ke dalam es dan disimpan pada suhu -80°C selama 10 menit. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 150 V selama 2-6 jam.

Setelah elektroforesis selesai, gel difiksasi dengan menggunakan 10% asam asetat glasial sambil digoyang pada *shaker* selama 20 menit. Gel dicuci dengan akuabides sebanyak 3 kali. Setelah pencucian selesai dilakukan pengecatan perak nitrat 0,1% selama 30 menit. Gel dicuci kembali dengan akuabides selama 5 detik. Air sisa pencucian dibuang dan segera ditambah setengah volume larutan *developer* yang terdiri dari 3% natrium karbonat, 0,056% formaldehida, dan 10% sodium thiosulfat sampai muncul pita DNA pertama ( $\pm$  10 menit). Setelah pita DNA pertama tampak larutan dibuang dan ditambah setengah volume sisanya sampai semua pita DNA tampak. Reaksi dihentikan dengan menambah 10% asam asetat. Gel dibiarkan selama 2-3 menit. Tahap akhir gel dicuci dengan dH<sub>2</sub>O selama 2 menit.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji resistensi dengan LDA

Pada penelitian ini cacing pada 4 ekor domba dari kedua lokasi penelitian diketahui resisten terhadap benzimidazole. Informasi yang diperoleh, pengobatan dengan albendazole pada lokasi tersebut telah sering dilakukan dalam kurun waktu lebih dari 7 tahun dengan jangka waktu pemberian setiap 3 bulan tanpa dilakukan rotasi dengan obat cacing dari golongan yang lain. Disamping itu, dosis yang diberikan adalah berdasarkan perkiraan bobot hidup secara visual tanpa dilakukan penimbangan hewan terlebih dahulu, sehingga

menyebabkan dosis yang diberikan seringkali di bawah dosis rekomendasi. MARTIN *et al.* (1984) menyatakan bahwa frekuensi pengobatan berpengaruh secara langsung pada rata-rata terjadinya seleksi resistensi. Pengobatan di bawah dosis standar akan memberi kesempatan individu dengan alel resisten heterosigot untuk tetap hidup yang pada gilirannya akan terjadi akumulasi alel resisten pada populasi (JACKSON dan COOP, 2000).

Hasil penghitungan LD<sub>50</sub> dari pertumbuhan L3 pada LDA *plate* diketahui bahwa rata-rata LD<sub>50</sub> dari domba Kn dan K (SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat) serta domba H dan C (UPTD, Barongan, Bantul, Yogyakarta) terletak pada sumuran yang berwarna kuning (mengandung obat cacing konsentrasi sedang). Dapat disimpulkan bahwa populasi cacing nematoda dari kedua lokasi ini termasuk cacing dengan tingkat resistensi sedang. Penghitungan efikasi obat terhadap populasi nematoda pada domba-domba tersebut adalah sangat rendah yaitu sama dengan atau kurang dari 50% (Tabel 1).

**Tabel 1.** Efikasi BZ terhadap populasi cacing nematoda yang berasal dari domba Kn, K (SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat) dan domba H, C (UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta) serta domba Ccr sebagai kontrol (Cicurug, Sukabumi, Jawa Barat) menggunakan LDA

Kode domba	Populasi resisten (%)	Efikasi total (%)
SPTD-Kn	41	41
SPTD-K	40	35
UPTD-H	50	23
UPTD-C	44	26
Ccr (kontrol)	0	100

Tabel 2 menunjukkan bahwa jumlah L3 *H. contortus* yang tumbuh pada kultur sebanyak 87-97% dari 100 larva yang diidentifikasi, sedangkan pada LDA *plate* hasil identifikasi terhadap 10 ekor larva resisten, L3 *H. contortus* adalah sebesar 8-9%. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan pula bahwa dari 5 spesies nematoda yang dijumpai, cacing *H. contortus* merupakan spesies yang paling dominan dan lebih dari 50% populasinya adalah resisten terhadap albendazole dengan tingkat resistensi sedang.

### Uji resistensi dengan FECRT

Hasil penghitungan efikasi obat pada hari ke-10 setelah pemberian antelmentika pada ke-4 domba yaitu Kn, K, H dan C dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 2.** Persentase spesies L3 dominan pada pupukan larva dan L3 dominan pada *LDA plate* dari sampel feses domba Kn dan K (SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat), domba H dan C (UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta) serta domba Ccr sebagai kontrol

Kode domba	Persentase spesies L3 dominan pada kultur larva (%)**					Persentase spesies L3 dominan yang resisten pada <i>LDA plate</i> (%)***				
	Hae*	Oes*	Tric*	Coo*	Bun*	Hae*	Oes*	Tric*	Coo*	Bun*
Kn	87	-	10	3	-	8	-	1	1	-
K	91	-	6	3	-	8	-	2	-	-
H	97	3	-	-	-	9	1	-	-	-
C	94	6	-	-	-	8	2	-	-	-
Ccr	95	-	5	-	-					

\* Merupakan singkatan dari genus cacing nematoda yang ada

Hae = *Haemonchus* sp.

Oes = *Oeshopagostomum* sp.

Tric = *Trichostrongylus* sp.

Coo = *Cooperia* sp.

Bun = *Bunostomum* sp.

\*\* Penghitungan persentase L3 dari kultur larva dilakukan pada 100 ekor larva

\*\*\* Penghitungan persentase L3 pada *LDA plate* dilakukan pada 10 ekor L3 yang tumbuh pada sumuran resisten (sumuran berwarna kuning sampai merah)

**Tabel 3.** Hasil Uji FECRT pada domba Kn dan K (SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat) dan domba H dan C (UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta)

Kode domba	EPG sebelum pengobatan	EPG 10 hari setelah pengobatan	Efikasi obat (%)
SPTD-Kn	4550	2700	43
SPTD-K	5100	2950	37
Kontrol SPTD*	4850	4700	-
UPTD-H	3600	2100	34
UPTD-C	3000	2050	36
Kontrol UPTD*	3300	3200	-

\*tidak diobati, tidak dihitung efikasinya

Uji FECRT menunjukkan hasil yang sejalan dengan hasil LDA. Pada uji ini diketahui juga bahwa efektifitas obat cacing albendazole pada kedua peternakan tersebut adalah sangat rendah, artinya sebagian besar cacing nematoda di daerah tersebut telah resisten (Tabel-3). Efikasi obat dari domba yang berasal dari satu lokasi pada umumnya menunjukkan hasil yang hampir sama dikarenakan persamaan manajemen pemeliharaan dalam penggunaan antelmentika. Menurut standar yang digunakan oleh WOOD *et al.* (1995) bahwa efikasi kurang dari 80% dianggap tidak efektif. Cacing yang tetap hidup setelah pengobatan antelmentika adalah cacing resisten yang selanjutnya akan digunakan untuk isolasi DNA. Pengobatan dengan dosis rekomendasi cacing homosigot resisten (RR) akan tetap hidup, sedangkan cacing dengan genotip homosigot peka (SS) dan heterosigot peka (RS) akan tereliminasi pada dosis rekomendasi. Ada kemungkinan cacing heterosigot

lolos dari pengobatan dan akan menjadi populasi dominan pada generasi berikutnya (ELARD *et al.*, 1998; ELARD dan HUMBERT, 1999; HUMBERT *et al.*, 2001).

Pada kasus resistensi terhadap benzimidazole, pengobatan dengan antelmentika golongan tersebut harus dihentikan. Antelmentika dari golongan yang lain (Levamisole, Ivermectin, naphthalophos) dapat digunakan untuk pengobatan infestasi cacing pada ternak (ANCHETA dan DUMILON, 2000; SANGTER, 2001). BARNES *et al.* (1999) menyatakan bahwa strategi yang direkomendasikan untuk menunda terjadinya seleksi resistensi adalah (1) menurunkan frekuensi pengobatan, (2) menghindari pengobatan di bawah dosis standar, (3) rotasi tiap tahun dengan antelmentik dari golongan yang lain (4) gabungan pengobatan cacing dengan manajemen rumput.

### Amplifikasi fragmen gen tubulin $\beta$ isotype-1 dengan PCR

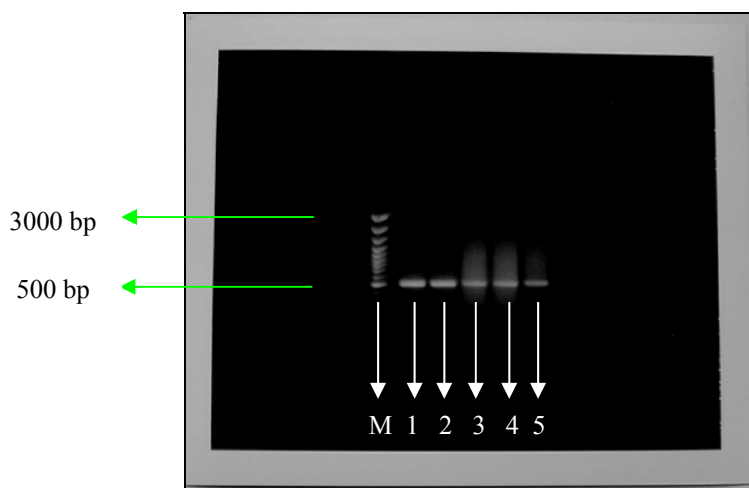
Analisis yang dilakukan pada 5 ekor cacing *H. contortus* (Kn1, K1, H1, C2 dan Ccr-1) yang berasal dari 3 lokasi yang berbeda dengan menggunakan primer Phc-1 sampai dengan Phc-2 menghasilkan pita tunggal yang terletak sedikit di atas 500 bp sesuai dengan fragmen yang dikehendaki yaitu sebesar 520 bp (Gambar 1).

### Analisis *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP)

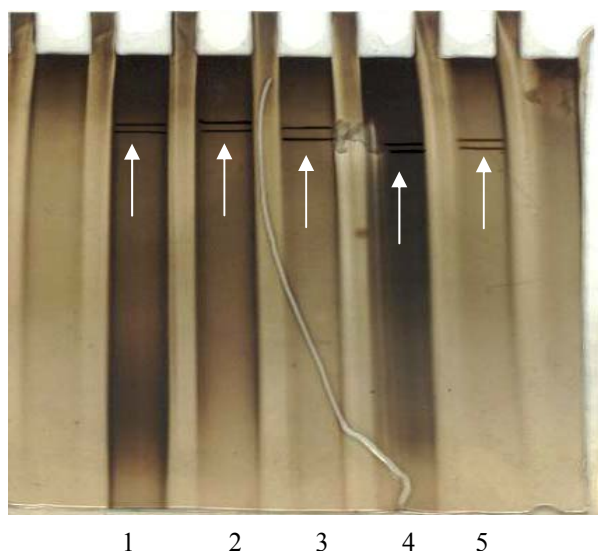
Hasil analisis *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) dari masing-masing individu cacing menunjukkan adanya polimorfisme pada *H. contortus* resisten yang berasal dari SPTD Trijaya Kuningan, Jawa Barat dan UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Polimorfisme terjadi karena adanya mutasi yang diketahui dengan perbedaan migrasi pada DNA untai tunggal pada isolat resisten dibandingkan dengan isolat peka (Gambar 2). PRICHARD (1990) menyatakan bahwa mutasi merupakan basis dari diversitas biologi yang ditemukan secara konstan dalam spesies dan genotip spesies dengan karakteristik yang menguntungkan ataupun tidak sepenuhnya menguntungkan akan tetap terbentuk dalam komunitas. Studi pada gen tubulin  $\beta$  diketahui bahwa variabilitas genetik dapat terjadi dalam populasi atau antar populasi pada spesies yang sama atau

berbeda karena perbedaan kondisi geografi, manajemen pemeliharaan, migrasi spesies atau seleksi terhadap obat (PRICHARD, 2001).

MENURUT ORITA *et al.* (1989) mutasi berupa substitusi, delesi atau insersi satu nukleotida menghasilkan DNA untai tunggal dengan perubahan konformasi yang menghasilkan perbedaan migrasi pada gel elektroforesis yang tidak terdenaturasi. Pada penelitian ini perbedaan migrasi yang terjadi, tidak menunjukkan pola yang spesifik antara individu cacing resisten dari lokasi yang berbeda. Individu cacing yang berasal dari satu domba yang sama atau domba yang berbeda tetapi dari lokasi yang sama menunjukkan migrasi pita yang sama atau hampir sama. Hal ini berarti bahwa fragmen gen tubulin  $\beta$  isotype-1 ini pada lokasi yang sama adalah mempunyai kemiripan yang tinggi. Pola migrasinya berbeda dengan *H. contortus* yang berasal dari lokasi yang berlainan pada analisis SSCP. Pada isolat resisten mutasi terjadi pada nukleotida yang berbeda dari gen tersebut, sehingga menyebabkan pola mutasi yang berbeda antar isolat resisten yang berasal dari lokasi yang berbeda. Menurut ROOS *et al.* (1995) sekuen DNA dari gen tubulin  $\beta$  *H. contortus*, mengindikasikan bahwa lokus isotype-1 mempunyai polimorfisme yang tinggi pada beberapa alel pada populasi yang peka benzimidazole. Penghilangan satu atau dua alel pada populasi yang peka terhadap benzimidazole dari isolat lapang mengindikasikan dimana terjadi seleksi resistensi. Alel yang hilang mengubah kepekaan terhadap obat.



**Gambar 1.** Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer Phc-1 dan Phc-2 pada gel agarosa 2%. DNA diisolasi dari cacing *H. contortus* domba dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta yaitu H1 (lajur no 1), C2 (lajur no 2); SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat yaitu K-1 (lajur no 3), Kn-1 (lajur no 4) serta Cicurug, Sukabumi yaitu Ccr-1 (lajur no 5) sebagai kontrol. M merupakan DNA marker ladder 100 bp



**Gambar 2.** Analisis SSCP pada gel poliakrilamid 12% hasil amplifikasi fragmen gen tubulin  $\beta$  isotype-1 (520 bp) cacing *Haemonchus contortus* dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat yaitu K-1 (lajur no 1); Kn1 (lajur no 2); UPTD, Bantul, Yogyakarta yaitu H1 (lajur no 4), C2 (lajur no 5) dan Cicurug, Bogor, Jawa Barat yaitu Ccr-1 (lajur no 3). Lokasi ditunjukkan oleh panah

### KESIMPULAN

Dengan metode PCR-SSCP tampak adanya polimorfisme pada gen tubulin  $\beta$  isotype-1 cacing *H. contortus* isolat resisten. Mutasi terjadi pada nukleotida yang berbeda pada kedua isolat resisten yang berasal dari dua lokasi penelitian (SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat dan UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta).

Sekuensing pada bagian sentral gen tubulin  $\beta$  isotype-1 perlu dilakukan untuk memberikan gambaran yang akurat mengenai pola mutasi cacing isolat Indonesia dan untuk mengetahui mutasi yang terjadi terletak pada lokasi sama atau berbeda dengan isolat luar negeri.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Wayan T. Artama, drh. Widya Asmara, PhD dan Dr. Beriajaya atas bantuan dan diskusi selama penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

ANCHETA, P.B. and R.A. DUMILON. 2000. Benzimidazole resistance of some nematode in small ruminants. *Phillipp. J. Vet. Sci.* 26: 147-152.

BARNES, E.H., R.J. DOBSON and I.A. BARGER. 1995. Worm control and anthelmintic resistance: Adventures with a model. *Parasitol. Today* 11: 56-63.

BERIAJAYA, D. HARYUNINGTYAS dan G.D. GRAY. 2002. Kejadian resistensi terhadap antelmintik pada domba dan kambing di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Yogyakarta. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Ciawi-Bogor, 30 September-1 Oktober 2002. Puslitbang Peternakan. Bogor. hlm. 403-406.

COLES, G.C., C. BAUER, F.H.M. BORGSTEEDE, S. GEERTS, T.R. KLEI, M.A. TAYLOR and P.J. WALLER. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Methods for detection of anthelmintic resistance in nematode of veterinary importance. *Parasitology* 44: 35-44.

COTTON, R.G.H. 1997. Mutation detection. Oxford University Press, Oxford.

ELARD, L., A.M. COMES and J.F. HUMBERT. 1996. Sequences of  $\beta$  tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79: 249-253.

ELARD, L. and J.F. HUMBERT. 1999. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1  $\beta$ - tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* 85: 452-456.

ELARD, L., C. SAUVE and J.F. HUMBERT. 1998. Fitness of benzimidazole-resistant and susceptible worm of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitology* 117: 571-578.

GASSER, R.B. and X.Q. ZHU. 1999. Sequence-based analysis of DNA fragments by mutation detection techniques. *Parasitol. Today* 15: 427-468.

- GASSER, R.B. and N.B. CHILTON. 2001. Application of single strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. *Vet. Parasitol.* 101: 201-213.
- HARYUNINGTYAS, D., BERIAJAYA dan D.G. GRAY. 2001. Resistensi antelmintik golongan benzimidazole pada domba dan kambing di Indonesia. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 17-18 September 2001. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor. hlm. 509-518.
- HUMBERT, J.F., J. CABARET, L. ELARD, V. LEIGNEL and A. SILVESTRE. 2001. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasite of small ruminants. *Vet. Parasitol.* 101: 405-414.
- JACKSON, F. and R.L. COOP. 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120: 95-107.
- JOHANSEN, M.V. and P.J. WALLER. 1989. Comparison of the three *in vitro* techniques to estimate benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* of sheep. *Vet. Parasitol.* 34: 213-221.
- JUNG, K. and B.R. OAKLEY. 1990. Identification of an amino acid substitution in the benA,  $\beta$  tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 17: 87-94.
- JUNG, K, I.B. WILDER and B.R. OAKLEY. 1992. Amino acid alterations in the benA ( $\beta$  tubulin) gene of *Aspergillus nidulans* that confer benomyl resistance. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 22: 170-174.
- LACEY, E. 1988. The role of cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazole. *Int. J. Parasitol.* 18: 885-936.
- KWA, M.S.G., J.G. VEENSTRA and M.H. ROOS. 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in  $\beta$ -tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63: 299-303.
- MARTIN P.J., N. ANDERSON, T. LWIN, G. NELSON and T.E. MORGAN. 1984. The association between frequency of thiabendazole treatment and the development of resistance in field isolates of *Ostertagia* spp. of sheep. *Int. J. Parasitol.* 14: 177-181.
- MAXAM, A.M. and W. GILBERT. 1980. Sequencing end labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65: 499-560.
- ORITA, M., H. IWAHANA, H. KANAZAWA, K. HAYASHI and T. SEKIYA. 1989. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2766-2770.
- PRICHARD, R.K. 1990. Anthelmintic resistance in nematodes, recent understanding and future directions for control and research. *Int. J. Parasitol.* 20: 515-523.
- PRICHARD, R.K. 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitol.* 17: 445-453.
- ROOS, M.H., J.H. BOERSEMA, F.H.M. BORGSTEEDE, J. CORNELLISEN, M. TAYLOR and E.J. RUITENBERG. 1990. Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43: 77-88.
- ROOS, M.H., M.S.G KWA and W.N. GRANT. 1995. New genetics and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematode. *Parasitol. Today* 11: 148-150.
- SANGSTER, N.C. 2001. Managing paratocide resistance. *Vet. Parasitol.* 98: 89-109.
- SILVESTRE, A. and J.F. HUMBERT. 2000. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp. Parasitol.* 95: 271-276.
- WOOD, I.B., N.K. AMARAL, K. BAIRDEN, J.L. DUNCAN, T. KASSAI, J.B. MALONE, JR., J.A. PANKAVICH, R.K. REINECKE, O. SLOCOMBE, S.M. TAYLOR and J. VERCRUYSSSE. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Second edition guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58: 181-213.