

# Variabilitas Sekuen Gen Tubulin $\beta$ Isotipe-1 Cacing *Haemonchus contortus* Isolat Resisten terhadap Benzimidazole pada Domba

DYAH HARYUNINGTYAS<sup>1</sup>, WAYAN T. ARTAMA<sup>2</sup> dan WIDYA ASMARA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

<sup>2</sup>PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 15 Desember 2005)

## ABSTRACT

HARYUNINGTYAS, D., W.T. ARTAMA and W. ASMARA. 2006. Sequence variability of the  $\beta$  Tubulin isotype-1 gene in benzimidazole resistant strains of *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of sheep. *JITV* 11(3): 235-240.

Resistance to benzimidazole at a population of gastrointestinal nematode, especially *Haemonchus contortus* is a widespread problem. Therefore, anthelmintic will not effective anymore. Benzimidazole resistance in nematode has been shown to be heritable and defined as an increase in frequency of individual worms able to drug tolerate. In Indonesia resistance to anthelmintic albendazole has been reported on sheep in district of Bogor, Kuningan, Kendal and province of Yogyakarta. Molecular mechanism of resistance to benzimidazole on nematode and fungi related to single gene which code  $\beta$  tubulin. The aim of this research is to determine a genetics variability of isotype-1  $\beta$  tubulin genes from Indonesian strain of *H. contortus* which resistant to benzimidazole. Sequencing were carried out at a 520 bp fragment of the isotype-1  $\beta$  tubulin gene of six *H. contortus* resistant strain from four sheep from SPTD Trijaya farm, district of Kuningan, West Java; UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan farm, district of Bantul, Yogyakarta respectively. One *H. contortus* susceptible strains as a control come from farmer from Cicurug, district of Sukabumi, West Java. Results indicated that there are genetics variability of fragment isotype-1  $\beta$  tubulin genes from *H. contortus* from UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan farm, Bantul, Yogyakarta (H1, H2, and C2). There are no genetics variability in the fragment gene of *H. contortus* resistant strain from SPTD Trijaya farm, Kuningan, West Java (Kn1, Kn2 and K1). Genetic variability occur between 2 isolate from different location.

**Key Words:** *Haemonchus contortus*, Benzimidazole, Isotype 1  $\beta$ -tubulin Gene, Sequencing

## ABSTRAK

HARYUNINGTYAS, D., WAYAN T. ARTAMA dan WIDYA ASMARA. 2006. Variabilitas sekuen gen Tubulin  $\beta$  isotipe-1 cacing *Haemonchus contortus* isolat resisten terhadap benzimidazole pada domba. *JITV* 11(3): 235-240.

Resistensi terhadap benzimidazole pada populasi cacing nematoda gastrointestinal, terutama *Haemonchus contortus* merupakan problem yang telah meluas sehingga penggunaan agen kemoterapi tersebut menjadi tidak efektif. Sifat resistensi nematoda terhadap antelmintika ini adalah diturunkan dan didefinisikan sebagai penyebab peningkatan frekuensi individu cacing yang toleran terhadap obat. Di Indonesia kejadian resistensi terhadap antelmintika albendazole telah dilaporkan terjadi di beberapa daerah yaitu Bogor, Kuningan, Kendal dan Bantul. Mekanisme molekuler terjadinya resistensi terhadap benzimidazole pada nematoda dan fungi melibatkan gen tunggal yang mengkode tubulin  $\beta$ . Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variabilitas genetik gen tubulin  $\beta$  isotipe-1 dari cacing *H. contortus* resisten isolat lokal Indonesia terhadap benzimidazole. Sekuensing dilakukan pada fragmen gen tubulin  $\beta$  isotipe-1 sepanjang 520 bp pada enam ekor cacing *H. contortus* isolat resisten terhadap benzimidazole yang berasal dari empat ekor domba dari SPTD Trijaya Kuningan, Jawa Barat dan UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Satu ekor cacing *H. contortus* isolat peka sebagai kontrol diperoleh dari domba yang berasal dari peternak di Cicurug, Sukabumi, Jawa Barat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variabilitas genetik terdapat pada sekuen fragmen gen tubulin  $\beta$  isotipe-1 dari cacing *H. contortus* isolat resisten terhadap benzimidazole yang berasal dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta (H1, H2, dan C2). Tidak terdapat variabilitas genetik pada fragmen gen tersebut dari cacing *H. contortus* isolat resisten yang berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat (Kn1, Kn2 dan K1). Variabilitas terjadi antara isolat resisten dari kedua lokasi yang berbeda.

**Kata Kunci:** *Haemonchus contortus*, Benzimidazole, Gen Tubulin  $\beta$  Isotipe-1, Sekuensing

## PENDAHULUAN

Pengendalian utama pada pemberantasan nematoda gastrointestinal termasuk *H. contortus* sebagai spesies parasit yang terpenting pada ruminansia, adalah dengan pemberian antelmintika (COLES, 2001). Antelmintika

golongan benzimidazole (BZ) paling sering digunakan karena spektrumnya yang luas dan toksisitasnya rendah (HORTON, 1990). Sangat disayangkan, penggunaan yang luas dari antelmintika golongan tersebut menyebabkan terjadinya resistensi. Saat ini, kasus resistensi terhadap benzimidazole pada komunitas

nematoda trichostrongylida merupakan problema utama pada peternakan domba dan kambing hampir di seluruh negara di dunia (WALLER *et al.*, 1995; HONG *et al.*, 1992; SANGSTER, 1999).

Diversitas genetik pada nematoda merupakan penyebab terjadinya variasi pada individu dalam merespon obat. *Haemonchus contortus* diketahui mempunyai diversitas genetik yang tinggi mengikuti seleksi resistensi terhadap BZ (PRICHARD, 2001). Seleksi resistensi didefinisikan sebagai frekuensi dan intensitas dari pengobatan serta tingginya percampuran antara alel resisten dan alel peka yang akan menghasilkan populasi parasit yang dapat lolos dari pengobatan. Dewasa ini telah banyak diketahui dasar molekuler terjadinya resistensi terhadap BZ, tetapi belum ada data yang menyebutkan darimana asal dari alel resisten terhadap BZ pada populasi cacing. Menurut SILVESTRE dan HUMBERT (2000) tiga proses yang menyebabkan adanya alel resisten terhadap BZ yaitu: (i) migrasi dan aliran gen yang memicu penyebaran alel resisten; (ii) alel resisten sudah ada dalam populasi dalam jangka waktu lama dan (iii) alel resisten yang baru muncul karena adanya mutasi spontan. Studi variabilitas alel resisten terhadap benzimidazole pada populasi nematoda *trichostrongylida* dari lokasi yang berbeda dapat diperkirakan darimana alel resisten berasal (LEIGNEL dan HUMBERT, 2001). Sejarah dan kondisi geografi juga mempunyai peranan penting untuk membedakan asal mula adanya alel resisten (SILVESTRE dan HUMBERT, 2000).

Dasar molekuler terjadinya resistensi terhadap benzimidazole melibatkan perubahan pada gen Tubulin  $\beta$ , dimana merupakan target dari BZ (LACEY, 1988; ROOS *et al.*, 1990). Ada 2 perubahan mendasar yang terjadi pada kasus resistensi pada nematoda trichostrongylida, yaitu pertama adalah mutasi pada asam amino ke-200 atau nukleotida ke-670-672 yaitu fenilalanin (TTC) menjadi tirosin (TAC) pada gen Tubulin  $\beta$  isotope-1. Mutasi ini penyebab utama terjadinya resistensi terhadap BZ pada tiga spesies cacing yang dominan dari familia Trichostrongylida yaitu *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* dan *Teladorsagia circumcincta* (LEHRER *et al.*, 1995; ELARD *et al.*, 1996; ELARD dan HUMBERT, 1999). Perubahan kedua adalah hilangnya diversitas alel dari gen Tubulin  $\beta$  pada *H. contortus* dan *T. colubriformis* (ROSS *et al.*, 1990; KWA *et al.*, 1994; BEECH *et al.*, 1994; LUBEGA *et al.*, 1994; GRAND dan MASCORD, 1996). ROOS *et al.* (1995) menyatakan bahwa sekuen DNA dari gen Tubulin  $\beta$  cacing *H. contortus* menunjukkan bahwa lokus isotope-1 mempunyai polimorfisme yang tinggi pada beberapa alel pada populasi yang peka BZ. Hilangnya satu atau dua alel pada populasi resisten terhadap BZ mengindikasikan terjadinya seleksi resistensi. Menurut PRICHARD (2001) pada populasi *H. contortus* yang

resisten terhadap BZ juga terjadi perubahan asam amino ke-167 atau nukleotida ke-446-448 yaitu fenilalanin (TTC) menjadi tirosin (TAC) atau fenilalanin (TTC) menjadi histidin (CAC) dari gen Tubulin  $\beta$  isotope-1.

Pada penelitian ini sekuensing dilakukan pada fragmen gen Tubulin  $\beta$  isotope-1 sepanjang 520 bp pada cacing *H. contortus* termasuk di dalamnya sisi yang bertanggungjawab terhadap terjadinya resistensi BZ. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui variabilitas genetik gen Tubulin  $\beta$  isotope-1 dari cacing *H. contortus* resisten isolat lokal Indonesia terhadap benzimidazole.

## MATERI DAN METODE

### Ekstraksi DNA genom *Haemonchus contortus*

Enam ekor cacing *H. contortus* betina yaitu empat ekor cacing dari domba yang diberi kode Kn dan H (masing-masing dengan kode sampel Kn1, Kn2, H1, dan H2) serta dua ekor cacing dari domba yang diberi kode K dan C (masing-masing dengan kode sampel K1 dan C2) diisolasi DNANYA secara individual. Domba Kn dan K berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat serta domba H dan C dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Satu ekor cacing *H. contortus* isolat peka sebagai kontrol berasal dari domba Cicurug, Bogor, Jawa Barat diberi kode Ccr1.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode yang digunakan oleh ROOS *et al.* (1990) dan SILVESTRE dan HUMBERT (2000) yang dimodifikasi (HARYUNINGTYAS, 2005). Secara singkat metode isolasinya sebagai berikut: cacing betina secara individual diletakkan pada tabung ditambah larutan ekstraksi yang terdiri 1 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; 10% SDS; 5 mg/ml Proteinase K. Jaringan cacing yang telah larut selanjutnya ditambahkan larutan TE yang terdiri dari 10 mM Tris HCl, pH 8 dan 1 mM EDTA. Ekstraksi selanjutnya dilakukan dengan penambahan fenol dan kloroform/isoamilalkohol (CIAA, 24 : 1). Presipitasi DNA dilakukan dengan penambahan 2,5 volume etanol absolut dan natrium asetat 3 M kemudian diletakkan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Pelet DNA yang diperoleh kemudian dilarutkan kembali pada larutan TE dan disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai dengan digunakan.

### Amplifikasi gen Tubulin $\beta$ isotope-1 dan sekuensing

*Polymerase Chain Reaction* untuk mengamplifikasi fragmen gen Tubulin  $\beta$  sepanjang 520 bp dilaksanakan menggunakan sepasang primer spesifik berdasar pada sekuen gen Tubulin  $\beta$  isotope-1 ekson 3, 4, 5 cacing *H. contortus* berasal dari data pada *genebank* 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)* dalam 25 µl total campuran reaksi terdiri dari primer Phc1 (*forward*) dan Phc2 (*reverse*) masing-masing 25 pmol (2 µl), DNA templat 25 ng (2 µl) dan ddH<sub>2</sub>O 19 µl.

Program PCR hasil optimasi yang digunakan terdiri dari denaturasi 95°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus, diikuti denaturasi 95°C selama 2 menit, *annealing* pada 58°C selama 40 detik dan ekstensi pada 72°C selama 1 menit sebanyak 36 siklus yang diikuti dengan ekstensi terakhir pada 72°C selama 7 menit. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan sekuenser ABI PRISM 310.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Amplifikasi dan sekuensing gen Tubulin β isotype-1

Amplifikasi yang dilakukan pada tujuh ekor cacing *H. contortus* (Kn1, Kn2, K1, H1, H2, C2 dan Ccr-1) yang berasal dari tiga lokasi menggunakan primer Phc1-Phc2 menghasilkan pita tunggal sebesar 520 bp. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa nukleotida yang dapat dibaca pada fragmen gen Tubulin β isotype-1 adalah sepanjang 440 bp yaitu mulai nukleotida 247 sampai 687. Asam amino ke-167 terletak pada nukleotida 446-448 dan asam amino 200 terletak pada nukleotida 670-672 .

### Variabilitas gen Tubulin β isotype-1 cacing *H. contortus* dari Farm SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat

Hasil *alligment* ketiga sekuen fragmen gen Tubulin β isotype-1 dengan primer Phc1-Phc2 dari *H. contortus* isolat resisten yang berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat, dibandingkan dengan sekuen kontrol (Tabel 1). Ketiganya mempunyai karakteristik yaitu terjadi mutasi yang sama pada bagian *coding region* (ekson) dan beberapa mutasi pada *noncoding region* (intron).

Mutasi pada sampel Kn1, Kn2 dan K1 terjadi pada ekson 5 nukleotida 609 (C/T), 654 (G/A) dan 671 (T/A). Pada ekson 3 dan 4 tidak ditemukan adanya mutasi. Ketiga sampel resisten juga mempunyai lokasi mutasi yang sama pada bagian intron 4 yaitu substitusi nukleotida seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

Hal yang cukup menarik dari hasil sekuen ini adalah pada ketiga sampel menunjukkan pola susunan nukleotida yang sama, termasuk lokasi mutasinya pada intron dan ekson. Mutasi pada nukleotida 671 (asam amino ke-200) terjadi pada ketiga sampel dari lokasi ini. Tidak ditemukan mutasi pada posisi nukleotida yang berbeda antar sampel atau tidak ada variabilitas genetik antar sampel. Menurut O'BRIEN (1997) seperti resistensi bakteri terhadap antibiotik, migrasi dan aliran gen mempunyai andil dalam penyebaran resistensi dari satu populasi ke populasi lain dan menyebabkan terjadinya variabilitas genetik. Tidak adanya variabilitas

**Tabel 1.** Lokasi nukleotida yang mengalami mutasi dari hasil *alligment* sekuen fragmen gen Tubulin β isotype-1 cacing *H. contortus* dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat

Lokasi mutasi	Posisi nukleotida	Mutasi basa pada sampel			
		Kontrol vs SPTD-Kn1	Kontrol vs SPTD-Kn2	Kontrol vs SPTD-K1	Kontrol vs <i>gene bank</i>
Intron 4	493	G/C	G/C	G/C	G/G*
	556	T/C	T/C	T/C	T/T
	559	T/C	T/C	T/C	T/T
	571	C/T	C/T	C/T	C/C
	574	A/G	A/G	A/G	A/A
		T/A	T/A	T/A	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

Posisi nukleotida dihitung sesuai segmen gen Tubulin β isotype-1 ekson 3, 4, 5 dari *gene bank* sesuai kode akses

genetik ini juga menunjukkan bahwa cacing resisten pada lokasi ini berasal dari isolat/asal tetua (F1) yang sama. Mutasi pada lokasi yang sama kemungkinan besar disebabkan oleh populasi cacing memberikan respon yang sama terhadap pengobatan dengan albendazole yang telah rutin dilakukan dalam kurun waktu kurang lebih 7 tahun.

**Variabilitas fragmen gen Tubulin  $\beta$  isotype-1 cacing *H. contortus* dari Farm UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta**

Hasil *alligment* ke-3 sampel DNA yang disekuon (H1, H2 dan C2) dibandingkan dengan kontrol (Ccr-1) menunjukkan bahwa mutasi terjadi pada beberapa lokasi (Tabel 2) baik pada ekson maupun intron.

Data sekuen yang ada 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 pada nukleotida ke-675 (T/-) dan 677 (T/-). Mutasi pada lokasi yang lain dari ketiganya, masing-masing terjadi pada ekson 4 dan intron 4 seperti yang ditunjukkan dalam Tabel 2. Berdasarkan hasil tersebut diketahui adanya variabilitas genetik antar *H. contortus* isolat resisten dari farm UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta, yaitu baik yang berasal dari domba yang sama atau berbeda dalam satu lokasi farm. Menurut SILVESTRE dan HUMBERT (2000) sejumlah kecil alel resisten kemungkinan disebarkan dari satu populasi ke populasi yang lain melalui aliran gen, terjadinya mutasi spontan atau alel resisten telah ada pada populasi sebelum dilakukan isolasi.

**Tabel 2.** Lokasi nukleotida yang mengalami mutasi dari hasil *alligment* sekuen fragmen gen Tubulin  $\beta$  isotype-1 cacing *H. contortus* dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta

Lokasi mutasi	Posisi nukleotida	Mutasi basa pada sampel			
		Kontrol vs UPTD-H1	Kontrol vs UPTD-H2	Kontrol vs UPTD-C2	Kontrol vs <i>gene bank</i>
Ekson 4	363	T/A	-	-	T/T*
Intron 4	479	-	T/C	-	T/T
	490	G/C	G/C	-	G/G
	493	T/C	T/C	T/C	T/T
	504	-	T/G	-	T/T
	509	-	T/C	-	T/T
	520	-	-	T/C	T/T
	546	-	-/G***	-	-/-
	556	T/C	T/C	T/C	T/T
	559	C/T	C/T	C/T	C/C
	571	A/G	A/G	A/G	A/A
	574	T/A	T/A	T/A	T/T
Ekson 5	581	-	-/A	-	-/-
	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

\* : Posisi nukleotida dihitung sesuai segmen gen Tubulin  $\beta$  isotype-1 ekson 3, 4, 5 dari *gene bank* sesuai kode akses yaitu X80046  
 \*\*\* : ada insersi nukleotida

### Variabilitas fragmen gen Tubulin $\beta$ isotope-1 cacing *H. contortus* dari Farm UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul dibandingkan dengan SPTD Trijaya, Kuningan

Perbandingan antara kedua isolat menunjukkan adanya variabilitas genetik pada *H. contortus* dari dua lokasi yang berbeda yaitu SPTD Trijaya, Kuningan Jawa Barat dengan UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta. Beberapa mutasi yang terjadi terletak pada lokasi yang berbeda yaitu terjadi pada ekson maupun intron pada kedua isolat (Tabel 1 dan 2). Variabilitas antar isolat terjadi pada ekson 5 sebanyak 5 nukleotida yaitu 654 (G/A), 665 (A/G), 671 (T/A), 675 (T/-) dan 677 (T/-) serta pada intron 4 sebanyak 8 nukleotida yaitu masing-masing substitusi 493 (T/C), 479 (T/C), 490 (G/C), 504 (T/G), 509 (T/C), 520 (C/T), dan insersi 546 (-/G) serta 581 (-/A).

Variabilitas genetik pada isolat yang sama terjadi pada sampel yang berasal dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta yaitu kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan cacing dalam merespon obat maupun impor domba yang memungkinkan terjadinya perkawinan antar cacing dari populasi yang berbeda. Hasil ini sesuai dengan informasi yang diperoleh dari farm UPTD, Bantul, bahwa dalam kurun waktu lima tahun terakhir lalu lintas ternak pada farm tersebut antara lain terjadi pemasukan hewan baru (dari lokasi lain) sebagai pejantan, penggantian hewan tua yang diafkir ataupun domba titipan dari peternak dalam jangka waktu tertentu untuk dikawinkan. Dari sini akan terjadi migrasi spesies atau migrasi alel resisten dari satu lokasi farm ke lokasi yang lain. Pada SPTD Trijaya, Kuningan, lalu lintas ternak terutama terjadi pada ternak untuk digulirkan pada peternak dan hampir tidak ada pemasukan hewan baru pada beberapa tahun terakhir. Menurut PRICHARD (2001) diversitas genetik dapat terjadi dalam populasi atau antar populasi (kondisi geografi yang berbeda atau seleksi terhadap obat). Studi pada 4 spesies nematoda *trichostrongylus* menunjukkan bahwa 96-99% terdapat diversitas nukleotida dalam populasi cacing tersebut. Cacing *H. contortus* menunjukkan diversitas genetik yang cukup besar baik dalam populasi atau antar isolat yang berbeda. Ukuran populasi efektif dari *H. contortus* yang besar, rerata mutasi dan rata-rata migrasi yang tinggi dalam lingkungan adalah sebagai penyebab tingginya diversitas genetik (PRICHARD, 2001).

### KESIMPULAN

Variabilitas genetik terjadi pada sekuen fragmen gen Tubulin  $\beta$  isotope-1 dari cacing *H. contortus* isolat resisten terhadap BZ yang berasal dari UPTD Pelayanan Kesehatan Hewan, Bantul, Yogyakarta (H1,

H2, dan C2). Variabilitas genetik tidak ditemukan pada fragmen gen tersebut dari cacing *H. contortus* isolat resisten terhadap BZ yang berasal dari SPTD Trijaya, Kuningan, Jawa Barat (Kn1, Kn2 dan K1). Variabilitas genetik antar isolat yang terjadi pada *H. contortus* dari dua lokasi yang berbeda menunjukkan keduanya merupakan dua isolat yang berbeda.

### DAFTAR PUSTAKA

- BEECH, R.N., R.K. PRICHARD and M.E. SCOTT. 1994. Genetic variability of the  $\beta$  tubulin genes in benzimidazole susceptible and resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics* 138: 105-110.
- COLES, G.C. 2001. The future of veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 98: 31-39.
- 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 isotope 1  $\beta$ -tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* 85: 452-456.
- GRANT, W.N. and L.J. MASCORD. 1996.  $\beta$  tubulin gene polymorphism and benzimidazole resistance in *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 26: 71-77.
- HARYUNINGTYAS, D. 2005. Studi pendahuluan deteksi mutasi pada gen Tubulin  $\beta$  isotope-1 cacing *Haemonchus contortus* isolat resisten terhadap benzimidazole dengan *Single Strand Conformation Polymorphism*. *JITV* 10: 200-207.
- HONG, C., K.R. HUNT, T.J. HARRIS, G.C. COLES, W.T.R. GRIMSHAW and P.F. McMULLIN. 1992. A Survey of benzimidazole resistant nematodes in sheep in three countries of Southern English. *The Veterinary Record* 131: 5-7.
- HORTON, R.J. 1990. Benzimidazoles in a Wormy Wold. *Parasitol. Today* 6: 106.
- O'BRIEN, T.F. 1997. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin. Infect. Dis.* 24 (Suppl). S2-S3.
- 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.
- 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.
- 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.
- LEIGNEL, V. and J.F. HUMBERT. 2001. Mitochondrial DNA Variation in Benzimidazole-Resistant and Susceptible Populations of the small ruminant parasite *teladorsagia circumcincta*. *J. Heredity*. 92: 503-506.
- LUBEGA, G.W., R.D. KLEIN, T.G. GEARY and R.K. PRICHARD. 1994. *Haemonchus contortus*: the role of two  $\beta$  tubulin gene subfamilies in the resistance to benzimidazole anthelmintics. *Biochem. Pharmacol.* 47: 1705-1715.
- 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. 1999. Anthelmintic resistance: Past, present and future. *Int. J. Parasitol.* 29: 115-124.
- 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.
- 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.