

PERKEMBANGAN METODE DETEKSI RESISTENSI CACING NEMATODA GASTROINTESTINAL PADA TERNAK TERHADAP ANTELMENTIKA

DYAH HARYUNINGTYAS

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 1611

(Makalah diterima 24 Januari 2008 – Revisi 19 Maret 2008)

ABSTRAK

Penggunaan antelmentika secara intensif pada peternakan telah menyebabkan terjadinya resistensi cacing nematoda saluran pencernaan pada ternak hampir di semua negara di dunia. Kasus resistensi terhadap antelmentika terus meningkat dari tahun ke tahun sejalan dengan tuntutan penggunaan antelmentika yang merupakan bagian terpenting dalam penanggulangan penyakit cacing. Suksesnya program kontrol penyakit cacing untuk menekan perkembangan resistensi tergantung pada tingkat ketersediaan metode yang efektif dan sensitif untuk deteksi dan monitoring. Saat ini telah banyak dikembangkan berbagai uji *in vivo* dan *in vitro* terhadap golongan antelmentika yang banyak digunakan untuk deteksi resistensi pada populasi cacing nematoda. Makalah ini akan membahas perkembangan metode deteksi antelmentika resisten baik secara konvensional maupun molekuler dengan berbagai kelebihan dan kekurangannya.

Kata kunci: Antelmentika resisten, metode deteksi, konvensional, molekuler, nematoda

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANTHELMINTIC RESISTANCE DETECTION METHODS OF GASTROINTESTINAL NEMATODES ON LIVESTOCK

The intensive usage of anthelmintic in most of farms led to resistances of livestock gastrointestinal nematodes against anthelmintic. Many reports of resistance that increased every year happen following the continuing helminth control programmes. The successful implementation of helminth control programmes that designed to minimize the development of resistance in nematode populations depends on the availability of effective and sensitive method for its detection and monitoring. A variety of *in vivo* and *in vitro* tests have been developed for detecting nematode population resistance to the main anthelmintic groups. This paper will discuss the development of detection method of anthelmintic resistance based on conventional and molecular approach according to their strengths and weakness.

Key words: Anthelmintic resistance, detection method, conventional, molecular, nematode

PENDAHULUAN

Parasit cacing saluran pencernaan dari golongan nematoda merupakan masalah utama yang menyebabkan gangguan kesehatan pada ternak khususnya ruminansia kecil. Domba dan kambing merupakan ternak yang sangat peka terhadap parasit cacing dibandingkan dengan ternak yang lain karena kebiasaannya merumput dan imunitasnya yang rendah (SCHOENIAN, 2003). Di dalam sistem penggembalaan ternak modern, perhatian utama untuk mencegah terjadinya infeksi cacing adalah meminimalisir jumlah larva infeksius di padang penggembalaan. Sistem ini umumnya dicapai dengan pemberian antelmentika secara rutin dan melakukan rotasi padang penggembalaannya (COLES *et al.*, 2006). Sebagai konsekuensi dari sistem ini akan lebih sering digunakan

antelmentika sehingga kejadian resistensi akan semakin meningkat.

Kasus resistensi cacing terhadap antelmentika golongan benzimidazole (BZ) pada mulanya ditemukan pada domba-domba di Inggris tahun 1983. Sejalan dengan perkembangan dan kebutuhan manajemen kesehatan ternak, penggunaan antelmentika dari golongan yang lain seperti *levamisole* (Lev) dan *macrolitic lactones* (Ivermectin) juga telah banyak digunakan. Saat ini multipel resistensi terhadap antelmentika golongan *benzimidazole*, *levamisole* dan *macrolitic lactones* telah terjadi hampir di seluruh dunia dan prevalensinya terus meningkat dari tahun ke tahun. Di negara maju seperti Australia misalnya, 80% peternakan domba dinyatakan telah resisten terhadap *benzimidazole* dan *levamisole* (WALLER *et al.*, 1995).

Kasus resistensi terhadap antelmentika di beberapa negara di dunia selain di Inggris dan Australia

juga dilaporkan pada: kambing di Scotlandia; domba dan kambing di Fiji (LE JAMBRE, 1994); domba di Malaysia (DORNY *et al.*, 1994), sapi di Selandia baru (VERMUNT *et al.*, 1995); domba dan kambing di Kenya (WANYANGU *et al.*, 1994), serta domba-domba di Amerika latin (WALLER, 1996), Denmark (MAINGI *et al.*, 1996), Brazil (ECHEVARRIA *et al.*, 1996), Argentina (EDDI *et al.*, 1996) dan Uruguay (NARI *et al.*, 1996).

Untuk penanggulangan dengan pemberian antelmintika diperlukan informasi jumlah cacing dalam tubuh ternak. Informasi tersebut sangat penting untuk menentukan apakah ternak terinfeksi cacing yang berat atau ringan sehingga pemberian antelmintika harus berdasarkan tingkat infeksi. Hal ini berbeda dengan kondisi di Indonesia, bahwa tingkat infeksi cacing tidak terlalu diperhatikan dan obat cacing dari golongan yang sama tetap diberikan sesuai dosis pemberian dari tahun ke tahun tanpa adanya rotasi dari golongan antelmintika yang lain (komunikasi pribadi). Hal inilah yang merupakan salah satu pemicu terjadinya resistensi pada ternak di Indonesia.

Semakin meningkatnya kasus resistensi di negara berkembang seperti Indonesia, maka sangatlah diperlukan adanya metode deteksi untuk mengetahui lebih dini terjadinya resistensi antelmintika sehingga kontrol dan pengobatan dapat dilakukan secara lebih efektif dan efisien. Metode deteksi resistensi antelmintika secara konvensional (*in vivo*) dengan menggunakan hewan percobaan yang dinekropsi sebelum dan setelah pengobatan dan *Fecal Egg Count Reduction Test* (FECRT) adalah mahal dan tidak efisien (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, 2006). Sebagai alternatif digunakan uji *in vitro* seperti *Egg Hatch Assay* (EHA) dan *Larval Development Test* (LDT). Kedua uji ini lebih cepat dilakukan terutama untuk survey prevalensi resistensi terhadap antelmintika. Uji *in vitro* mempunyai sensitivitas yang baik untuk deteksi resistensi terhadap *benzimidazole* (BZ), walaupun untuk deteksi resistensi *pyrantel* dan *macrolitic lactones* (MLs) sering kurang sensitif dibandingkan dengan tes lain seperti FECRT (CRAVEN *et al.*, 1999; LIND *et al.*, 2005; TANDON dan KAPLAN, 2004). Deteksi molekuler memberikan harapan baru untuk mengatasi beberapa keterbatasan pengujian (GASSER, 2006), seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang telah membuka perspektif baru untuk uji deteksi antelmintika resisten. Beberapa metode PCR telah dikembangkan dengan akurasi dan sensitivitas yang tinggi.

Makalah ini akan membahas perkembangan berbagai metode deteksi resistensi terhadap antelmintika secara konvensional maupun molekuler dengan berbagai kelebihan dan kekurangannya.

GOLONGAN ANTELMENTIKA

Beberapa golongan antelmintika yang ada adalah *benzimidazole*, *probenzimidazole*, *imidazothiazole*, *tetrahydropyrimidines* dan *macrolitic lactones* (GILLEARD, 2006). Menurut PRICHARD (1990) *levamisole* dan *morantel*, *ivermectine* serta *benzimidazoles* merupakan golongan antelmintika berspektrum luas yang mempunyai aktivitas terhadap sebagian besar nematoda saluran pencernaan, cacing paru dan cacing hati. Dalam kurun waktu 20 tahun terakhir obat cacing untuk ternak ruminansia yang paling banyak dipasarkan di Indonesia adalah dari golongan *benzimidazole* (BERIAJA, komunikasi pribadi).

Berdasarkan farmakologinya, *benzimidazole* diketahui menyebabkan disrupsi mikrotubulus, sedangkan *ivermectine* menyebabkan paralisa otot somatik larva cacing nematoda dan dewasa, juga menyebabkan hambatan makan pada dewasa. Sedangkan pada *levamisole* target utama dari obat adalah agonis kolinergik pada membran otot nematoda (SANGSTER dan GILL, 1999).

Secara garis besar cara kerja dari beberapa antelmintika berspektrum luas dipaparkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis antelmintika berspektrum luas

Golongan kimia	Obat (zat aktif)	Cara kerja obat
<i>Benzimidazole</i> (BZ)	<i>Albendazole</i>	Disrupsi dari mikrotubulus
	<i>Oxfendazole</i>	
	<i>Fenbendazole</i>	
	<i>Thiabendazole</i>	
<i>Probenzazole</i>	<i>Febantel</i> <i>Netobimine</i>	Disrupsi dari mikrotubulus
<i>Imidazothiazoles</i>	<i>Levamisole</i> (LEV)	Agonis reseptor nicotinic acetylcholine
	<i>Tetramizole</i>	
<i>Tetrahydropyrimidines</i>	<i>Morantel</i>	Agonis reseptor nicotinic acetylcholine
	<i>Pyrantel</i>	
<i>Macrolitic Lactones</i> (MLs)		
<i>Avermectine</i>	<i>Ivermectine</i>	Agonis Glutamate-gated chloride channel
	<i>Doramectine</i>	
	<i>Eprinomectine</i>	
	<i>Abamectine</i>	
<i>Milbemycines</i>	<i>Milbemycine</i>	Agonis Glutamate-gated chloride channel
	<i>Moxidectine</i>	

Sumber: GILLEARD (2006)

TERJADINYA RESISTENSI TERHADAP ANTELMENTIKA

Resistensi terhadap antelmintika adalah hilangnya sensitivitas yang diturunkan secara genetik pada populasi cacing yang mula-mula sensitif terhadap obat yang sama. Pada proses ini akan terjadi kemoterapi secara selektif dalam membunuh individu cacing yang peka dari populasi yang heterogen secara genetik sehingga akan terjadi peningkatan individu pembawa gen resisten yang akan diwariskan pada keturunannya (KÖHLER, 2001). Setelah beberapa generasi, gen resisten akan terakumulasi sehingga cacing pembawa gen resisten tersebut dalam populasi akan lolos dari pengobatan. Penelitian tentang mekanisme resistensi terhadap antelmintika yang sudah banyak dilaporkan adalah pada antelmintika golongan *benzimidazole*, *levamisole* dan *ivermectine* (KWA *et al.*, 1994; SANGSTER dan GILL, 1999).

Secara garis besar resistensi terhadap benzimidazole terjadi karena seleksi pada gen tubulin β isotype-1 (β 8 – 9) dan isotype-2 (β 12 – 16) (KWA *et al.*, 1993; LUBEGA *et al.*, 1994; BEECH *et al.*, 1994). Menurut KWA *et al.* (1994; 1995) mutasi *conserved* pada asam amino ke-200 dari gen tubulin β isotype-1 yaitu dari fenilalanin menjadi tirosin mempunyai kontribusi pada fenotipe BZ resisten. BEECH *et al.* (1994) pada penelitiannya di lapang dan di laboratorium pada strain resisten terhadap BZ juga ditemukan adanya mutasi pada asam amino 167 dari fenilalanin menjadi tirosin atau histidin.

Resistensi terhadap LEV diduga melibatkan beberapa gen. Menurut SANGSTER *et al.* (1988) resistensi terhadap LEV berhubungan dengan reduksi jumlah reseptor *nicotinic acetylcholine* (nAChR) pada nematoda atau perubahan pada sisi pengikatannya. SANGSTER *et al.* (1998) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa strain resisten mempunyai afinitas yang rendah terhadap reseptor sehingga menjadi tidak responsif terhadap LEV. Mekanisme molekuler terjadinya resistensi ditemukan adanya mutasi pada sekuens yang mengkode bagian transmembran dari reseptor molekul struktural (SANGSTER dan GILL, 1999).

Gen pertama yang ditemukan berhubungan dengan resistensi terhadap golongan *macrolitic lactones* adalah gene P-glycoprotein, PGP-A (XU *et al.*, 1998; BLACKHALL *et al.*, 1998). Menurut DENT *et al.* (2000) Avermectin/Milbemycine (AM) bekerja pada *glutamate-gated Cl-channels*. Sedangkan TAYLOR (1999) menyatakan bahwa AM terlibat dalam pengikatan obat pada sub unit α dari *glutamate-gated chloride channel* yang membuka dan memulai hiperpolarisasi pada sel target yaitu urat syaraf. Menurut PRICHARD (2001) gen Glu Cl mempunyai mekanisme aksi pada antelmintika golongan ini.

BEBERAPA METODE DETEKSI RESISTENSI

Deteksi resistensi secara konvensional

Beberapa metode deteksi resistensi secara konvensional adalah sebagai berikut:

Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT)

Fecal Egg Count Reduction Test. Merupakan uji *in vivo* untuk mengetahui adanya resistensi nematoda terhadap antelmintika golongan tertentu. Uji ini dapat dilakukan untuk semua golongan antelmintika pada semua jenis nematoda pada ternak ruminansia, kuda dan babi (COLES *et al.*, 2006). Uji ini memberikan estimasi efektivitas antelmintika dengan membandingkan jumlah telur cacing per gram tinja sebelum dan sesudah pengobatan dimana interval waktu yang diperlukan tergantung pada golongan antelmintika yang digunakan (COLES *et al.*, 2006). Menurut MARTIN *et al.* (1989) interval antara pengobatan dan pengamatan adalah lebih dari 10 hari, karena pada interval kurang dari 10 hari produksi telur menurun karena efek obat sehingga dapat menyebabkan terjadi estimasi yang salah pada efikasi antelmintika BZ. COLES *et al.* (1992) memberikan rekomendasi untuk mengkolleksi sampel feses 10 – 14 hari setelah pengobatan dengan BZ. Studi pada kambing yang diobati dengan ivermectin menunjukkan penghambatan pengeluaran telur terjadi pada hari ke-10 – 14 sehingga memberikan hasil negatif palsu. Oleh sebab itu, pengamatan sebaiknya dilakukan pada hari ke-14 – 17 setelah pengobatan dengan ivermectin (COLES *et al.*, 2006). Untuk melihat ada atau tidaknya resistensi terhadap LEV hasil positif palsu akan diperoleh apabila penghitungan telur pada feses yang dilakukan pada hari ke-11 atau lebih, karena pada saat ini terjadi pematangan cacing yang masih muda (GRIMSHAW *et al.*, 1996). Oleh sebab itu, apabila diketahui telah terjadi resistensi terhadap LEV sampel feses harus diperiksa 7 hari setelah pengobatan (TAYLOR *et al.*, 2002). Uji FECRT ini akan memberikan hasil nyata apabila jumlah cacing yang resisten adalah lebih dari 25% dalam populasi (MARTIN *et al.*, 1989). Dosis obat yang diberikan pada hewan yang terinfeksi cacing secara alami maupun buatan harus sesuai dengan dosis yang direkomendasikan. Apabila efikasi yang diharapkan adalah 99% maka resistensi terhadap antelmintika bisa ditetapkan apabila diperoleh efikasi < 95% dari jumlah hewan pada kelompok pengobatan dengan hasil yang signifikan. Uji ini merupakan cara untuk menentukan efikasi obat sehingga paling sering digunakan untuk konfirmasi adanya resistensi terhadap antelmintika tetapi biaya yang mahal sering menjadi kendalanya. Walaupun demikian uji ini adalah merupakan *Gold Standard*

untuk deteksi antelmintika resisten (COLES *et al.*, 2006).

The controlled test (uji kontrol)

Menurut BOERSEMA (1983) dan PRESIDENTE (1985) uji ini sangat sensitif untuk menentukan efikasi antelmintika tetapi sangat mahal karena sulit dilakukan dan memerlukan banyak hewan percobaan. Uji kontrol ini merupakan uji *in vivo*. Pada uji ini hewan yang digunakan perlu dinekropsi setelah diobati. Saat ini, uji kontrol sudah sangat jarang dipakai (TAYLOR *et al.*, 2002). Untuk karakterisasi sensitivitas dari isolat lapang, kelompok hewan bebas cacing harus diinokulasi dengan larva infeksiif serta antelmintika yang diujikan yaitu 0,5, 1 dan 2 kali dosis yang direkomendasikan (PRESIDENTE, 1985). Apabila terjadi infeksi campuran dari beberapa jenis cacing maka diperlukan kultur untuk mengidentifikasi dan menghitung perbedaan jenis cacing tersebut. Resistensi umumnya dikonfirmasi jika reduksi dari rata-rata jumlah cacing kurang dari 90% (PRESIDENTE, 1985).

Egg Hatch Assay (EHA)

Egg Hatch Assay merupakan uji *in vitro* yang dapat digunakan untuk mendeteksi semua tipe BZ dan *probenzimidazole* (HUNT dan TAYLOR, 1989) tetapi tidak dapat digunakan untuk mendeteksi resistensi terhadap antelmintika golongan lain yang berspektrum luas seperti *levamisole* atau *ivermectine* (COLES, 1988; JOHANSEN, 1989; GRIMSHAW *et al.*, 1994). Obat yang biasa dipakai pada uji ini adalah *thiabendazole* karena sifatnya yang relatif mudah larut dalam air. Pada uji ini diperlukan sampel telur segar yang harus diuji dalam waktu 3 jam setelah koleksi atau dapat disimpan dalam bentuk anerobik (HUNT dan TAYLOR, 1989). Dengan menggunakan dosis yang berbeda (*Discriminating dose*), uji sensitivitas dapat ditingkatkan dan estimasi jumlah telur cacing dapat ditentukan dengan membuat persentase telur resisten pada sampel feses. *Discriminating dose* adalah dosis dimana dapat membunuh 99% telur yang peka sehingga telur yang menetas pada konsentrasi ini adalah telur resisten (COLES *et al.*, 2006). Data terkini menyebutkan dosis 0,1 µg/ml *thiabendazole* akan menghambat 99% penetasan cacing *H. contortus*, *T. circumcincta* dan *T. colubriformis*.

Uji paralisis larva, uji migrasi dan pergerakan

Uji paralisis larva ini merupakan uji *in vitro* yang mula-mula dikembangkan oleh MARTIN dan LE JAMBRE pada tahun 1979 untuk deteksi resistensi terhadap *levamisole* dan *morantel*. Pada uji ini larva

infeksiif stadium 3 diinkubasi selama 24 jam pada pengenceran konsentrasi antelmintika secara bertingkat. Setelah 24 jam, larva diklasifikasikan antara yang normal (bergerak) atau mengalami paralisis (tidak bergerak sampai 5 detik). Persentase larva yang mengalami paralisis dihitung dan ditentukan untuk masing-masing konsentrasi pada garis plot respon dosis dan dibandingkan dengan strain *reference* yang sudah diketahui. Menurut SUTHERLAN dan LEE (1990) modifikasi uji larval paralisis cocok untuk deteksi *thiabendazole* resisten.

GILL *et al.* (1991) melaporkan bahwa uji motilitas dapat digunakan untuk mendeteksi resistensi terhadap ivermectin pada larva *H. contortus* stadium 3. Larva stadium 3 diinkubasikan dalam agar yang mengandung *ivermectine* dengan dosis bertingkat kemudian ditempatkan pada ruang gelap dengan suhu 25°C selanjutnya diekspose dengan cahaya. Dosis yang menginduksi paralisis dilaporkan dan dapat dibedakan antara isolat resisten dan peka.

Untuk *migration assay* (uji migrasi) dapat menggunakan cacing nematoda dewasa pada babi (*Oesophagostomum dentatum*) untuk membedakan strain peka dan resisten terhadap BZ dan pyrantel. Cacing dewasa yang dikoleksi dari hewan yang dipotong diinkubasikan pada antelmintika dengan dosis bertingkat selama 30 menit. Cacing kemudian dipindahkan ke kamar migrasi yang berupa saringan poliamide dengan ukuran 300 – 500 µm selanjutnya cacing dibiarkan migrasi selama 30 menit. Kurva dosis respon kemudian diplot berdasar penghambatan migrasi oleh saringan pada berbagai konsentrasi obat yang digunakan (PETERSEN *et al.*, 1997; 2000).

Uji biokimia

Uji *in vitro* ini digunakan untuk mengetahui resistensi terhadap BZ. Resistensi terhadap BZ berhubungan dengan reduksi afinitas tubulin terhadap antelmintika (LACEY *et al.*, 1987). Menurut LACEY dan SNOWDEN (1988) uji ini menggunakan pengikatan carbamat BZ pada ekstrak tubulin dari larva stadium 3. Uji ini dinyatakan cepat, mudah diproduksi dan sensitif untuk mengetahui perubahan minor status resistensi pada populasi parasit. Akan tetapi uji ini mempunyai kelemahan karena memerlukan larva dalam jumlah besar sehingga tidak cocok untuk digunakan sebagai uji rutin di lapang (TAYLOR *et al.*, 2002).

Larval Development Test (LDT)

Metode deteksi yang lain adalah LDT (metode perkembangan larva). Ada dua versi LDT yang telah digunakan. Yang pertama adalah uji yang berbasis cairan (*liquid based test*) (HUBERT dan KERBOUF,

1992) dan kedua uji yang berbasis agar (*Microagar Larval Development Test* (MALDT) yang mirip dengan uji komersial *Drencrite® Larval Development Assay* (LDA) yang pernah digunakan untuk penelitian resistensi antelmintika di Indonesia (HARYUNINGTYAS *et al.*, 2001; BERIAJAYA *et al.*, 2002). Berbeda dengan EHA umur telur yang digunakan pada uji ini adalah tidak terlalu penting. Uji ini dapat digunakan untuk mendeteksi BZ dan LEV resisten dan menghasilkan larva stadium 3 untuk deferensiasi spesies pada akhir uji (COLES *et al.*, 1992). *Discriminating dose* yang digunakan untuk uji ditentukan sebagai berikut: nematoda pada domba/kambing 0,02 µg/ml TBZ dan 0,5 µg/ml LEV sedangkan untuk nematoda pada kuda 0,12 µg/ml TBZ dan 0,4 µg/ml LEV (COLES *et al.*, 2006). *Discriminating dose* ini diperlukan untuk meningkatkan sensitivitas dan kesederhanaan uji.

Metode deteksi resistensi secara molekuler

Saat ini metode deteksi resistensi berdasarkan genetik dengan menggunakan PCR telah banyak dikembangkan. Metode ini lebih sensitif daripada metode konvensional. Walaupun demikian, sementara ini deteksi berbasis molekuler hanya digunakan untuk resistensi terhadap BZ pada sejumlah kecil spesies cacing *strongyl* pada ruminansia kecil dan kuda (HUMBERT *et al.*, 2001; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2002a; 2003). Hal ini disebabkan karena hanya mekanisme resistensi terhadap BZ saja yang sejauh ini diketahui melibatkan 1 gen sedangkan antelmintika golongan yang lain melibatkan banyak gen. Deteksi dengan menggunakan PCR ini telah berhasil digunakan untuk penyelidikan pentingnya asam amino ke-200 pada gen tubulin β yang terlibat pada terjadinya resistensi BZ cacing nematoda ruminansia dan kuda (PAPE *et al.*, 2003; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2002b; SILVESTRE *et al.*, 2001; SILVESTRE dan CABARET, 2002; SILVESTRE dan HUMBERT, 2002).

PCR-RFLP

Studi deteksi resistensi terhadap BZ dengan PCR mula-mula dilakukan oleh ROOS *et al.* (1990) yaitu dengan menyelidiki polimorfisme DNA pada genom populasi larva dan dewasa cacing *H. contortus* yang peka dan resisten terhadap BZ menggunakan teknik *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP) setelah *southern blotting*. Pada teknik ini klon gen tubulin alfa dan beta dari *H. contortus* digunakan sebagai probe untuk menganalisa DNA yang disediakan dari campuran larva infeksi dan cacing dewasa. Pada populasi cacing yang peka terhadap BZ, maksimum

sebanyak 6 fragmen yang berbeda akan terlihat menggunakan probe. Sedangkan pada populasi resisten BZ dari berbagai lokasi dengan kondisi geografi yang berbeda hanya satu atau dua fragmen yang dapat diidentifikasi dengan probe tubulin β. Dari sini diketahui bahwa pada populasi cacing resisten BZ terjadi perubahan atau reduksi komplemen gen tubulin β jika dibandingkan dengan populasi peka (KWA *et al.*, 1993).

Alel Spesifik -PCR

Metode lain berbasis PCR adalah Alel Spesifik PCR yang digunakan untuk membedakan genotip *H. contortus* (KWA *et al.*, 1994) dan *T. circumcincta* (ELARD *et al.*, 1999). Perkembangan lebih lanjut dengan Alel spesifik PCR untuk genotip spesies nematoda lain yang resisten BZ pada domba berdasar adanya mutasi pada asam amino ke-200 dari gen tubulin beta juga telah dilaporkan oleh SILVESTRE dan HUMBERT (2000) dan juga beberapa spesies *cyathostomin* pada kuda (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2002b).

PCR-SSCP

Menurut HARYUNINGTYAS (2005) *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) dengan menggunakan bagian sentral gen tubulin β isotype-1 sepanjang 520 bp juga dapat digunakan untuk membedakan cacing *H. contortus* peka atau resisten dari 3 lokasi yang berbeda. Menurut GASSER dan CHILTON (2001) metode SSCP dapat digunakan untuk menganalisis variasi sekuens pada individu parasit dan populasinya. Sedangkan metode PCR-SSCP 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.

Real time-PCR

Metode molekuler terkini adalah menggunakan *real time* PCR (RT-PCR). ALVAREZ- SANCHEZ (2005) menjelaskan perkembangan metode *real time* PCR untuk membedakan frekuensi alel dari kodon ke-200 gen tubulin beta isotype-1 pada sampel DNA nematoda. Diferensiasi alel dapat dicapai dengan menggunakan *primer reverse* dua alel spesifik yang dikombinasikan dengan *primer forward universal* pada reaksi yang berbeda.

PROSPEK PENGEMBANGAN METODE DETEKSI ANTELMENTIKA RESISTEN DI INDONESIA

Di Indonesia kasus resistensi terhadap *benzimidazole* telah dilaporkan terjadi di beberapa peternakan domba di Jawa Tengah, Jawa Barat dan Yogyakarta (RIDWAN *et al.*, 2000; HARYUNINGTYAS *et al.*, 2001; BERIAJAYA *et al.*, 2002). Dengan demikian deteksi resistensi antelmintika khususnya terhadap BZ perlu dilakukan di peternakan dimana antelmintika telah sering digunakan. Dengan uji yang cepat dan akurat resistensi terhadap antelmintika dapat segera diketahui.

Saat ini metode deteksi secara konvensional memungkinkan lebih cocok untuk digunakan di Indonesia mengingat biaya ujinya yang lebih terjangkau dibandingkan dengan deteksi secara molekuler terutama untuk skala petani peternak kecil. Metode MALDT lebih cocok untuk dikembangkan di Indonesia karena metode ini adalah cukup akurat, praktis dan murah juga memerlukan peralatan yang sederhana saja dalam memproses sampelnya. Disamping itu, karena tes ini memerlukan larva stadium pertama sehingga tidak diperlukan sampel feses yang segar yang sering menjadi kendala seperti pada metode EHA (COLES, 1988). Metode EHA pernah dikembangkan di Indonesia tetapi dirasa kurang praktis karena kendala tersebut. *Plate* yang digunakan pada MALDT bisa menggunakan mikropate bekas ELISA. Perbedaan dosis yang diperlukan untuk mengetahui cacing nematoda peka atau resisten juga telah diketahui (COLES *et al.*, 2006). Walaupun demikian diperlukan penelitian untuk mengetahui berapa lama kestabilan obat di dalam agar sehingga memberikan hasil yang konsisten.

Pengembangan metode molekuler terutama diperlukan untuk skrining masal pada peternakan domba milik pemerintah dan milik swasta yang berskala besar karena bagaimanapun metode ini adalah paling cepat dan akurat serta hanya memerlukan sejumlah kecil sampel. Dengan diketahuinya status resistensi secara lebih dini maka pendekatan kontrol endoparasit pada ruminansia kecil secara berkelanjutan digunakan untuk menekan meluasnya resistensi terhadap BZ di Indonesia.

KESIMPULAN

Ancaman resistensi terhadap antelmintika menurunkan kinerja dan kegagalan pada kontrol penyakit secara klinik. Di bawah sistem manajemen yang intensif strategi pengendalian parasit yang utama adalah pemberian obat antiparasit. Bagaimanapun penggunaan obat secara rutin untuk kontrol organisme infeksi mempunyai resiko berkembangnya populasi resisten. Telah banyak dilaporkan kasus resistensi

terhadap beberapa kelompok antelmintika berspektrum luas sehingga perhatian yang besar diperlukan untuk memberikan saran pada kontrol parasit. Bagaimanapun juga strategi yang efektif untuk pengendalian penyakit cacing tergantung pada monitoring dan pengawasan yang efektif menggunakan metode yang akurat. Oleh karena itu, pengembangan metode deteksi antelmintika resisten yang sensitif sangat diperlukan untuk monitoring kasus resistensi di lapang. Pada akhirnya diharapkan pemberian obat yang dilakukan dapat lebih tepat dan efisien serta bisa mencegah terjadinya resistensi.

DAFTAR PUSTAKA

- ALVAREZ SANCHEZ, M.A. 2005. Real time pcr for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Vet. Parasitol.* 129: 291 – 298.
- BEECH, R.N., R.K. PRICHARD and M.E. SCOTT 1994. Genetic variability of the β tubulin genes in benzimidazole susceptible and resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics.* 138: 105 – 110.
- BERIAJAYA, D. HARYUNINGTYAS and G.D. GRAY 2002. Kejadian resistensi terhadap antelmintika 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 – 407.
- BLACKHALL, W.J., J.F. POULIOT, R.K. PRICHARD and R.N. BEECH. 1998. *Haemonchus contortus*: Selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin and moxidectin selected strains. *Exp. Parasitol.* 90: 42 – 48.
- BOERSEMA, J.H. 1983. Possibilities and limitation in the detection of anthelmintic resistance. *In: Facts and Reflections IV. Resistance of Parasites to Anthelmintics.* Central Veterinary Institute, The Netherland. pp. 207 – 218.
- 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 (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44: 35 – 44.
- COLES, G.C. 1988. Strategy for control of anthelmintic resistant nematodes of ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 330 – 334.
- COLES, G.C., F. JACKSON, W.E. POMROY, R.K. PRICHARD R.K., G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, A. SILVESTRE, M.A. TAYLOR and J. VERCRUYSE. 2006. The detection of anthelmintics resistance in nematode of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136: 167 – 185.

- CRAVEN, J., H. BJORN, E.H. BARNES, S.A. HENRIKSEN and P. NANSEN. 1999. A comparison of *in vitro* test and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. *Vet. Parasitol.* 85: 49 – 59.
- DENT, J.A., M.M. SMITH, D.K. VASSILATIS and L. AVERY. 2000. The genetics of ivermectin resistance in *Chaenorhabditis elegans*. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2674 – 2679.
- DORNY, P., E. CLAREBOUT, J. VERCRUYSE, R. SANI and A. JALILA. 1994. Anthelmintic resistance in goats in Peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 55: 327 – 342.
- ECHEVARRIA, F., M.F.S. BORBA, A.C. PINHEIRO, P.J. WALLER, and J.W. HANSEN. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Vet Parasitol.* 62: 119 – 206.
- EDDI, C., J. CARACOSTANTOGOLO, M. PENA, L. SCHAPIRO, L. MARANGUNICH, P.J. WALLER and J.W. HANSEN. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Argentina. *Vet. Parasitol.* 62: 189 – 197.
- ELARD, L., J. CABARET and J. F. HUMBERT. 1999. PCR diagnosis of benzimidazole-susceptibility or resistance in natural populations of the small ruminants parasite, *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 80: 231 – 237.
- GASSER, R.B. 2006. Molecular tool: Advances, opportunities and prospects. *Vet. Parasitol.* 136: 69 – 89.
- GASSER, R.B. and CHILTON N.B. 2001. Application of single strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. *Vet. Parasitol.* 101: 201 – 213.
- GILL, J.H., J.M. REDWIN, J.A. VAN WYK and E. LACEY. 1991. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 30: 139 – 148.
- GILLEARD, J.S. 2006. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. *Int. J. Parasitol.* 36: 1227 – 1239.
- GRIMSHAW, W.T.R., C. HONG and K.R. HUNT. 1996. Potential for misinterpretation of the fecal egg count reduction test for levamisole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep. *Vet. Parasitol.* 62: 267 – 273.
- GRIMSHAW, W.T.R., K.R. HUNT, C. HONG and G.C. COLES. 1994. Detection of anthelmintic resistant nematodes in sheep in Southern England by a faecal egg count reduction test. *Vet. Rec.* 15: 372 – 374.
- HARYUNINGTYAS, D. 2005. Deteksi mutasi pada gen tubulin β isotype-1 cacing *Haemonchus contortus* isolate resisten terhadap benzimidazole dengan *Single Strand Conformation Polymorphism*. *JITV* 10(3): 200 – 207.
- HARYUNINGTYAS, D., BERIAJAYA dan D.G. GRAY 2001. Resistensi antelmintika golongan benzimidazole pada domba dan kambing di Indonesia. *Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor*, 17 – 18 September 2001. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 509 – 518.
- HUBERT, J. and D. KARBEUF. 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130: 442 – 446.
- HUMBERT, J.F., J. CABARET., L. ELARD, V. LEIGNEL and A. SILVESTRE. 2001. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. *Vet. Parasitol.* 101: 405 – 414.
- HUNT, K.R. and M.A. TAYLOR. 1989. Use of the egg hatch assay on sheep fecal samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes. *Vet. Rec.* 125: 153 – 154.
- JOHANSEN, M.V. 1989. An evolution of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. *Vet. Res. Commun.* 13: 455 – 466.
- KOHLER, P. 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 31: 336 – 345.
- KWA, M.S.G., J.G. VEENSTRA and M.H. ROOS. 1993. Molecular characterisation of β -tubulin genes present in benzimidazole resistant populations of *Haemonchus 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 *Chaenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 246: 500 – 510.
- LACEY, E. and K.L. SNOWDEN. 1988. A routine diagnostic assay for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes using tritiated benzimidazole carbamates. *Vet. Parasitol.* 27: 309 – 324.
- LACEY, E., R.L. BRADY., R.K. PRICHARD and T.R. WATSON. 1987. Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Vet. Parasitol.* 23: 105 – 119.
- LE JAMBRE, L.F. 1994. Ecological and host –genetic control of internal parasites of small ruminants in the Pasific Islands. ACIAR Project 8913. Termination report.
- LIND, E.O., A. UGGLA, P. WALLER, and J. HOGLUND. 2005. Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomins of Swedish horses. *Vet. Parasitol.* 128: 261 – 269.

- 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.
- MAINGI, N., H. BJORN, S.M. THAMSBORG, A. DANGOLLA and N.C. KYVSGAARD. 1996. Worm control practices on sheep farms in Denmark and implication for the development of anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 66: 39 – 52.
- MARTIN, P.J., N. ANDERSON and R.G. JARRETT. 1989. Detecting benzimidazoles resistance with fecal egg count reduction test an *in vitro* assay. *Aus. Vet. J.* 66: 236 – 240.
- NARI, A., J. SALLES, A. GILL, P.J. WALLER and J.W. HANSEN. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Vet. Parasitol.* 62: 213 – 222.
- PAPE, M., J. POSEDI, K. FAILING, T. SCHNIEDER and G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA. 2003. Analysis of the β tubulin codon 200 genotype distribution in benzimidazole-susceptible and resistant cyathostome population. *Parasitol.* 137: 53 – 59.
- PETERSEN, M.B., C. FRIIS and H. BJORN. 1997. A new *in vitro* assay for the quantification of benzimidazole activity against adult *Oesophagostomum dentatum*. *Int. J. Parasitol.* 27: 1333 – 1339.
- PETERSEN, M.B., J. CRAVEN, H. BJORN and P. NANSEN. 2000. Use a migration assay for the separation of adult pyrantel- susceptible and resistant *Oesophagostomum dentatum*. *Vet. Parasitol.* 91: 141 – 145.
- PRESIDENTE, P.J.A. 1985. Methods for detection of resistance to anthelmintics. In: *Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs*. ANDERSON, N. and P.J. WALLER (Eds.). Division of Animal Health, CSIRO, Australia. pp. 13 – 27.
- PRICHARD, R.K. 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol.* 17: 445 – 453.
- PRICHARD, R.K. 1990. Anthelmintic resistance in nematodes, recent understanding and future directions for control and research. *Int. J. Parasitol.* 20: 515 – 523.
- RIDWAN, Y., F. SATRIJA, E.B. RETNANI and R. TIURIA. 2000. *Haemonchus contortus* resistant to albendazole on sheep farm in Bogor. International Conference on Soil Transmitted Helminth Control and Workshop on Indonesian Association of Parasitic Disease Control. Bali, 21 – 24 February 2000 (Abstract).
- 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. and J. GILL. 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol. Today.* 15: 141 – 146.
- SANGSTER, N.C., F.L. RILEY and G.H. COLLINS. 1988. Investigation of mechanism of levamisole resistance in trychostrongylid nematodes of sheep. *Int. J. Parasitol.* 18: 813 – 818.
- SANGSTER, N.C., J.M. REDWIN and H. BJORN. 1998. Inheritance of levamisole and benzimidazole resistance in isolate of *H. contortus*. *Int. J. Parasitol.* 28: 503 – 510.
- SCHOENIAN, S. 2003. Integrated Parasite Management (IPM) in Small Ruminants. <http://www.sheepandgoat.com/articles/IPM.html>. (9 Januari 2008).
- SILVESTRE, A. and J. CABARET. 2002. Mutation in position 167 of isotype-1 beta tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: Role in benzimidazole resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120: 297 – 300.
- 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.
- SILVESTRE, A. and J.F. HUMBERT. 2002. Diversity of Benzimidazole-resistance alleles in population of small ruminant parasites. *Int. J. Parasitol.* 32: 921 – 928.
- SILVESTRE, A., J. CABARET and J.F. HUMBERT. 2001. Effect of benzimidazole under dosing on the resistant allele frequency in *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda). *Parasitol.* 123: 103 – 111.
- SUTHERLAND, I.A. and D.L. LEE. 1990. A larval paralysis assay for the detection of thiabendazole resistance in trychostrongyles. *Parasitol.* 100: 131 – 135.
- TANDON, R. and R.M. KAPLAN. 2004. Evaluation of a larval development assay (DrenchRite) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomins nematodes of horses. *Vet. Parasitol.* 121: 125 – 142.
- TAYLOR, M.A. 1999. Use anthelmintic in sheep. In *Practice*. 21: 222 – 231.
- TAYLOR, M.A., K.R. HUNT and K.L. GOODYEAR. 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* 103: 183 – 194.
- 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.
- WALLER, P.J., F. ECHEVARRIA, C. EDDI, S. MACIEL, A. NARI and J.W. HANSEN. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Vet. Parasitol.* 62: 181 – 187.
- WANYANGU, S.W., R.K. BAIN, M.K. RUGUTT, J.M. NGINYI and J.M. MUGAMBI. 1994. Anthelmintic resistance among sheep and goat in Kenya. *Prev. Vet. Med.* 25: 285 – 290.

- VERMUNT, J.J., D.M. WEST and W.E. POMROY. 1995. Multiple resistance to ivermectin and oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zealand. *Vet. Rec.* 137: 43 – 45.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., M. PAPE, C. VON WITZENDORFF and T. SCHNIEDER. 2002a. Allele specific PCR for the beta tubulin codon 200 TTC/TAC polymorphism using single adult and larval small strongyle (*Cyathostominae*) stages. *J. Parasitol.* 88: 254 – 257.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., C. VON WITZENDORFF and T. SCHNIEDER. 2002b. Comparative use of fecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (*Cyathostominae*) before and after benzimidazole treatment. *Vet. Parasitol.* 108: 227 – 235.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., S. BUSCHBAUM, N. WINTHERLE, M. PAPE and T. SCHNIEDER. 2003. Taq man minor groove binder real time PCR analysis of beta-tubulin codon 200 polymorphism in small strongyles (*Cyathostomine*) indicates that the TAC allele is only moderately selected in benzimidazole-resistant populations. *Parasitol.* 127: 489 – 496.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA. 2006. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 136: 99 – 107.
- XU, M., M. MALENTO, W. BLACKHALL, P. RIBERIO, R. BEECH and R. PRICHARD. 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homologue. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91: 327 – 335.