

## IDENTIFIKASI JENIS LEBAH MADU ASAL KEPULAUAN SULA MENGGUNAKAN APLIKASI DNA BARCODE LCO GEN

Abdu Mas'ud<sup>1\*</sup>, Said Hasan<sup>1</sup>, Sundari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Pendidikan Biologi, Universitas Khairun, Jl Jusuf Abdulrahman Kel. Gambesi, Kota Ternate Selatan, Maluku Utara

<sup>2</sup>Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Khairun, Jl Bandara Babulah, Kel. Akehuda, Kota Ternate Utara, Maluku Utara

\*Corresponding author, e-mail: [abdumasud@unkhair.ac.id](mailto:abdumasud@unkhair.ac.id)

### ABSTRACT

Sanana Honey is a local brand, a type of honey produced by forest bees which is well known in the Sula Islands, North Maluku. The forest bees of the Sula Islands have the potential to be developed as a producer of quality honey. At this time there has been no scientific report regarding the types and characteristics of the forest bee species from the Sula Islands. This study aims to identify the types of honey-producing forest bees by applying the LCO gene DNA barcode. The methods used in this study used: 1) DNA extraction from bee body tissues using the DNA Miniprep Kit procedure (Zymo Research, D6016); 2). DNA amplification by PCR amplification procedure with TOYOBO KOD FX Neo (KFX-201); 3) bidirectional DNA sequencing process (Bi-directional sequencing). The results showed that the specimen was successfully amplified with an amplicon size of 677 bp. Furthermore, the results of BLASTN analysis revealed that the sequence has a 97.78% similarity with the *Apis cerana* mitochondria complete genome gene country of Russia, but is phylogenetically different between the two.

Keywords: *Apis cerana*, Bee, DNA Barcode, LCO, Spesies

### PENDAHULAN

Maluku Utara merupakan wilayah Indonesia yang beriklim tropis dan memiliki keanekaragaman jenis flora dan fauna yang tinggi. Salah satu keanekaragaman fauna yang dimiliki adalah lebah madu. Kepulauan Sula merupakan salah satu sentra penghasil madu yang dikenal dengan nama madu Sanana. Pada saat ini belum ada informasi ilmiah terkait identifikasi dan posisi takson dari jenis lebah madu yang terdapat di kepulauan Sula. Potensi lebah penghasil madu ini perlu mendapatkan perhatian, sehingga perlu adanya identifikasi jenis lebah madu di kepulauan Sula. Beberapa macam spesies lebah madu yang terdapat di Indonesia, yaitu *Apis cerana*, *A. mellifera*, *A. Koschevnikovi*, *A. dorsata*, *A. nigrocincta*, *A. andreniformis* (Nuraini & Purwanto, 2021).

Keanekaragaman genetik dari lebah madu akan memberikan informasi terkait korelasi keanekaragaman dengan potensi pengembangan atau pendayagunaan dari spesies lebah di suatu wilayah (Nuraini & Purwanto, 2021). Informasi terkait keanekaragaman genetik yang tinggi akan menguntungkan bagi pembudidaya lebah, hal ini dikarenakan adanya *profil genetic* dari obyek kajian lebah. Selanjutnya *profil genetic* akan memberikan kontribusi dalam penentuan teknik persilangan antar lebah untuk menghasilkan jenis lebah unggul. Setiap jenis lebah madu memiliki

kemampuan beradaptasi pada perubahan lingkungan yang berbeda sehingga mampu bertahan hidup disuatu wilayah yang berbeda pula. Keanekaragaman genetik lebah madu dapat termanifestasi pada variasi ciri-ciri morfologi lebah. Karakter morfologi lebah dapat memberikan informasi penting untuk menentukan pertumbuhan spesies lebah. Selanjutnya database karakter morfologi juga dapat berkontribusi dengan teknik pengumpulan polen, karena polen bernutrisi tinggi sangat penting bagi pertumbuhan larva dan perkembangan fisiologis lebah pekerja (Keller *et al*, 2005).

Beberapa hasil penelitian tentang keanekaragaman karakter morfologi lebah madu di Palawan Filipina (Tilde, *et al*, 2000), di Bengkulu Indonesia (Novita & Sutriyono, 2013), di Sulawesi Tengah (Nuraini dan Purwanto, 2021) dan Erwan (2003) melaporkan bahwa secara morfologi kapasitas kantung madu tergantung dari ukuran tubuh pada lebah pekerja. Penelitian terkait karakter morfologi lebah madu di kepulauan Sula sejauh ini belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis lebah hutan penghasil madu dari kepulauan Sula dengan aplikasi DNA barcode LCO gen. Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah sebagai database fauna berpotensi untuk budidaya madu di kepulauan Sula berbasis data molekuler.

Aplikasi DNA barcode sebagai teknik molekuler untuk identifikasi spesies umumnya menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) untuk identifikasi hewan, sedangkan DNA kloroplas (cpDNA) untuk identifikasi tumbuhan. Beberapa keunggulan DNA mitokondria diantaranya sangat efisien dengan 93% mewakili wilayah pengkodean (Chinnery & Hudson, 2013), pewarisan secara maternal (Sharma & Sampath, 2019), tingkat mutasi tinggi (Susanti *et al*, 2018), dan replikasi yang berlangsung terus menerus (Muthiadin *et al*, 2018). Pada saat ini DNA mitokondria digunakan secara luas pada studi genetika populasi, identifikasi spesies, identifikasi penyakit, filogeni kedokteran hewan, dan sebagainya (Wibowo *et al*, 2013).

Selanjutnya untuk mengidentifikasi spesies hewan salah satu gen pada DNA mitokondria yang paling populer digunakan adalah gen *Cytochrome c oxidase 1* (CO1). Gen CO1 telah terbukti mengungkap identitas spesies, pola filogeni dan keanekaragaman genetik spesies air (Tan *et al*, 2019). Keberhasilan gen CO1 dalam identifikasi spesies hewan telah ditunjukkan dalam beberapa penelitian identifikasi ikan pari di Australia Barat (Cerutti-Pereyra *et al*, 2012) dan Puckridge *et al* (2013) di Indonesia pasifik bagian barat dan Madduppa *et al* (2016) di Palabuhan Ratu, Muara Saban, dan Lampung. Pada penelitian ini digunakan aplikasi DNA mitokondria LCO untuk identifikasi sampel lebah madu asal Kepulauan Sula Maluku Utara.

## METODE

Sampel lebah madu berasal dari kabupaten Sanana di kepulauan Sula Maluku Utara. Lebah disimpan dan diawetkan dalam etanol absolut. Ekstraksi DNA lebah yang digunakan adalah bagian toraks lebah pekerja. Selanjutnya tahap ekstraksi DNA lebah menggunakan prosedur Genomic DNA extraction with ZR Tissue & Insect DNA Miniprep Kit (Zymo Research, D6016). Tahap amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR amplification with TOYOBO KOD FX Neo (KFX-201) dengan menggunakan primer LCO forward dan reverse spesifik untuk lebah dan kupu-kupu. Tahap sekuensing secara Bi-directional sequencing dan menggunakan jasa 1<sup>st</sup> Base Malaysia.

Data yang diperoleh dianalisis dengan bantuan program komputer, antara lain: analisis Alligment DNA dengan program MEGA 5, BLASTn sekuen DNA sampel dengan urutan DNA yang ada di *GenBank*, pengambilan urutan DNA dari *GenBank*,

dan konstruksi pohon filogenetik Neighbour Joining (NJ) menggunakan program MEGA 5.

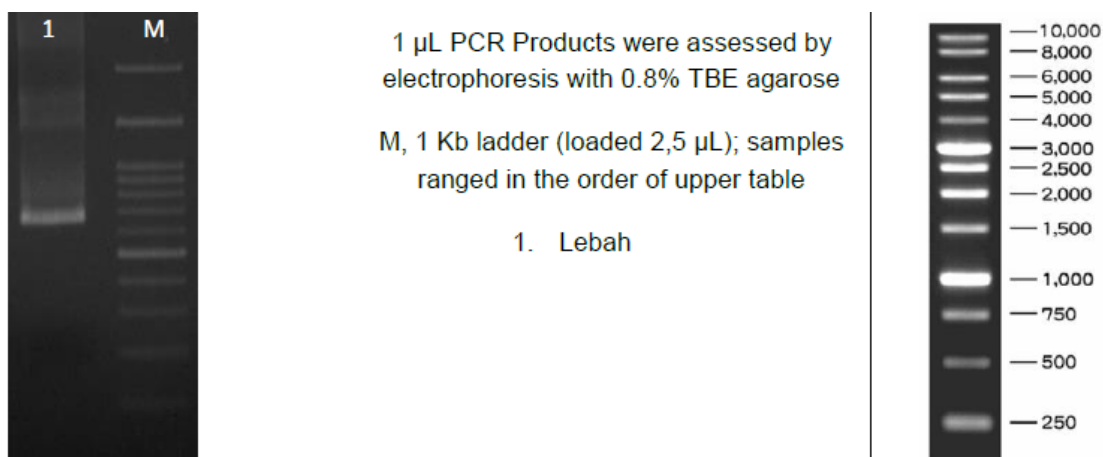
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Data hasil ekstraksi DNA dari sampel lebah madu asal kepulauan Sula seperti pada tabel 1, merupakan produk tahap awal untuk melakukan proses amplifikasi dengan menggunakan PCR. Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh (Tabel 1).

**Tabel 1.** Hasil ekstraksi DNA lebah madu asal kepulauan Sula

No	Sample Name	Conc (ng/ml)	A260/280	A260/230	Volume (microlit)
1	L1	10,9	2,00	0,14	30

Hasil analisis kuantitatif diketahui bahwa dari sampel lebah madu asal kepulauan Sula memiliki konsentrasi DNA yang cukup bagus dengan kemurnian 2,00 mendekati 1,8. Selanjutnya dilakukan amplifikasi DNA dengan menggunakan gen LCO. Hasil amplifikasi gen LCO dan elektroforesis dari sampel lebah madu asal kepulauan Sula dideskripsikan pada Gambar 1.

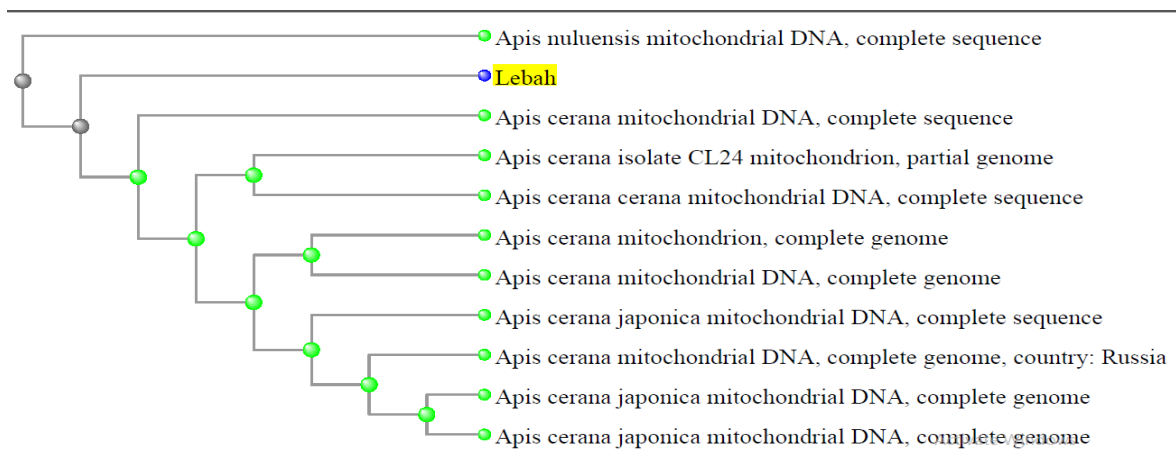


**Gambar 1.** Elektrogram Hasil amplifikasi gen LCO Sampel Lebah Madu asal kepulauan Sula

Hasil amplifikasi gen LCO menunjukkan pita DNA dengan ukuran  $\pm$  700 bp. Selanjutnya dilakukan analisis penelusuran BLASTn (NCBI genebank) diketahui bahwa sampel lebah madu asal kepulauan Sula memiliki nilai identik dengan *Apis cerana* mitochondria complete genom country Rusia dengan nilai identik 97,78%. Data hasil analisis kemiripan (BLASTn) dari sampel lebah madu Sanana seperti pada gambar 2. Selanjutnya untuk mengetahui posisi takson dan nama spesies dari sampel lebah madu asal kepulauan Sula maka selanjutnya dilakukan analisis filogenetik dengan program MEGA 5 dari sampel dan dibandingkan dengan data dari genebank hasil penelusuran BLASTn di NCBI. Dari analisis filogenetik ini dapat diketahui posisi takson dari sampel lebah madu asal kepulauan Sula. Data hasil analisis kekerabatan (filogenetik) dari sampel lebah madu asal kepulauan Sula seperti pada gambar 3.

Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana mitochondrial DNA, complete genome, country: Russia</a>	<a href="#">Asiatic honeybee</a>	1168	1168	100%	0.0	97.78%	15919	<a href="#">AP018450.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Asiatic honeybee</a>	1162	1162	100%	0.0	97.64%	15904	<a href="#">KX908206.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana japonica mitochondrial DNA, complete sequence</a>	<a href="#">Apis cerana ja...</a>	1162	1162	100%	0.0	97.64%	15339	<a href="#">AP017985.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana japonica mitochondrial DNA, complete genome</a>	<a href="#">Apis cerana ja...</a>	1162	1162	100%	0.0	97.64%	15788	<a href="#">AP017941.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana japonica mitochondrial DNA, complete genome</a>	<a href="#">Apis cerana ja...</a>	1162	1162	100%	0.0	97.64%	15917	<a href="#">AP017314.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana mitochondrial DNA, complete genome</a>	<a href="#">Asiatic honeybee</a>	1157	1157	100%	0.0	97.49%	15925	<a href="#">AP018431.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana isolate CL24 mitochondrion, partial genome</a>	<a href="#">Asiatic honeybee</a>	1157	1157	100%	0.0	97.49%	15712	<a href="#">KM244704.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana cerana mitochondrial DNA, complete sequence</a>	<a href="#">Apis cerana ce...</a>	1146	1146	100%	0.0	97.19%	15460	<a href="#">AP017983.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis cerana mitochondrial DNA, complete sequence</a>	<a href="#">Asiatic honeybee</a>	1123	1123	100%	0.0	96.60%	15376	<a href="#">AP017984.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Apis nuluensis mitochondrial DNA, complete sequence</a>	<a href="#">Apis nuluensis</a>	1068	1068	100%	0.0	95.13%	15921	<a href="#">AP018157.1</a>

**Gambar 2.** Hasil BLASTn Sampel Lebah Madu asal kepulauan Sula dibandingkan dengan 10 Spesies terdata di NCBI



**Gambar 3.** Filogenetik analisis Lebah madu asal kepulauan Sula

Hasil analisis filogenetik dengan metode Neighbour Joining (NJ) dari sampel lebah madu asal kepulauan Sula diketahui memiliki posisi takson satu cluster dengan *Apis cerana* dan berbeda sub kluster dengan spesies *Apis cerana* mitochondria complete genom country Rusia, namun hasil analisis BLASTn menunjukkan nilai identik tertinggi yaitu sebesar 97,78%. Hal ini dapat dikatakan bahwa lebah madu asal kepulauan Sula satu spesies dengan *Apis cerana*, namun untuk karakteristik khusus karakter morfologi dan molekuler masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut. Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa aplikasi DNA barcode gen LCO untuk identifikasi spesies lebah madu dapat memberikan informasi terkait prediksi nama spesies berdasarkan nilai kemiripan (*identically*) sampel dibandingkan data base di NCBI.

Berdasarkan uraian di atas diketahui bahwa hasil Analisis BLASTn berdasarkan urutan nukleotida dari gen LCO sampel lebah madu Sanana memiliki kemiripan 97,78% dengan *Apis cerana* dengan posisi takson yang tidak satu node. Hal ini dapat diprediksi bahwa Sampel lebah madu Sanana memiliki kemiripan dengan *Apis cerana* namun dapat diprediksi bahwa sampel tersebut bukan *Apis cerana*.

Hasil analisis filogenetik dengan program MEGA 5 dan menggunakan metode Neighbour Joining (NJ) dapat menggambarkan kejelasan identifikasi suatu spesies, pada umumnya perbedaannya dibatasi oleh suatu *node* dan kluster. Sampel lebah madu sanana tidak terletak pada satu node dengan *Apis cerana* NCBI. Pada pohon filogenetik suatu spesies dari daerah yang berbeda dapat secara bersama-sama berada pada kluster yang sama (Che *et al.* 2012).

Berdasarkan hasil analisis di atas diketahui bahwa analisis BLASTn dan Filogenetik menghasilkan identifikasi yang sama pada level genus *Apis* sp. Analisis kekerabatan dalam penelitian ini menggunakan gen mitokondria LCO. Hal ini dilakukan karena gen mitokondria memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan gen lain dalam proses analisisnya, terutama pada ordo Hymenoptera. Hal ini didukung oleh pernyataan Whitfield dan Cameron *dalam* Nuraini & Purwanto (2021) bahwa gen mitokondria merupakan gen yang paling informatif untuk analisis filogenetik antara spesies atau populasi yang berkerabat dekat, antar suku, subfamili dan famili.

Penggunaan gen LCO juga dapat memberikan solusi terhadap permasalahan morfologi yang muncul seperti *cryptic species* dan *sibling species*. Selain itu, pemilihan gen mitokondria 16S rRNA dan CO1 pada penelitian ini didasarkan pada jumlah database lebah *Apis* yang tersedia di website NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pada data NCBI sekuens spesies lebah *Apis* sebagian besar menggunakan gen 16S rRNA dan CO1 dibandingkan dengan gen lain, sehingga dapat digunakan sebagai sumber data untuk analisis atau perbandingan sekuens pada penelitian ini

## **SIMPULAN**

Aplikasi DNA barcode gen mitokondria LCO untuk identifikasi spesies lebah madu asal kepulauan Sula pada penelitian ini memberikan informasi bahwa lebah madu asal kepulauan Sula memiliki kemiripan dengan *Apis cerana*, namun posisi takson dalam analisis filogenetik menunjukkan bahwa spesies lebah madu asal kepulauan Sula berbeda sub kluster dengan *Apis cerana*. Efektifitas gen mitokondria LCO untuk identifikasi spesies lebah pada level genus yaitu *Apis* sp. Saran dan rekomendasi perlu konfirmasi penggunaan primer 16S rRNA untuk memastikan identifikasi pada tingkat spesies.

## **UCAPAN TERIMAKASIH**

Ucapan terimakasih kepada LPPM Universitas Khairun Ternate yang telah memberikan Dana Hibah penelitian Pasca Sarjana tahun anggaran 2021.

## **REFERENSI**

- Cerutti-Pereyra, F., Meekan, M. G., Wei, N. W. V., O'Shea, O., Bradshaw, C. J., & Austin, C. M. (2012). Identification of rays through DNA barcoding: an application for ecologists. *PLoS One*, 7(6), e36479.
- Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial Genetics. *British Medical Bulletin*, 106(1), 135-159.
- Che, J, Chen HM, Yang JX, Jin JQ, Jiang K, Yuan ZY, Murphy RW, dan Zhang YP. (2012). Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Mol Ecol Res*, 12, 247-258. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03090.x.
- Erwan. (2003). Pemanfaatan Nira Aren dan Nira Kelapa serta Polen Aren sebagai Pakan Lebah untuk Meningkatkan Produksi Madu *Apis cerana*. [Tesis]. Program Pascasarjana. Bogor: Institut Pertanian Bogor.



- Keller, I., P. Fluri., and A. Imdorf. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees-part II. *Bee World*, 86 (2), 27- 34. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11099650>.
- Madduppa, H., Ayuningtyas, R. U., Subhan, B., & Arafat, D. (2016). Exploited but unevaluated: DNA barcoding reveals skates and stingrays (Chordata, Chondrichthyes) species landed in the Indonesian fish market. *Indon J Mar Sci*, 21(2), 77-84.
- Muthiadin, C., Aziz, I. R., & Darajat, A. Z. (2018). DNA Mitokondria Untuk Identifikasi Ikan yang Kaya Spesies. In *Prosiding Seminar Biologi*.
- Novita, R. S. & Sutriyono. (2013). Analisis morfometrik lebah madu pekerja *Apis cerana* budidaya pada dua ketinggian tempat yang berbeda. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia* 8: 41- 56. <https://doi.org/10.31186/jspi.id.8.1.41-56>
- Nuraini & Purwanto, H. (2021). Morphology, morphometrics, and molecular characteristics of *Apis cerana* and *Apis nigrocincta* from Central Sulawesi, Indonesia *Jurnal Biologi Tropis*, 21(2), 368–382. DOI: <http://dx.doi.org/10.29303/jbt.v21i2.2614>
- Puckridge, M., P.R. Last, W.T. White & N. Andreakis. (2013). Phylogeography of the Indo-West Pacific maskrays (Dasyatidae, Neotrygon): A complex example of chondrichthyan radiation in the Cenozoic. *Jurnal Ecology*, 3, 21–32.
- Sharma, P., & Sampath, H. (2019). Mitochondrial DNA integrity: role in health and disease. *Cells*, 8(2), 100.
- Tilde, A.C., S. Fuchs., N. Koeniger., and C. R. Cervancia. (2000). Morphometric diversity of *Apis cerana* Fabr. within the Philippines. *Apidologie*, 31, 249–264.
- Wibowo, S. E., Djaelani, M. A., & Kusumaningrum, H. P. (2013). Pelacakan Gen Sitokrom Oksidase Sub Unit I (COI) DNA Mitokondria Itik Tegal (*Anas domesticus*) Menggunakan Primer Universal. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 15(1), 20-26.
- Susanti, R., Iswari, R. S., Fibriana, F., & Indriawati, I. (2018). The duck cytochrome oxidase I (CO1) gene: Sequence and patterns analysis for potential barcoding tool. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 19(3), 997-1003.
- Tan, M. P., Amornsakun, T., Siti Azizah, M. N., Habib, A., Sung, Y. Y., & Danish-Daniel, M. (2019). Hidden genetic diversity in snakeskin gourami, *Trichopodus pectoralis* (Perciformes, Osphronemidae), inferred from the mitoch. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 2966–2969. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1662741>