



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

Optimasi Metode Ekstraksi DNA Cacing Dewasa *Haemonchus contortus* untuk Pengujian Molekuler

Ridi Arif¹, Syafrina Atika Putri Nasution², Muhammad Agil³

¹Divisi Parasitologi dan Entomologi Kesehatan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Jl Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

²Program Studi Sarjana Kedokteran Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Jl Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

³Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Jl Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

Abstract

Keywords:

Haemonchus contortus,
extraction,
PCR,
molecular

Korespondensi:

ridiarif88@apps.ipb.ac.id

Haemonchosis is a gastrointestinal helminth infection caused by Haemonchus contortus. PCR-based molecular testing has high sensitivity and specificity, enabling more accurate identification of H. contortus than other diagnostic methods. However, adult H. contortus worms have a complex and strong body structure, so it is necessary to optimize various effective extraction methods to isolate DNA to obtain optimal PCR results. The aim of this study was to obtain the most optimal extraction method for H. contortus adult worms for molecular identification. The adult worm sample extraction method consisted of six methods, namely a group of male adult worms cut into 1 mm, female adult worms cut into 1 mm, male adult worms crushed, female adult worms crushed, male adult worms heated, and female adult worms heated. The results of PCR products read by electrophoresis showed the brightest DNA band in the method of adult worms cut into 1 mm with a DNA band length of 260 bp. This method is also the most efficient to do because it uses the least time and energy compared to other methods.

PENDAHULUAN

Ternak domba merupakan ternak yang sangat populer di kalangan masyarakat Indonesia. Namun, iklim Indonesia yang tropis menjadi tantangan tersendiri bagi peternak dalam mengelola kesehatan ternaknya. Berbagai agen penyakit seperti bakteri, virus, dan parasit dapat dengan mudah tumbuh dan berkembang pada kondisi tropis. Penyakit parasitik seperti kecacingan menjadi permasalahan yang banyak ditemukan pada ternak domba. Salah satu cacing parasit yang sering menyerang dan menimbulkan kerugian pada ternak ruminansia adalah cacing *Haemonchus contortus* (Ahmad dan Tiffarent 2020).

Haemonchus contortus adalah nematoda dari ordo *Strongylida* yang paling penting karena paling banyak menginfeksi ruminansia kecil pada area tropis dan subtropis (Nobre *et al.* 2020; Besier *et al.* 2016). Infeksi cacing ini dapat menyebabkan tingkat pertumbuhan domba yang lebih rendah, mengurangi kinerja reproduksi yang terlihat nyata, memiliki kerentanan yang lebih tinggi terhadap paparan penyakit, dan menyebabkan kematian.

Metode molekuler *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik diagnosis yang memiliki sensitivitas paling besar dan mampu mengidentifikasi *Haemonchus contortus* hingga tingkat spesies (Ljungström *et al.* 2018). Uji PCR seringkali menghasilkan pita DNA yang kurang optimal karena kesalahan dalam prosesnya. Hal tersebut karena keberhasilan amplifikasi dipengaruhi oleh kualitas preparasi sampel, konsentrasi *template* DNA, dan keberadaan inhibitor PCR (Yuenleni 2019). Ketidakesesuaian metode lisis dapat menyebabkan DNA rusak atau tidak terlepas sempurna dari matriks kutikula sehingga menghasilkan pita amplikon yang tipis, terjadi *smear*, atau bahkan tidak teramplifikasi (Mohamed *et al.* 2024).

Cacing dewasa sebagai target ekstraksi DNA untuk pengujian molekuler memiliki struktur tubuh yang kompleks sehingga diperlukan teknik yang dapat melisis cacing dewasa agar DNA dapat terekstraksi dengan sempurna. Untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal dapat dilakukan dengan cara memvariasikan metode preparasi yang digunakan pada proses PCR tersebut (Aulia *et al.* 2021). Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan metode preparasi cacing dewasa *H. contortus* paling optimal untuk identifikasi molekuler.

METODOLOGI

Persiapan Sampel

Sampel cacing diambil dari abomasum domba yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan MT Farm. Abomasum disayat pada bagian *curvatura mayor* dan isi abomasum dikeluarkan. Sampel yang diambil adalah cacing *H. contortus* jantan dan betina. Cacing yang diambil langsung dari mukosa abomasum domba kemudian dikelompokkan berdasarkan jenis kelamin dan dimasukkan ke dalam cawan petri setelah dibilas terlebih dahulu menggunakan NaCl fisiologis.

Sampel cacing yang telah dikelompokkan dipreparasi pada tiap individu cacing sebagai parameter yang diamati. Perlakuan preparasi yang dilakukan di antaranya cacing dewasa jantan dipotong sepanjang 1 mm, cacing dewasa betina dipotong sepanjang 1 mm, cacing dewasa jantan digerus, cacing dewasa betina digerus, cacing dewasa jantan dipanaskan, dan cacing dewasa betina dipanaskan. Masing-masing cacing yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam *tube* 0,2 mL. *Tube* diberi label.

Deteksi Molekuler PCR

Lysis solution dibuat dengan mencampurkan 25 μ L *direct* PCR, 1 μ L *dithiothreitol* (DTT) 1 M, dan 1 μ L proteinase K. *Lysis solution* dibuat sebanyak 7 kali volume awal disesuaikan dengan jumlah 6 kali perlakuan preparasi dan 1 tambahan volume awal sebagai toleransi untuk mengantisipasi *error pipetting*. *Lysis solution* harus digunakan dalam bentuk segar dan tidak bisa berasal dari stok.

Ekstraksi DNA menggunakan campuran cacing dewasa *H. contortus* dalam masing-masing perlakuan dengan *lysis solution* untuk menghasilkan *template* DNA yang berbeda. Perlakuan preparasi terdiri atas enam kelompok perlakuan yang telah dirancang sesuai dengan Tabel 1. Selanjutnya dipanaskan menggunakan mesin PCR atau *thermocycler* pada suhu 60°C selama 60 menit, dan pada suhu 95°C selama 10 menit. *Template* DNA dapat digunakan langsung untuk PCR atau disimpan terlebih dahulu pada suhu 4°C.

Primer yang digunakan pada penelitian ini yaitu HcBptuF1 5'-TGTCGAACACGAACTCGTC-3' dan HcBotuR2 5'-TGTGTCTCTACCGCCCGAGT-3' yang merupakan

primer khusus *H. contortus* (Amarante *et al.* 2017). Primer HcBptuF1 dan HcBotuR2 dalam bentuk serbuk perlu dilarutkan sebelum digunakan.

Volume primer yang dibutuhkan pada proses PCR ialah sebanyak 12 µL dengan konsentrasi 10 µM sehingga primer harus diencerkan sebelum digunakan pada proses PCR. Sebanyak 1,2 µL diambil dari primer HcBotuF1 dan diletakkan pada *tube*, selanjutnya primer HcBotuR2 juga diambil 1,2µL dan diletakkan pada *tube* berbeda. Kemudian masing-masing tabung ditambahkan 10,8 µL *Nuclease Free Water* (NFW) untuk mendapatkan primer sebanyak 12 µL dengan konsentrasi 10 µM.

Setelah seluruh bahan komposisi dicampurkan ke dalam *tube* 1,5 mL, sebanyak 27 µL *master mix* dimasukkan ke dalam masing-masing *tube* 0,2 mL kemudian ditambahkan 3 µL ekstraksi DNA dari enam preparasi berbeda ke masing-masing tabung.

Pelaksanaan PCR untuk identifikasi molekuler dilakukan dengan mengamplifikasi DNA. Siklus PCR terdiri atas tahap denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 2 menit, diikuti oleh 40 siklus yang meliputi denaturasi pada 95 °C (15 detik), annealing pada 55 °C (15 detik), dan elongasi pada 72 °C (15 detik), serta tahap final extension pada 72 °C selama 5 menit.

Tabel 1. Desain ekstraksi DNA dan preparasi perlakuan

No	Komponen	Preparasi					
		1	2	3	4	5	6
1	Volume <i>Lysis Solution</i>	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
2	Metode Preparasi	Cacing dewasa jantan dipotong sepanjang 1 mm	Cacing dewasa betina dipotong sepanjang 1 mm	Cacing dewasa jantan digerus	Cacing dewasa betina digerus	Cacing dewasa jantan dipanaskan	Cacing dewasa betina dipanaskan
3	Volume Akuades	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Total volume		20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Master mix PCR dibuat dengan komposisi primer F, primer R, *Nuclease Free Water* (NFW), dan *Taq Polymerase* (Gotaq®). Komposisi *master mix* diuraikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi *Master Mix*

No	Komposisi	Volume (µL)	Total Perlakuan	Total Volume (µL)
1.	Primer F	1,5	7	10,5
2.	Primer R	1,5	7	10,5
3.	<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	9	7	63
4.	<i>Taq Polymerase</i> (Gotaq®)	15	7	105

Hasil dibaca dengan metode elektroforesis menggunakan gel *agarose* 1% dan larutan *buffer* TAE. Tahapan pelaksanaan elektroforesis dilakukan dengan pengaturan tegangan 100 volt selama 25 menit. Hasil elektroforesis diamati pada kondisi ruangan agak gelap dan menyalakan lampu LED pada mesin elektroforesis. Pengamatan dan pengambilan foto bands/pita DNA dilakukan pada menit ke-10, 15, dan 35. Sepuluh menit awal, pertengahan, dan akhir.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil temuan dari koleksi sampel cacing dewasa melalui abomasum domba menunjukkan ukuran cacing yang bervariasi. Identifikasi morfologis menunjukkan karakteristik tubuh yang khas, seperti adanya ulir merah di tubuhnya, vulva flap pada betina, dan bursa kopulatriks pada jantan

yang memudahkan dalam membedakan antara cacing jantan dan betina. Temuan dari koleksi sampel cacing dewasa dengan ciri tersebut mengkonfirmasi bahwa cacing tersebut adalah *Haemonchus contortus* sehingga dapat dilanjutkan ke tahap ekstraksi dan PCR.

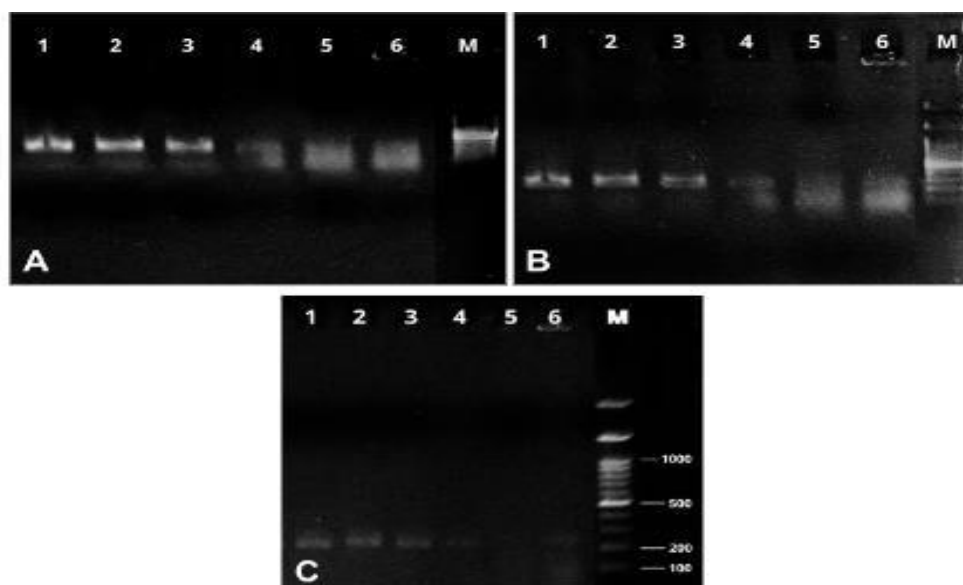
Sebelum proses ekstraksi, masing-masing sampel dipreparasi dengan perlakuan berbeda. Terdapat 6 kelompok perlakuan preparasi yaitu kelompok cacing dewasa jantan dipotong sepanjang 1 mm, cacing dewasa betina dipotong sepanjang 1 mm, cacing dewasa jantan digerus, cacing dewasa betina digerus, cacing dewasa jantan dipanaskan, dan cacing dewasa betina dipanaskan. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan campuran cacing dewasa *H. contortus* dalam masing-masing perlakuan dengan *lysis solution* untuk menghasilkan *template DNA* yang berbeda, kemudian dilanjutkan dengan pelaksanaan PCR. Pelaksanaan PCR dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu denaturasi pada suhu 95° C, tahap *annealing* pada 55°C, dan elongasi pada 72°C dengan masing-masing selama 15 detik dan dalam 40 siklus.

Hasil PCR masing-masing sampel dimasukkan ke dalam sumur gel *agarose* 1% untuk dibaca mesin elektroforesis. Sumur ke-1 berisi hasil PCR sampel cacing dewasa jantan dipotong sepanjang 1 mm, sumur ke-2 berisi hasil PCR sampel cacing dewasa betina dipotong sepanjang 1 mm, sumur ke-3 berisi hasil PCR sampel cacing dewasa jantan digerus, sumur

ke-4 berisi hasil PCR sampel cacing dewasa betina digerus, sumur ke-5 berisi hasil PCR sampel cacing dewasa jantan dipanaskan, sumur ke-6 berisi hasil PCR sampel cacing dewasa betina dipanaskan, dan sumur ke-7 sebagai marker [M].

Berdasarkan hasil elektroforesis yang dilakukan terhadap sampel, terlihat bahwa setiap sampel menunjukkan kejelasan pita DNA yang bervariasi, perbedaan terlihat jelas pada setiap sampel dan waktu pengambilan gambar (Gambar 1). Sumur ke-1, ke-2, dan ke-3 menghasilkan pita yang lebih terang dibanding sumur ke-4, ke-5, dan ke-6 yang menunjukkan hasil pita yang lebih samar pada 10 menit awal elektroforesis dilakukan.

Hasil elektroforesis pada menit ke-15 menampilkan pita DNA yang sama seperti 5 menit sebelumnya, yaitu sumur sampel 1, 2, dan 3 menghasilkan pita yang cukup terang sedangkan pada sumur sampel 4, 5, dan 6 menunjukkan hasil pita yang samar. Sumur sampel 1, 2, dan 3 menunjukkan hasil akhir pita yang masih tampak jelas sedangkan pada sumur sampel 4, 5, dan 6 menunjukkan hasil akhir pita DNA yang sangat samar bahkan hampir menghilang. Seluruh sumur sampel memperoleh pita sejajar yang besarnya 260 bp. Panjang pita ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Amarante *et al.* (2017) dan Kalule *et al.* (2023), yang menggunakan primer yang sama untuk PCR *H. contortus*.



Gambar 1. Pita hasil elektroforesis [A. menit ke-10; B. menit ke-15; C. menit ke-35]

Temuan dari koleksi sampel cacing dewasa yang diambil dari abomasum domba mengonfirmasi bahwa cacing tersebut adalah *Haemonchus contortus*. Cacing ini mudah dikoleksi dan diidentifikasi karena lokasinya yang spesifik di abomasum dan memiliki ukuran tubuh yang besar (Tehrani *et al.* 2024). Bagian anterior *Haemonchus contortus* terdapat gigi atau lanset di rongga mulutnya yang berfungsi untuk membantu melubangi mukosa lambung dan menghisap darah inang (Gareh *et al.* 2021).

Haemonchus contortus betina memiliki ukuran berkisar antara 18-30 mm dan tampak seperti "barber pole" karena memiliki ulir merah dan putih di sepanjang tubuhnya. Warna merah berasal dari usus yang mengandung darah yang dihisap dari inangnya dan warna putih berasal dari ovarium (Asmorowati *et al.* 2021; Tehrani *et al.* 2024). Cacing betina memiliki vulva yang dilapisi oleh vulva flap, struktur ini terletak di 4-6 mm dari posterior tubuhnya (Gareh *et al.* 2021). *Haemonchus contortus* jantan memiliki ukuran berkisar antara 10-20 mm, tubuhnya berwarna coklat kemerahan secara merata, serta memiliki bursa kopulatriks yang terletak di ujung posterior tubuhnya (Das *et al.* 2023).

Pita DNA yang dihasilkan dari proses elektroforesis harus menunjukkan *band* yang terlihat terang, berpendar, tegas, tebal, dan sesuai dengan ukuran target yaitu 260 bp. Hal ini sejalan dengan penelitian Setyawati dan Zubaidah (2021) yang menyatakan bahwa pita DNA yang optimal yaitu tebal, bersih, dan sesuai ukuran target. Penampakan pita DNA dipengaruhi oleh besar dan kecilnya konsentrasi DNA. Konsentrasi DNA yang rendah akan menampakkan pita yang sangat tipis atau bahkan tidak terlihat secara visual, sebaliknya konsentrasi DNA yang sangat tinggi akan menampakkan pita DNA yang sangat tebal sehingga sulit dibedakan jika ingin melihat penampakan pita DNA (Haris *et al.* 2003).

Metode pada penelitian ini berbeda dengan penelitian Amarante *et al.* (2017) dalam pengaturan suhu dan waktu. Pada penelitian tersebut pengaturan siklus amplifikasi PCR, yaitu denaturasi pada 95°C selama 30 detik, annealing pada 59°C selama 40 detik, dan elongasi 72°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus, serta tahap elongasi akhir pada suhu 72°C selama 15 menit sebelum disimpan pada suhu 4°C. Optimalisasi waktu dan suhu *annealing* dari proses amplifikasi sangat mempengaruhi jumlah DNA

template, hal ini dikarenakan suhu *annealing* yang tidak tepat dapat menyebabkan *mispriming* (Yuenleni 2019). Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan ketidakberhasilan amplifikasi DNA sedangkan jika terlalu rendah dapat menyebabkan primer menempel pada tempat yang tidak spesifik (Amanda *et al.* 2019). Pita DNA yang diperoleh dari kedua penelitian menunjukkan hasil yang serupa walaupun dilakukan dengan metode yang sedikit berbeda, yaitu kualitas pita yang sama bagus serta panjang pita sebesar 260 bp.

Hasil elektroforesis pada penelitian ini memvisualisasikan pita DNA dengan ukuran 260 bp serta menunjukkan hasil pendaran yang berbeda-beda, namun secara keseluruhan hasil elektroforesis masih menunjukkan pita DNA yang tipis dan samar. Menurut Yuenleni (2019) ciri hasil PCR dengan *band* yang optimal adalah adanya pita/*band* yang jelas, tidak terdapat *smear* yang terbentuk, serta ukurannya sesuai dengan target DNA yang diinginkan. Hasil PCR juga dapat dikategorikan optimal apabila menghasilkan pita DNA yang tunggal, tebal, serta tidak ada reaksi non-spesifik (Anissa *et al.* 2024).

Berdasarkan perlakuan preparasi yang diberikan, gambaran pita DNA yang paling optimal dihasilkan oleh sumur ke-1, ke-2, dan ke-3 yaitu kelompok perlakuan cacing dewasa jantan yang dipotong sepanjang 1 mm, cacing dewasa betina yang dipotong sepanjang 1 mm, serta cacing dewasa jantan digerus. Sumur ke-4 dengan perlakuan cacing dewasa betina digerus menghasilkan pita DNA yang samar dan tampak menyebar, begitupun dengan perlakuan cacing dewasa jantan dan betina yang dipanaskan pada sumur ke-5 dan ke-6.

Hasil pita yang samar disebabkan karena konsentrasi DNA yang dihasilkan kecil. Menurut Setyawati dan Zubaidah (2021), pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul dapat disebabkan oleh gerakan fisik yang berlebihan dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam *eppendorf*, disentrifus, atau karena temperatur yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu.

Sumur ke-3 dan ke-4 dengan jenis kelamin yang berbeda namun perlakuan yang sama yaitu cacing dewasa yang digerus menunjukkan hasil pendaran pita DNA yang berbeda. Hal tersebut dapat

dipengaruhi oleh perbedaan ketebalan kutikula cacing dewasa jantan dan betina. Kutikula ini terdiri dari tiga lapisan utama yang terbuat dari kolagen dan bahan lainnya. Lapisan luar kutikula tidak berisi sel dan dihasilkan oleh epidermis. Lapisan ini melindungi cacing dari serangan eksternal dan memungkinkan mereka untuk menyerang traktus pencernaan inang (Tak *et al.* 2014).

Cacing dewasa *H. contortus* jantan memiliki panjang berkisar antara 10-20 mm dan lebar 0,1 mm sedangkan cacing dewasa betina memiliki panjang 18-30 mm dan lebar 0,23 mm (Das *et al.* 2023). Berdasarkan ukuran panjang dan lebar tubuhnya, cacing dewasa jantan memiliki struktur kutikula yang lebih tipis dibanding dengan cacing dewasa betina sehingga cacing dewasa jantan lebih mudah untuk terekstraksi.

Sumur ke-1 dan ke-2 dengan perlakuan cacing dewasa betina dan jantan dipotong sepanjang 1 mm merupakan metode paling efisien karena waktu yang digunakan lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Perlakuan sampel yang digerus memerlukan ketelitian yang lebih supaya hasil gerusan cacing dewasa *H. contortus* tidak banyak menempel pada alat penggerusan (mortar), serta perlakuan sampel yang dipanaskan memerlukan waktu tambahan sebanyak 30 menit.

SIMPULAN

Metode preparasi pada sampel cacing dewasa yang dipotong sepanjang 1 mm memberikan hasil PCR yang paling baik dibandingkan metode preparasi lainnya. Metode ini merupakan metode paling efisien karena menggunakan waktu dan tenaga yang paling minimal. Metode ini dapat digunakan untuk mempermudah dalam melakukan proses PCR cacing dewasa *Haemonchus contortus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada manajemen Mitra Tani Farm yang telah memberikan izin untuk pengambilan sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad RZ, Tiffarent R. 2020. Aspek patologi *Haemonchus* pada kambing dan domba. WARTAZOA. 30(2): 91-102.
- Amanda K, Sari R, Apridamayanti P. 2019. Optimasi suhu annealing proses PCR amplifikasi gen shv bakteri *Escherichia coli* pasien ulkus diabetik. Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN. 4(1): 10-16.
- Amarante MRV, Santos MC, Bassetto CC, Amarante AFT. 2017. PCR primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. J Helminthol. 91(6): 757-761.
- Anissa RK, Lisdiana L, Widayanti AT. 2024. Optimasi metode nested PCR untuk deteksi *Vibrio parahaemolyticus* AHPND pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). LenteraBio. 13(1): 1-13.
- Asmorowati RW, Kusnoto, Eliyani H. 2021. Cross reaction of *Haemonchus contortus* protein with *Toxocara vitulorum* anti-L2 serum using western blot technique. World Vet J. 11(3): 504-509.
- Aulia SL, Suwignyo RA, Hasmeda M. 2021. Optimasi suhu annealing untuk amplifikasi DNA padi hasil persilangan varietas tahan terendam dengan metode Polymerase Chain Reaction. Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. 18(1): 44-54.
- Besier RB, Kahn LP, Sargison ND, Van Wyk JA. 2016. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. Adv Parasitol. 93: 95-144.
- Das B, Kumar N, Solanki JB, Jadav MM, Kalyani IH. 2023. Morphological and molecular characterization of *Haemonchus contortus* isolated from the small ruminants of south Gujarat, India. Helminthologia. 60(2): 175-188.

- Gareh A, Elhawary NM, Tahoun A, Ramez AM, Elshewehy DMM, Elbaz E, Khalifa MI, Alsharif KF, Khalifa RMA, Dyab AK, Monib MEM, Arafa MI, Elmahallawy EK. 2021. Epidemiological, morphological, and morphometric study on *Haemonchus* spp. recovered from goats in Egypt. *Front Vet Sci*. 8: 705619.
- Haris N, Hajsial A, Nurita TM, Agus P. 2003. Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) berdasarkan metode Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP). *Menara Perkebunan*. 71(1): 1-5.
- Kalule F, Vudriko P, Nanteza A, Ekiri AB, Alafiatayo R, Betts J, Betson M, Mijten E, Varga G, Cook A. 2023. Prevalence of gastrointestinal parasites and molecular identification of beta-tubulin mutations associated with benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in goats from selected districts of Uganda. *Infect Dis Poverty*. 12: 42.
- Ljungström S, Melville L, Skuce PJ, Höglund J. 2018. Comparison of four diagnostic methods for detection and relative quantification of *Haemonchus contortus* eggs in feces samples. *Front Vet Sci*. 4: 239.
- Mohamed SAA, Dyab AK, Raya-Álvarez E, Abdel-Aziz FM, Osman F, Gareh A, Farag AMM, Salman D, El-Khadragy MF, Bravo-Barriga D, Agil A, Elmahallawy EK. 2024. Molecular identification of *Haemonchus contortus* in sheep from Upper Egypt. *Front Vet Sci*. 10: 1327424.
- Nobre COR, de Matos AFIM, Monteiro JP, de Souza V, Smith WD, Teixeira M. 2020. Benefits of vaccinating goats against *Haemonchus contortus* during gestation and lactation. *Small Rumin Res*. 182: 46-51.
- Setyawati R, Zubaidah S. 2021. Optimasi konsentrasi primer dan suhu annealing dalam mendeteksi gen leptin pada sapi peranakan ongole (PO) menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indones J Lab*. 4(1): 36-40.
- Tak IR, Dar SA, Dar JS, Ganai BA, Chishti MZ, Ahmad F. 2014. A brief study of morphology of *Haemonchus contortus* and its hematophagous behavior. *Glob Vet*. 13(6): 960-965.
- Tehrani MH, Shemshadi B, Shayan P, Shirali S, Panahi N. 2024. PCR-RFLP study on drug resistance of *Haemonchus contortus* to benzimidazole in sheep, north region of Iran. *Bulg J Vet Med*. 27(1): 47-56.
- Yuenleni. 2019. Langkah-langkah optimasi PCR. *Indones J Lab*. 1(3): 51-56.