

Analisis Sekuen Gen Tubulin- β Isotipe 1 Cacing *Haemonchus contortus* Isolat Resisten terhadap Benzimidazole pada Domba di Indonesia

Dyah Haryuningtyas¹ dan Wayan T. Artama²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata 30, Bogor 16114

²Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

ABSTRACT

Sequence Analysis of β -Tubulin Isotype 1 Gene from Benzimidazole Resistant Strains of *Haemonchus contortus*, A Parasitic Nematode of Sheep in Indonesia. Dyah Haryuningtyas and Wayan T. Artama. Benzimidazole (BZ) resistance to gastrointestinal nematodes in small ruminants (sheep and goat) has become a significant problem worldwide. Evidences of anthelmintic resistance to albendazole in Indonesia has been reported from some government owned farms in West Java, Central Java, and Yogyakarta. Previous study on the sheep parasite *H. contortus* had shown that the BZ resistance was related to selection for individuals in a population possessing a specific β -tubulin isotype 1 gene. The study is aimed to determine mutation on coding region of central part of β -tubulin isotype 1 gene of *H. contortus* resistant strain from Indonesia. Seven *H. contortus* worms were isolated from four BZ resistant sheep from two government farms (SPTD Trijaya, Kuningan, West Java, and UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta), and from a BZ susceptible sheep from Cicurug, Sukabumi, West Java. DNA was extracted individually from female *H. contortus* worms. A fragment of 520 bp β -tubulin isotype 1 gene exon 3, 4, 5 was amplified using the PCR technique and then sequenced. The results showed that a single mutation occurred in codon 200 (from phenylalanine to tyrosine) had caused benzimidazole resistance in *H. contortus* from SPTD Trijaya, Kuningan, West Java. Mutation in β -tubulin isotype 1 gene of *H. contortus* from UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Yogyakarta, occurred in codon 198 (from glutamate to glycine), codon 201 (from cysteine to stop codon), and codon 202 (from isoleucine to stop codon).

Key words: *Haemonchus contortus*, benzimidazole resistance, isotype 1 β -tubulin gene, mutation.

PENDAHULUAN

Infestasi nematoda saluran pencernaan terutama oleh *Haemonchus contortus* merupakan problem utama yang mengganggu kesehatan ternak domba/kambing di Indonesia. Penyakit ini menyebabkan kerugian ekonomi yang besar terutama pada ternak yang dipelihara dengan cara digembalakan. Antelmintika dari golongan benzimidazole (BZ) merupakan obat pi-

lihan (*drug of choice*) untuk menurunkan tinggi intensitas penyakit yang disebabkan oleh cacing *H. contortus*. Pemberian antelmintika secara rutin tanpa ada rotasi dengan antelmintika dari golongan lain menyebabkan terjadinya resistensi. Hal ini dinyatakan oleh Elard *et al.* (1996) bahwa terjadinya resistensi antara lain disebabkan oleh pengobatan secara rutin tanpa adanya rotasi dengan antelmintika golongan lain, pemberian obat di bawah dosis standar, dan aplikasi pemberian yang salah.

Saat ini, kasus resistensi terhadap BZ pada komunitas nematoda Trichostrongylida merupakan masalah utama pada peternakan domba dan kambing hampir di seluruh negara di dunia (Waller *et al.* 1995, Borgsteede *et al.* 1996, Sangster 1999). Di Asia Tenggara, resistensi terhadap BZ telah dilaporkan dari Malaysia (Sivaraj *et al.* 1994), Filipina (Ancheta dan Dumilon 2000) dan Thailand (Kochapakdee *et al.* 1995). Di Indonesia, resistensi terhadap antelmintika albendazole pada peternakan domba telah dilaporkan dari Bogor dan Kuningan (Jawa Barat), Kendal (Jawa Tengah) serta Yogyakarta (Ridwan *et al.* 2000, Haryuningtyas *et al.* 2001, Beriajaya *et al.* 2002).

Resistensi terhadap BZ pada *H. contortus* mendorong untuk mengetahui bagaimana parasit ini menjadi resisten. Perubahan mendasar yang terjadi pada kasus resistensi pada nematoda Trichostrongylida adalah mutasi yang terjadi pada asam amino ke-200 dari fenilalanin menjadi tirosin pada gen tubulin- β isotype 1. Mutasi pada lokasi tersebut juga merupakan penyebab utama terjadinya resistensi terhadap BZ pada tiga spesies cacing yang dominan, yaitu *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, dan *Teladorsagia circumcincta* (Kwa *et al.* 1993, 1994, Lehrer *et al.* 1995, Elard *et al.* 1998). Menurut Kwa *et al.* (1995), mutasi pada gen tubulin- β isotype 1 adalah penyebab resistensi fungsional pada ekspresi resistensi terhadap BZ, bukan merupakan markah (*marker*) sederhana yang berhubungan dengan timbulnya resistensi. Menurut Prichard (2001), pada populasi cacing resisten terhadap BZ juga terjadi perubahan asam amino ke-167, produk gen tubulin- β isotype 1, yaitu dari fenilalanin

(TTC) menjadi tirosin (TAC) atau fenilalanin (TTC) menjadi histidin (CAC).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui mutasi pada bagian sentral gen tubulin- β isotope 1 pada isolat cacing *H. contortus* resisten terhadap BZ asal dari Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Isolasi Cacing *Haemonchus contortus*

Tujuh ekor cacing *H. contortus* dikoleksi dari empat ekor domba dari dua peternakan milik pemerintah yang telah diketahui resisten terhadap BZ, dua ekor dari SPTD Trijaya Kuningan, Jawa, Barat (domba diberi kode Kn dan K), dua ekor dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta (domba diberi kode H dan C), dan seekor domba yang masih peka terhadap BZ dari peternak di Cicurug, Sukabumi, Jawa Barat, sebagai kontrol (domba diberi kode Ccr-1) (Haryuningtyas *et al.* 2006).

Ekstraksi DNA Genom *Haemonchus contortus*

Dua ekor cacing *H. contortus*, masing-masing dikoleksi dari domba Kn dan H dan diberi kode sampel Kn1, Kn2, H1, dan H2). Masing-masing satu ekor cacing dikoleksi dari domba H dan C dan diberi kode H1 dan C2), sedangkan seekor cacing dari domba Ccr-1 (kontrol).

DNA diekstraksi dari individu sampel cacing menggunakan modifikasi dari metode yang digunakan oleh Roos *et al.* (1990) dan Silvestre dan Humbert (2000). Masing-masing cacing betina dikeluarkan telurnya kemudian cacing dimasukkan pada tabung ependorf yang telah berisi larutan ekstraksi sebanyak 50 μ l (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 10% SDA, 5 mg/ml proteinase K) untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 41°C selama semalam. Jaringan cacing yang telah larut kemudian ditambah 200 μ l larutan TE (10 mM Tris HCl, pH8, dan 1 mM EDTA). Phenol dengan volume yang sama (200 μ l) ditambahkan dan diinkubasi pada shaker pada temperatur kamar selama 2 jam. Setelah itu dilakukan sentrifugasi, selanjutnya supernatan dikoleksi dan segera diekstraksi dengan kloroform/isoamilalkohol (CIAA 24 : 1). Presipitasi DNA dilakukan dengan penambahan 2,5 volume etanol absolut dan natrium asetat 3 M. Pelet DNA kemudian dilarutkan kembali dengan TE dan disimpan pada suhu -20°C sampai dengan digunakan (Roos *et al.* 1990, Silvestre dan Humbert 2000).

Sekuensing DNA

Hasil isolasi DNA dari tujuh ekor cacing selanjutnya digunakan sebagai templat pada reaksi PCR seperti yang telah digambarkan pada penelitian terdahulu (Haryuningtyas *et al.* 2006). Purifikasi hasil PCR dan sekuensing dilakukan di *Tropical Diseases Centre*, Unair, Surabaya. Sekuensing dilakukan menggunakan DNA sekuenser ABI PRISM 310 dengan metode *direct sekuensing*. Primer yang digunakan untuk sekuensing fragmen gen tubulin- β isotope-1 sepanjang 520 bp (*base pair*) adalah sepasang primer spesifik berdasarkan pada sekuen gen tubulin- β isotope 1 ekson 3, 4, 5 cacing *H. contortus* berasal dari *genebank* (kode akses X80046), yaitu Phc1 (*forward*): 5'AGG GAG CCG AGC TAG TTG AT 3' dan Phc2 (*reverse*): 5'GAG TTT CAA AGT GCG GAA GC 3'.

Analisis Genetik

Hasil sekuensing dianalisis menggunakan Gen Mac V.8 *software*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi gen tubulin- β isotope 1 yang dilakukan pada tujuh ekor cacing *H. contortus* (Kn1, Kn2, K1, H1, H2, C2, dan Ccr-1) menghasilkan ampikon sebesar 520 bp (Gambar 1).

Homologi Sekuen Fragmen Gen Tubulin- β Isotope 1 Cacing *Haemonchus contortus* Kn1, Kn2, K1, H1, H2, C2, dan Ccr-1 dengan Sekuen *Genebank*.

Analisis homologi sekuen gen tubulin- β isotope-1 ekson 3, 4, 5 dari *genebank* yang merupakan isolat *Susceptible* Edinburgh (kode akses X80046) dengan tujuh sampel DNA *H. contortus* isolat lokal Indonesia menggunakan Gen Mac V.0.8 diketahui terdapat homologi yang tinggi di antara keduanya (94,3-97,2%). Tingkat homologi yang tinggi menunjukkan fragmen gen ini mempunyai konservasi yang tinggi antarisolat, walaupun berasal dari kondisi geografi yang sangat berbeda. Sampel *H. contortus* isolat peka sebagai kontrol (Ccr-1) mempunyai homologi nukleotida 97,2%, sedangkan *H. contortus* isolat resisten Kn1, Kn2, K1, H1, H2, C2 mempunyai homologi berturut-turut adalah 95,4, 95,4, 95,4, 94,3, dan 95,6% terhadap sekuen *genebank*. Menurut Elard *et al.* (1996) konservasi yang tinggi dari gen tubulin- β ditunjukkan oleh adanya kemiripan yang tinggi dari spesies yang sama atau berbeda pada nematoda trichostrongylida. Perbedaan homologi yang ada disebabkan oleh adanya variabilitas genetik yang kemungkinan besar disebabkan oleh adanya mutasi pada beberapa nukleotida karena seleksi resistensi, manajemen pemeliharaan yang di-

terapkan ataupun kondisi lingkungan yang berbeda. Menurut Elard dan Humbert (1999) polimorfisme yang terjadi sebagian besar terjadi pada intron karena ekson pada bagian sentral gen tubulin- β sangat *conserved*. Prichard (2001) menyatakan bahwa studi pada gen tubulin- β diketahui bahwa variabilitas genetik dapat terjadi dalam populasi atau antar populasi pada spesies yang sama atau berbeda karena perbedaan kondisi geografi, manajemen pemeliharaan yang diterapkan, migrasi spesies atau seleksi terhadap obat.

Analisis Asam Amino Sekuen Fragmen Gen Tubulin- β Isotipe 1 Cacing *Haemonchus contortus* Isolat Resisten terhadap BZ dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat

Hasil *alligment* ketiga sekuen fragmen gen tubulin- β isotipe-1 dengan primer Phc1-Phc2 dari *H. contortus* isolat resisten yang berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat, dibandingkan dengan sekuen kontrol (Tabel 1) diketahui bahwa ketiganya mempunyai karakteristik terjadi mutasi yang sama pada bagian *coding region* (ekson).

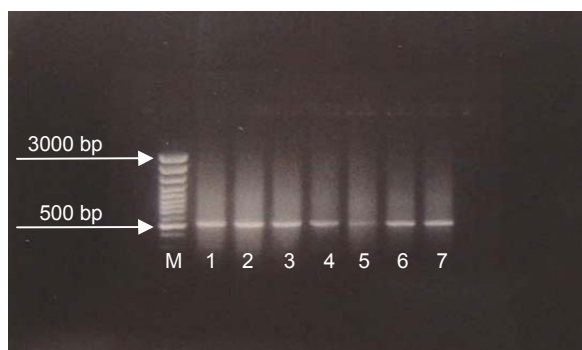
Mutasi pada sampel Kn1, Kn2, dan K1 terjadi pada ekson 5 nukleotida 671 berupa substitusi basa T/A.

Mutasi berupa substitusi dengan basa yang sama pada ketiga sampel juga terjadi pada ekson 5 nukleotida 609 (C/T) dan 654 (G/A). Tidak ada mutasi yang terjadi pada ekson 3 dan 4 (Tabel 1).

Analisis asam amino menunjukkan hasil bahwa perubahan nukleotida 671(T/A) (Tabel 1 dan 2) menyebabkan adanya perubahan pada kodon 200 dari fenilalanin (TTC) menjadi tirosin (TAC) terjadi pada ketiga sampel yang berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat. Sesuai dengan pernyataan Kwa *et al.* (1994, 1995) bahwa mutasi pada asam amino 200 gen tubulin- β isotipe 1 dari *H. contortus* yang berupa substitusi pada basa kedua dari kodon TTC (fenilalanin) menjadi TAC (tirosin) sebagai penyebab utama terjadinya resistensi terhadap BZ. Mutasi pada asam amino 167 atau pada lokasi lain yang menyebabkan perubahan asam amino tidak terjadi pada ketiga sampel dari SPTD Trijaya Kuningan.

Analisis Asam Amino Sekuen Fragmen Gen Tubulin- β Isotipe 1 Cacing *Haemonchus contortus* Isolat Resisten terhadap BZ dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta

Hasil *alligment* ke-3 sampel DNA yang disekuen (H1, H2, dan C2) dibandingkan kontrol (Ccr-1) menun-



Gambar 1. Hasil amplifikasi dengan primer Phc1 dan Phc2. Lajur nomor 1, 2, dan 3 masing-masing adalah sampel Kn1, Kn2, dan K1 yang berasal dari SPTD Trijaya Kuningan, Jawa Barat. Lajur nomor 4, 5, dan 6 masing-masing adalah sampel H1, H2, dan C2 yang berasal dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Lajur nomor 7 adalah sampel Ccr-1 yang berasal dari Cicurug sebagai kontrol. M merupakan DNA marker ladder 100 bp.

Tabel 1. Lokasi mutasi pada ekson dari hasil *alligment* sekuen fragmen gen tubulin- β isotipe 1 cacing *H. contortus* yang berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat dibandingkan dengan kontrol.

Lokasi mutasi	Posisi nukleotida	Perubahan basa			
		Kontrol vs SPTD-Kn1	Kontrol vs SPTD-Kn2	Kontrol vs SPTD-K1	Kontrol vs <i>genebank</i> *
Ekson 3	t	t	t	t	t
Ekson 4	t	t	t	t	t
Ekson 5	609	C/T	C/T	C/T	C/C
	654	G/A	G/A	G/A	G/G
	671	T/A	T/A	T/A	T/T

*Perubahan nukleotida dihitung sesuai segmen gen tubulin- β isotipe 1 ekson 3, 4, 5 dari *genebank* dengan kode akses X80046, t = tidak ada perubahan.

Tabel 2. Translasi sekuen nukleotida gen tubulin-β isotype 1 cacing *H. contortus* isolat peka sebagai kontrol (Ccr-1) dan *H. contortus* isolat resisten dari SPTD Trijaya, Kuningan (Kn1, Kn2, K1).

Ccr-1 (kontrol)																				164																						
124	gct	gaa	ggt	tgt	gat	tgc	ctt	cag	ggc	ttc	caa	ttg	acg	cat	tca	ctt	gga	gga	ggc	act	gga	tct	gga	atg	ggc	act	tig	tta	att	tca	aaa	alt	cgt	gaa	gag	tac	cct	gat	aga	att	atg	
A	E	G	C	D	C	L	Q	G	F	Q	L	T	H	S	L	G	G	G	G	T	G	S	G	M	G	T	L	L	I	S	K	I	R	E	E	Y	P	D	R	I	M	
165	gct	tcg	ttc	tcc	ggt	ggt	cca	tca	ccc	aag	gta	tcc	gac	act	gtc	gtg	gaa	ccc	tac	aat	gct	acc	ctt	tcc	gtc	cat	caa	ttg	gta	gag	aac	acc	gat	gaa	aca	tac	ttc	tgt	att	gac	aac	gaa
A	S	F	S	V	V	P	S	P	K	V	S	D	T	V	V	E	P	Y	N	A	T	L	S	V	H	Q	L	V	E	N	T	D	E	T	Y	C	I	D	N	E		
SPTD-Kn1																				164																						
124	gct	gaa	ggt	tgt	gat	tgc	ctt	cag	ggc	ttc	caa	ttg	acg	cat	tca	ctt	gga	gga	ggc	act	gga	tct	gga	atg	ggc	act	tig	tta	att	tca	aaa	alt	cgt	gaa	gag	tac	cct	gat	aga	att	atg	
A	E	G	C	D	C	L	Q	G	F	Q	L	T	H	S	L	G	G	G	G	T	G	S	G	M	G	T	L	L	I	S	K	I	R	E	E	Y	P	D	R	I	M	
165	gct	tcg	ttc	tcc	ggt	ggt	cca	tca	ccc	aag	gta	tcc	gac	act	gtc	gtg	gaa	ccc	tac	aat	gct	acc	ctt	tcc	gtc	cat	caa	ttg	gta	gag	aac	acc	gat	gaa	aca	tac	ttc	tgt	att	gac	aac	gaa
A	S	F	S	V	V	P	S	P	K	V	S	D	T	V	V	E	P	Y	N	A	T	L	S	V	H	Q	L	V	E	N	T	D	E	T	Y	C	I	D	N	E		
SPTD-Kn2																				635																						
124	gct	gaa	ggt	tgt	gat	tgc	ctt	cag	ggc	ttc	caa	ttg	acg	cat	tca	ctt	gga	gga	ggc	act	gga	tct	gga	atg	ggc	act	tig	tta	att	tca	aaa	alt	cgt	gaa	gag	tac	cct	gat	aga	att	atg	
A	E	G	C	D	C	L	Q	G	F	Q	L	T	H	S	L	G	G	G	G	T	G	S	G	M	G	T	L	L	I	S	K	I	R	E	E	Y	P	D	R	I	M	
165	gct	tcg	ttc	tcc	ggt	ggt	cca	tca	ccc	aag	gta	tcc	gac	act	gtc	gtg	gaa	ccc	tac	aat	gct	acc	ctt	tcc	gtc	cat	caa	ttg	gta	gag	aac	acc	gat	gaa	aca	tac	ttc	tgt	att	gac	aac	gaa
A	S	F	S	V	V	P	S	P	K	V	S	D	T	V	V	E	P	Y	N	A	T	L	S	V	H	Q	L	V	E	N	T	D	E	T	Y	C	I	D	N	E		
SPTD-K1																				164																						
124	gct	gaa	ggt	tgt	gat	tgc	ctt	cag	ggc	ttc	caa	ttg	acg	cat	tca	ctt	gga	gga	ggc	act	gga	tct	gga	atg	ggc	act	tig	tta	att	tca	aaa	alt	cgt	gaa	gag	tac	cct	gat	aga	att	atg	
A	E	G	C	D	C	L	Q	G	F	Q	L	T	H	S	L	G	G	G	G	T	G	S	G	M	G	T	L	L	I	S	K	I	R	E	E	Y	P	D	R	I	M	
165	gct	tcg	ttc	tcc	ggt	ggt	cca	tca	ccc	aag	gta	tcc	gac	act	gtc	gtg	gaa	ccc	tac	aat	gct	acc	ctt	tcc	gtc	cat	caa	ttg	gta	gag	aac	acc	gat	gaa	aca	tac	ttc	tgt	att	gac	aac	gaa
A	S	F	S	V	V	P	S	P	K	V	S	D	T	V	V	E	P	Y	N	A	T	L	S	V	H	Q	L	V	E	N	T	D	E	T	Y	C	I	D	N	E		

Tabel 3. Lokasi mutasi pada ekson dari hasil *allignment* sekuen fragmen gen tubulin-β isotype 1 cacing *H. contortus* yang berasal dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta dibandingkan dengan kontrol.

Lokasi mutasi	Posisi nukleotida	Perubahan basa			
		Kontrol vs UPTD-H1	Kontrol vs UPTD-H2	Kontrol vs UPTD-C2	Kontrol vs genebank*
Ekson 3	t	t	t	t	t
Ekson 4	363	T/A	T/A	t	T/T
Ekson 5	609	C/T	C/T	C/T	C/C
	665	A/G	A/G	A/G	A/A
	675	T/-	T/-	T/-	T/T
	677	T/-	T/-	T/-	T/T

*Perubahan pada nukleotida dihitung sesuai segmen gen tubulin-β isotype 1 ekson 3, 4, 5 dari *genebank* sesuai kode akses X80046, t = tidak ada perubahan, - = delesi.

jukkan bahwa mutasi terjadi pada beberapa lokasi pada ekson 5 (Tabel 3).

Data sekuen menunjukkan bahwa pada cacing *H. contortus* isolat resisten (H1, H2, dan C2) terjadi mutasi yang sama sebanyak 4 nukleotida pada ekson 5 yaitu substitusi nukleotida 609 (C/T), 665 (A/G), serta delesi nukleotida 675 (T/-) dan 677 (T/-). Pada H1 mutasi terjadi pada ekson 4, yaitu berupa substitusi nukleotida 363 (T/A).

Pada sampel yang berasal dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul Yogyakarta (Tabel 3) diketahui bahwa mutasi pada ekson 5 dari ketiga sampel H1, H2, dan C2, yaitu nukleotida 665 (A/G), 675 (T/-), dan 677 (T/-) spesifik karena tidak ditemukan pada sampel yang berasal dari lokasi lain. Hasil translasi nukleotida (Tabel 4), mutasi pada lokasi tersebut menyebabkan terjadinya perubahan asam amino ke-198, yaitu glutamat (kodon GAA) menjadi glisin (kodon GGA) serta asam amino ke-201, yaitu sistein (kodon TGT) dan

asam amino ke-202, yaitu isoleusin (kodon ATT) keduanya mengalami mutasi menjadi stop kodon (TGA). Walaupun demikian, mutasi ketiga nukleotida tersebut terletak pada bagian ujung hasil sekuensing sehingga ada dua kemungkinan yang perlu dipertimbangkan. Pertama: memang benar terjadi mutasi pada lokasi tersebut, kedua: kemungkinan perubahan disebabkan adanya pembacaan yang kurang tepat oleh sekuenser mengingat lokasinya dekat dengan lokasi penempelan primer. Apabila benar terjadi mutasi pada lokasi tersebut diduga perubahan tersebut berhubungan dengan sifat resistensi cacing terhadap BZ karena terletak di bagian struktural gen yang juga terletak berdekatan dengan *binding domain* II. Mutasi pada nukleotida ke-671 sebagai penyebab perubahan asam amino ke-200 tidak terjadi pada sampel yang berasal dari lokasi ini.

Menurut Farr dan Sternlicht (1992) perubahan pada asam amino 200 menyebabkan resistensi karena

Tabel 4. Translasi sekuen nukleotida gen tubulin-β isotipe 1 cacing *H. contortus* isolat peka sebagai kontrol (Ccr-1) dan *H. contortus* isolat resisten dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul (H1, H2, C2).

Ccr-1 (kontrol)																														164												
124	gct	gaa	ggt	tgt	gat	tgc	ctt	cag	ggc	ttc	caa	ttg	acg	cat	tca	ctt	gga	gga	ggc	act	gga	tct	gga	atg	ggc	act	tig	tta	att	tca	aaa	att	cgt	gaa	gag	tac	cct	gat	aga	att	atg	
A	E	G	C	D	C	L	Q	G	F	Q	L	T	H	S	L	G	G	G	T	G	S	G	M	G	T	L	L	I	S	K	I	R	E	E	Y	P	D	R	I	M		
165	gct	tcg	ttc	tcc	ggt	ggt	cca	tca	ccc	aag	gta	tcc	gac	act	gtc	gtg	gaa	ccc	tac	aat	gct	acc	ctt	tcc	gtc	cat	caa	ttg	gta	gag	aac	acc	gat	gaa	aca	ttc	tgt	att	gac	aac	gaa	
A	S	F	S	V	V	P	S	P	K	V	S	D	T	V	V	E	P	Y	N	A	T	L	S	V	H	Q	L	V	E	N	T	D	G	T	F	-	-	C	I	D	N	E
UPTD-H1																														164												
124	gct	gaa	ggt	tgt	gat	tgc	ctt	cag	ggc	ttc	caa	ttg	acg	cat	tca	ctt	gga	gga	ggc	act	gga	tct	gga	atg	ggc	act	tig	tta	att	tca	aaa	att	cgt	gaa	gag	tac	cct	gat	aga	att	atg	
A	E	G	C	D	C	L	Q	G	F	Q	L	T	H	S	H	G	G	G	T	G	S	G	M	G	T	L	L	I	S	K	I	R	E	E	Y	P	D	R	I	M		
165	gct	tcg	ttc	tcc	ggt	ggt	cca	tca	ccc	aag	gta	tcc	gac	act	gtc	gtg	gaa	ccc	tac	aat	gct	acc	ctt	tcc	gtc	cat	caa	ttg	gta	gag	aac	acc	gat	gga	aca	ttc	tga	tga	gac	aac	gaa	
A	S	F	S	V	V	P	S	P	K	V	S	D	T	V	V	E	P	Y	N	A	T	L	S	V	H	Q	L	V	E	N	T	D	G	T	F	-	-	D	N	E		
UPTD-H2																														164												
124	gct	gaa	ggt	tgt	gat	tgc	ctt	cag	ggc	ttc	caa	ttg	acg	cat	tca	ctt	gga	gga	ggc	act	gga	tct	gga	atg	ggc	act	tig	tta	att	tca	aaa	att	cgt	gaa	gag	tac	cct	gat	aga	att	atg	
A	E	G	C	D	C	L	Q	G	F	Q	L	T	H	S	L	G	G	G	T	G	S	G	M	G	T	L	L	I	S	K	I	R	E	E	Y	P	D	R	I	M		
165	gct	tcg	ttc	tcc	ggt	ggt	cca	tca	ccc	aag	gta	tcc	gac	act	gtc	gtg	gaa	ccc	tac	aat	gct	acc	ctt	tcc	gtc	cat	caa	ttg	gta	gag	aac	acc	gat	gga	aca	ttc	tga	tga	gac	aac	gaa	
A	S	F	S	V	V	P	S	P	K	V	S	D	T	V	V	E	P	Y	N	A	T	L	S	V	H	Q	L	V	E	N	T	D	G	T	F	-	-	D	N	E		
UPTD-C2																														164												
124	gct	gaa	ggt	tgt	gat	tgc	ctt	cag	ggc	ttc	caa	ttg	acg	cat	tca	ctt	gga	gga	ggc	act	gga	tct	gga	atg	ggc	act	tig	tta	att	tca	aaa	att	cgt	gaa	gag	tac	cct	gat	aga	att	atg	
A	E	G	C	D	C	L	Q	G	F	Q	L	T	H	S	L	G	G	G	T	G	S	G	M	G	T	L	L	I	S	K	I	R	E	E	Y	P	D	R	I	M		
165	gct	tcg	ttc	tcc	ggt	ggt	cca	tca	ccc	aag	gta	tcc	gac	act	gtc	gtg	gaa	ccc	tac	aat	gct	acc	ctt	tcc	gtc	cat	caa	ttg	gta	gag	aac	acc	gat	gga	aca	ttc	tga	tga	gac	aac	gaa	
A	S	F	S	V	V	P	S	P	K	V	S	D	T	V	V	E	P	Y	N	A	T	L	S	V	H	Q	L	V	E	N	T	D	G	T	F	-	-	D	N	E		

berlokasi dekat dengan salah satu dari *binding domain* (*binding domain* II :asam amino 203-206) perubahan ini mempengaruhi polimerisasi dan stabilitas dari mikrotubulus. Pernyataan serupa disampaikan oleh Kwa *et al.* (1995) yang menyatakan bahwa antelmentika BZ adalah analog dengan nukleotida dan kodon 200 berlokasi dekat dengan nukleotida *binding domain* II (asam amino 203-206), diduga sedikit perubahan konformasional yang terjadi akan merubah properti pada sisi pengikatan GTP. Penelitian yang dilakukan oleh Farr dan Sternlicht (1992) menunjukkan bahwa *site directed mutagenesis* pada asam amino 197 dari gen tubulin-β dari otak mamalia menyebabkan peningkatan afinitas terhadap GTP dengan tidak adanya Mg²⁺, di mana perubahan pada asam amino 203 menurunkan afinitas terhadap semua nukleotida. Beberapa studi menunjukkan bahwa resistensi terhadap obat antimotilitik yang mirip dengan mekanisme resistensi terhadap BZ berhubungan dengan peningkatan polimerisasi tubulin (Minotti *et al.* 1991) atau peningkatan stabilitas mikrotubulus (Schibler dan Huang 1991). Analisis lain terjadinya resistensi BZ menurut Prichard (2001), yaitu bahwa pengikatan BZ pada tubulin-β melibatkan tubulin-α dan tubulin-β serta fenilalanin pada kodon 167 dan 200 dari gen tubulin-β. Bidang planar cincin BZ terikat antara cincin fenil dari fenilalanin 167 dan 200 selanjutnya membentuk suatu ikatan kovalen antara sistein 201 dan BZ carbamate. Mutasi yang terjadi, baik pada asam amino fenilalanin 167 atau fenilalanin 200 menjadi fenolik tirosin mencegah BZ dari penguncian pada sisi pengikatan kedua asam amino tersebut, se-

hingga BZ tidak dapat terikat pada tubulin-β, akibatnya tidak terjadi hambatan polimerisasi.

Mutasi spesifik berupa substitusi nukleotida 609 (C/T) terjadi pada keenam sampel *H. contortus* isolat resisten yang diteliti, baik yang berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat maupun UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Walaupun demikian mutasi pada daerah ini tidak menyebabkan terjadinya perubahan pada asam amino.

KESIMPULAN

Mutasi pada ekson 5 nukleotida 671(T/A), yaitu perubahan basa kedua pada kodon TTC (fenilalanin) menjadi TAC (tirosin) pada asam amino ke-200 dari gen tubulin-β isotipe1, sesuai dengan mutasi yang terjadi pada isolat acuan, merupakan penyebab resistensi terhadap BZ yang terjadi pada ketiga sampel yang berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat.

Mutasi ketiga sampel dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta terjadi pada nukleotida 666 (A/G), 675 (T/-), dan 677(T/-) berturut-turut menyebabkan terjadinya perubahan asam amino ke-198, yaitu glutamat (kodon GAA) menjadi glisin (kodon GGA) serta asam amino ke-201, yaitu sistein (kodon TGT) dan asam amino ke-202, yaitu isoleusin (kodon ATT) keduanya mengalami mutasi menjadi stop kodon (TGA) pada gen tubulin-β isotipe 1. Perubahan tersebut diduga sebagai penyebab terjadinya resistensi pada *H. contortus* dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada drh. Widya Asmara, PhD dan Dr C.A. Nidom atas bantuan dan diskusi selama berlangsungnya penelitian. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Ibu drh. Suharningsih atas izinnya untuk menggunakan domba di UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Penelitian ini dibiayai oleh proyek APBN 2002.

DAFTAR PUSTAKA

- Ancheta, P.B. and R.A. Dumilon. 2000.** Benzimidazole resistance of some nematodes in small ruminants. *Phillipp. J. Vet. Anim. Sci.* 26:147-152.
- Berijaya, D. Haryuningtyas, dan G.D. Gray. 2002.** Kejadian resistensi terhadap antelmintika pada domba dan kambing di Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Yogyakarta. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Ternak dan Veteriner.* Ciawi, Bogor, 30 September-1 Oktober 2002.
- Borgsteede, F.H.M. 1996.** Resistance of *Cooperia curticei* against fenbendazole. *Res. Vet. Sci.* 41:423-424.
- Elard, L., A.M. Comes, and J.F. Humbert. 1996.** Sequences of β -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., C. Sauve, and J.F. Humbert. 1998.** Fitness of benzimidazole resistant and susceptible worms of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitol. Res.* 117:571-578.
- Elard, L. and J.F. Humbert. 1999.** Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 β -tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* 85:452-456.
- Farr, G.W. and H. Sternlicht. 1992.** Site directed mutagenesis of the GTP-binding domain of β -tubulin. *J. Mol. Biol.* 227:307-321.
- Grant, W.N. and L.J. Mascord. 1996.** β -tubulin gene polymorphism and benzimidazole resistance in *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 26:71-77.
- Haryuningtyas, D., Berijaya, dan D.G. Gray. 2001.** Resistensi antelmintika golongan benzimidazole pada domba dan kambing di Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan.* Bogor, 17-18 September 2001. hlm. 509-518.
- Haryuningtyas, D., W.T. Artama, dan W. Asmara. 2006.** Variabilitas sekuen gen tubulin- β isotype 1 cacing *Haemonchus contortus* isolat resisten terhadap benzimidazole pada domba. *JITV (11):*235-240.
- Kochapakdee, S., V.S. Pandey, W. Pralomkarn, S. Choldumrongkul, W. Ngampongasi, and A. Lawpetchara. 1995.** Anthelmintic resistance in goats in southern Thailand. *Vet. Rec.* 137:124-125.
- Kwa, M.S.G., J.G. Veenstra, and M.H. Roos. 1993.** Molecular characterization of β -tubulin genes present in benzimidazole-resistant population of *H. contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60:133-144.
- 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 β tubulin isotype-1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63:299-303.
- Kwa, M.S.G., J.G. Veenstra, M.D. Dijk, and M.H. Roos. 1995.** β -Tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Chaenorhadiis elegance*. *J. Mol. Biol.* 246:500-510.
- Lehrer S, H. Davey, T. Watson, and R.J. Wilkins. 1995.** Sensitive PCR for detecting benzimidazole resistant sub populations of ovine nematodes in the Waikito. *Proc. N Z. Soc. Anim. Prod.* 55:209-210.
- Minotti, A.M., S.B. Barlow, and F. Cabral. 1991.** Resistance to antimetabolic drugs in Chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin. *J. Biol. Chem.* 266:3987-3994.
- Prichard, R.K. 2001.** Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitol.* 17:445-453.
- Ridwan, Y., S. Kusumamihardja, P. Dorny, and J. Vercruysse. 2000.** The epidemiology of gastrointestinal nematodes of sheep in West Java Indonesia. *Hemera Zoa* 78:8-18.
- 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.
- Sangster, N.C. 1999.** Anthelmintic resistance: Past, present and future. *Int. J. Parasitol.* 29:115-124.
- Schibler, M.J. and B. Huang. 1991.** The col^{R4} and col^{R15} β -tubulin mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* confer altered sensitivities to microtubule inhibitors and herbicides by enhancing microtubule stability. *J. Cell. Biol.* 113:605-614.
- 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.
- Sivaraj, S., P. Dorny, J. Vercruysse, and V.S. Pandey. 1994.** Multiple and Multigenic anthelmintic resistance on a sheep farm in Malaysia. *Vet. Parasitol* 55:259-165.
- Waller, P.J., F. Echevarria, C. Eddi, S. Maciel, A. Nari, and J.W. Hansen. 1995.** The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Vet. Parasitol.* 62:181-187.