

**ANALISIS mtDNA BERDASARKAN PROFIL GEN 16S rRNA PADA
LEBAH TANPA SENGAT (*Stingless bee*) DI KABUPATEN
LAMPUNG TIMUR**

(Skripsi)

Oleh

Aulia Imtitsal

2017021079



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS LAMPUNG

2024

ABSTRAK

ANALISIS mtDNA BERDASARKAN PROFIL GEN 16S rRNA PADA LEBAH TANPA SENGAT (*Stingless bee*) di KABUPATEN LAMPUNG TIMUR

Oleh

Aulia Imtitsal

Lebah tanpa sengat memiliki lebih dari 600 spesies di seluruh dunia. Distribusi wilayah persebaran lebah tanpa sengat di dunia dibagi menjadi 3, yaitu Neotropical, Afrotropical, dan Australasian. Sebanyak 46 spesies dalam 10 genus lebah tanpa sengat yang telah tercatat dari Indonesia, sebanyak 23 jenis lebah tanpa sengat ditemukan di Sumatera. Keragaman lebah tanpa sengat dan hubungan kekerabatan dapat diketahui dengan melakukan identifikasi morfologi. Penggunaan analisis morfologi memiliki kelemahan seperti rendahnya nilai konsistensi yang menunjukkan hubungan filogenetik pada tingkat variasi spesies. Analisis filogenetik penting dilakukan untuk mengetahui berbagai keragaman lebah tanpa sengat yang dapat menjadi salah satu upaya konservasi lebah tanpa sengat di Kabupaten Lampung Timur, sehingga perlu dilakukan analisis molekuler keragaman lebah tanpa sengat menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) pada lebah. Gen 16S rRNA merupakan gen penyandi mtDNA yang paling informatif untuk filogenetik terutama pada ordo Hymenoptera. Penelitian ini bertujuan untuk deteksi keragaman spesies lebah tanpa sengat secara molekuler dengan profil gen 16S rRNA di Kabupaten Lampung Timur. Metode yang digunakan adalah isolasi DNA, amplifikasi gen DNA, elektroforesis dan visualisasi, sekuensing serta analisis hasil sekuensing dengan perangkat lunak menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan konstruksi pohon filogenetik menggunakan *Molecular Evolution Genetic Analysis* (MEGA11) dengan metode *maximum likelihood* serta metode *bootstrap* sebanyak 1000 pengulangan. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa ketiga sampel lebah tanpa sengat memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan spesies *Heterotrigona itama* dengan nilai jarak genetik 0,0176 dengan homologi 97,95% menunjukkan tingkat keragaman genetic yang rendah.

Kata kunci: Lebah tanpa sengat, Analisis Molekuler, Gen 16S rRNA, Filogenetik.

ABSTRACT

mtDNA ANALYSIS BASED ON 16S rRNA GEN PROFILE OF STINGLESS BEES IN EAST LAMPUNG DISTRICT

By

Aulia Imtitsal

*Stingless bees have more than 600 species worldwide. The distribution area of stingless bees in the world is divided into 3, Neotropical, Afrotropical, and Australasian. A total of 46 species in 10 genus of stingless bees have been recorded in Indonesia, 23 species of stingless bees were found in Sumatra. The diversity of stingless bees and the kinship of each group of bees known by conducting morphological identification. However, the use of morphological characteristic has shortcomings such as low consistency values for phylogenetic relationships at the species variation level. Phylogenetic analysis is important to determine the diversity of stingless bees which can be one of the conservation efforts of stingless bees in East Lampung. It is necessary to conduct molecular analysis of stingless bee diversity using mitochondrial DNA (mtDNA) in bees. The 16S rRNA gene is the most informative mtDNA encoding gene for phylogenetics, especially in the order Hymenoptera. This study aims to detect the diversity of stingless bee species molecularly with 16S rRNA gene profiles in East Lampung Regency. The methods used were DNA isolation, DNA gene amplification, electrophoresis and visualization, sequencing and analysis of sequencing results with software using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and phylogenetic tree construction using Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA 11) with the maximum like lihood method and the boots method. Based on the research that has been done, the results show that the three stingless bee samples have a close kinship with the *Heterotrigona itama* species with a genetic distance value of 0.0176 with 97.95% homology showing a low level of genetic diversity.*

Keywords: *Stingless bee, Molecular Analysis, 16S rRNA gene, Phylogenetic.*

**ANALISIS mtDNA BERDASARKAN PROFIL GEN 16S rRNA PADA
LEBAH TANPA SENGAT (*Stingless bee*) DI KABUPATEN
LAMPUNG TIMUR**

**Oleh
Aulia Imtitsal**

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar SARJANA SAINS

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG**

2024

HALAMAN PENGESAHAN

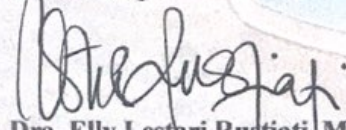
Judul Skripsi : Analisis mtDNA Berdasarkan Profil Gen
16S rRNA Pada Lebah Tanpa Sengat
(*Stingless bee*) di Kabupaten Lampung
Timur.

Nama Mahasiswa : Aulia Intisaf
NPM : 2017021079
Program Studi : S1 Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Bandar Lampung, 15 Juli 2024

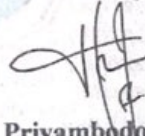
MENYETUJUI,
Komisi Pembimbing

Pembimbing I



Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc.
NIP 196310141989022001

Pembimbing II



Priyambodo, S.Pd., M.Sc.
NIP 198611142015041003

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

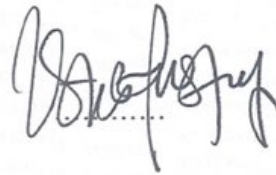


Dr. Jani Masler, S.Si., M.Si
NIP 198301312008121001

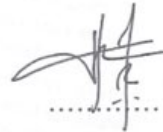
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

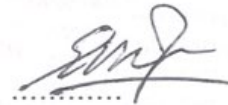
Ketua : **Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc.**



Anggota : **Priyambodo, S.Pd., M.Sc.**



Penguji Utama: **Dra. Eti Ernawati, M.P.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **28 Juni 2024**

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Aulia Imtitsal
NPM : 2017021079
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya berjudul.

“Analisis mtDNA Berdasarkan Profil Gen 16S rRNA Pada Lebah Tanpa Sengat (*Stingless bee*) di Kabupaten Lampung Timur”

Adalah benar karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku. Saya juga tidak keberatan apabila sebagian atau seluruh data pada skripsi ini digunakan oleh dosen dan/atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan.

Jika kemudian hari terbukti pernyataan saya tidak benar, saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar sarjana maupun tuntutan hukum.

Bandar Lampung, 15 Juli 2024

Yang menandatangani


FCALX238914601
Aulia Imtitsal
NPM. 2017021079

RIWAYAT HIDUP

Aulia Imtitsal atau akrab disapa Aul, lahir di Metro, 21 September 2002. Penulis merupakan anak pertama dari tiga bersaudara. Penulis merupakan putri dari



pasangan Bapak Japarudin dan Ibu Hayani. Penulis menempuh pendidikan di SDIT Wahdatul Ummah Metro pada tahun 2008 hingga 2014, SMPIT Insan Mulia pada tahun 2014 hingga 2017, MAN 1 Metro pada tahun 2017 hingga 2020, kemudian penulis melanjutkan pendidikan di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Selain mengikuti kegiatan perkuliahan,

penulis juga mempunyai berbagai pengalaman baik di bidang akademik maupun bidang non-akademik selama masa perkuliahan. Selama mengemban pendidikan akademik, penulis pernah menjadi asisten Praktikum Teknik Biologi Molekuler.

Dalam bidang non akademik, penulis aktif dalam berbagai organisasi dan kepanitiaan yang ada di kampus terutama di tingkat Himpunan Jurusan. Penulis menjadi anggota aktif bidang Kaderisasi Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) pada tahun 2020 hingga 2022 dan pernah diamanahkan menjadi Sekretaris Koordinator Divisi Pameran Konservasi pada acara tahunan HIMBIO yaitu Pekan Konservasi Sumber Daya Alam (PKSDA). Selain itu, pada tingkat Universitas penulis juga menjadi Wakil Ketua Dewan Perwakilan Mahasiswa (DPM) Universitas Lampung pada bulan Januari hingga Desember tahun 2023, penulis juga diamanahkan menjadi Staff Ahli di Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA, dan penulis pernah menjadi Anggota Divisi pada Panitia Khusus (Pansus) PEMIRA Universitas Lampung pada 2022.

Selain itu, penulis juga mengikuti kegiatan *Magang merdeka*, Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) dalam program magang Management Biodiversitas Tropis pada posisi Pengelola Biodiversitas Tropis di SEAMEO BIOTROP dan penulis juga mengikuti beberapa kegiatan volunteer di bidang pendidikan yang di selenggarakan oleh AIESEC Universitas Lampung selama masa perkuliahan.

Pada tanggal 4 Januari 2023 hingga 12 Februari 2023 penulis melaksanakan kegiatan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Balai Karantina Ikan dengan judul **“Deteksi *Necrotizing Hepatopancreatitis* (NHP) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Laboratorium Penguji Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Lampung”** dan pada tanggal 26 Juli 2023 hingga 4 Agustus 2023, penulis melaksanakan kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Karang Tengah, Kecamatan Tebat Karai, Kabupaten Kepahiang, Bengkulu. Pada Agustus 2023 hingga Juni 2024, penulis menyusun skripsi dengan judul **“Analisis mtDNA Berdasarkan Profil Gen 16S rRNA Pada Lebah Tanpa Sengat (*Stingless bee*) di Kabupaten Lampung Timur”**.

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

***Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT,
kupersembahkan hasil karyaku dengan penuh kasih dan sayang
kepada:***

***Mama, Ayah, Adik dan keluargaku yang selalu memberikan cinta,
kasih sayang, dan semangat serta senantiasa mendoakan di setiap aku
melangkah.***

***Bapak dan Ibu dosen pembimbing yang telah membimbing dan
mengarahkan dengan sangat sabar.***

***Sahabat dan teman seperjuangan yang senantiasa berjuang dan
saling memberikan dukungan serta semangat antara satu dengan
yang lainnya.***

***Harapannya hasil karyaku menjadi bermanfaat untuk orang lain
terkhusus di dalam dunia konservasi dan molekuler walaupun hanya
sebesar butir pasir.***

Almamater Tercinta, Universitas Lampung

MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”.
(Q.S. Al-Insyirah: 6)

“Ilmu adalah kehidupan bagi pikiran”.

Abu Bakar

“A busy life makes prayer harder, but prayer makes a busy life easier”.

“Education is the most powerful weapon which you can use to change the world”.

Nelson Mandela

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim ...

Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh ...

Alhamdulillahirrabil'alamin ...

Puji syukur penulis haturkan atas kehadiran Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa, karena limpahan rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi sebagai syarat meraih gelar Sarjana Sains.

Skripsi yang berjudul “**Analisis mtDNA Berdasarkan Profil Gen 16S rRNA Pada Lebah Tanpa Sengat (*Stingless bee*) di Kabupaten Lampung Timur**” telah dilaksanakan pada bulan November 2023 – Juni 2024, bekerja sama dengan Balai Veteriner Lampung.

Penulis sadar bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak pihak yang sangat membantu dan mendukung dalam pelaksanaan penelitian hingga penyusunan skripsi. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orangtua tersayang, Mama Hayani dan Ayah Japarudin, yang telah memberikan kasih sayang, perhatian, dukungan serta doa yang tiada henti- hentinya dalam proses pendidikan hingga proses penyusunan skripsi.
2. Ibu Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing I, yang telah sabar membimbing, mendukung serta memberikan ilmu

pengetahuan dan pembelajaran selama proses penelitian dan penyusunan skripsi hingga selesai. Penulis mengucapkan banyak terima kasih karena telah menjadi lebih dari seorang pembimbing skripsi, melainkan menjadi orangtua dan guru.

3. Bapak Priyambodo, S.Pd., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing II, yang turut membimbing dan memberikan arahan, saran, serta masukan kepada penulis dalam proses penyusunan skripsi hingga selesai. Penulis mengucapkan banyak terima kasih karena telah menjadi lebih dari seorang pembimbing skripsi, melainkan menjadi orangtua dan guru.
4. Ibu Dra. Eti Ernawati, M.P. selaku dosen pembahas yang selalu sabar memberikan arahan, nasihat dan bimbingan kepada penulis baik selama perkuliahan maupun proses penelitian dan penyusunan skripsi.
5. Bapak drh. Suryantana, M.Si., selaku Kepala Balai Veteriner Lampung.
6. Ibu drh. Enny Saswiyanti, M.Si., dan Bapak drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc., atas bantuan serta arahannya selama melakukan penelitian di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung.
7. Dian Neli Pratiwi, S.Si., M.Ling., dan Alvin Wiwiet Susanto, S.Si., selaku kakak sekaligus mentor yang sangat membantu dan membimbing penulis dalam melakukan penelitian dan menyusun skripsi.
8. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
9. Ibu Dr. Kusuma Handayani, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi S1, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
10. Bapak Dr. Eng. Heri Satria., S.Si., M.Si., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
11. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., IPM., ASEAN Eng., selaku Rektor Universitas Lampung.
12. Bapak Prof. Dr. Sumardi, M.Si. selaku dosen Pembimbing Akademik.
13. Bapak dan Ibu dosen serta staf Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.

14. Kepada Hana Ashma Nada dan Tiara Maysha, selaku *partner* yang telah membantu dan memberikan dukungan penuh kepada penulis baik suka maupun duka dalam menyusun skripsi.
15. Kepada teman penulis Menti Manda Utama, Berta Yolanda Sari, dan Salsabilla Fitria Adna yang telah membantu penulis di dalam perkuliahan dan di luar perkuliahan.
16. Kepada teman seperjuangan penulis Andriyani Wijaya Kusuma, Muhammad Febriansyah, dan Aditya Fahrezi, yang telah berjuang bersama dalam menyelesaikan skripsi ini.
17. Kepada teman – teman Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung angkatan 2020 yang tidak dapat disebutkan satu per satu karena telah menjadi bagian dari cerita yang akan selalu dikenang oleh penulis ketika penulis masih mengemban pendidikan di dunia perkuliahan.

Penulis masih menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diperlukan dalam penyusunan karya tulis ilmiah yang akan ditulis di kemudian hari.

Bandar Lampung, 15 Juli 2024
Penulis

Aulia Imtitsal

DAFTAR ISI

	Halaman
COVER	i
ABSTRAK	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan.....	3
1.3. Kerangka Teoritis	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Lebah Tanpa Sengat (<i>Stingless bee</i>).....	6
2.1.1. Klasifikasi dan ciri umum lebah tanpa sengat.....	6
2.1.2. Distribusi dan Perilaku	7
2.1.3 Peran dan Status Ekologi	9
2.2 DNA (<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>)).	10
2.3 Analisis DNA Mitokondria	10
2.4 Gen 16S rRNA.	12
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	13
2.6 Analisis Filogenetik.	13
III. METODE PENELITIAN.....	15
3.1. Pelaksanaan Penelitian	15
3.2. Alat dan Bahan	15
3.3. Rancangan Penelitian	16
3.4. Pelaksanaan	16

3.4.1. Pengambilan Sampel.....	16
3.4.2. Preparasi Sampel	17
3.4.3. Isolasi DNA.....	18
3.4.4. Amplifikasi DNA	20
3.4.5. Elektroforesis	21
3.4.6. Sekuensing	22
3.5. Analisis Data	23
3.5.1. Uji BLAST	23
3.5.2. Pensejajaran Sekuen Gen	24
3.5.3 Analisis Jarak Genetik.....	24
3.5.4. Membuat Konstruksi Peta Filogenetik.....	24
3.6. Bagan Alir Penelitian	25
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1 Deteksi sampel lebah tanpa sengat di Kabupaten Lampung Timur.	26
4.2 Konstruksi Peta Filogenetik.	35
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi reagen untuk amplifikasi gen 16S rRNA.....	20
2. Urutan basa nitrogen primer gen 16S rRNA.....	21
3. Hasil uji blast lebah tanpa sengat	34
4. Informasi sekuen pembandingan dari <i>Genebank</i>	36
5. Hasil urutan basa nitrogen 1-48	37
6. Hasil urutan basa nitrogen 49-96	37
7. Hasil urutan basa nitrogen 97-144	37
8. Hasil urutan basa nitrogen 145-192	38
9. Hasil urutan basa nitrogen 193-240	38
10. Hasil urutan basa nitrogen 241-288	38
11. Hasil urutan basa nitrogen 289-336	39
12. Hasil urutan basa nitrogen 337-384	39
13. Hasil urutan basa nitrogen 338-405	39
14. Komposisi basa nitrogen	40
15. Jarak genetik dan homologi lebah tanpa sengat	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Lebah Tanpa Sengat	6
2. Bagan alir penelitian	25
3. Proses koleksi sampel lebah tanpa sengat	26
4. Sampel lebah tanpa sengat	27
5. Proses isolasi DNA sampel lebah tanpa sengat	28
6. Hasil elektroforesis lebah tanpa sengat secara sederhana	29
7. Hasil elektroforesis lebah tanpa sengat secara molekuler	30
8. Elektroforegram gen 16S rRNA sampel 1 <i>forward</i>	31
9. Elektroforegram gen 16S rRNA sampel 1 <i>reverse</i>	32
10. Elektroforegram gen 16S rRNA sampel 2 <i>forward</i>	32
11. Elektroforegram gen 16S rRNA sampel 2 <i>reverse</i>	33
12. Elektroforegram gen 16S rRNA sampel 3 <i>forward</i>	33
13. Elektroforegram gen 16S rRNA sampel 3 <i>reverse</i>	34
14. Konstruksi peta filogenetik hasil gen 16S rRNA lebah tanpa sengat	42

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman makhluk hidup dipengaruhi oleh perbedaan kecepatan spesiasi, tingkat kepunahan, dan migrasi yang terjadi di suatu tempat. Keanekaragaman hayati yang dimiliki Indonesia meliputi keanekaragaman gen, spesies, dan makhluk hidup termasuk tumbuhan dan hewan yang tersebar di seluruh wilayah Indonesia. Salah satu manfaat memiliki keanekaragaman hayati yang beragam yaitu dapat menjadi alternatif untuk meningkatkan kesejahteraan dan kemakmuran bangsa Indonesia (Harjanto dkk., 2020).

Salah satu keanekaragaman hayati yang dimiliki Indonesia yaitu spesies lebah yang tersebar di Indonesia. Jenis lebah terdiri dalam dua kelompok yaitu lebah bersengat dan lebah tanpa sengat. Lebah tanpa sengat memiliki banyak keunggulan dibandingkan dengan lebah bersengat. Salah satu keunggulan yang dimiliki lebah tanpa sengat yaitu menghasilkan propolis yang telah menunjukkan aktivitas antioksidan, antimikroba, antikanker dan khasiat lainnya (Toledo *et al.*, 2022). Nama lebah tanpa sengat yang umum digunakan seperti kelulut (Riau dan Sumatera Selatan), galo-galo (Sumatera Barat), teuweul (Jawa Barat dan Banten), klanceng (Jawa), dan emuk (Sulawesi Selatan) (Janra dkk., 2020).

Lebah tanpa sengat memiliki lebih dari 600 spesies di seluruh dunia. Distribusi wilayah persebaran lebah tanpa sengat di dunia dibagi menjadi 3, yaitu Neotropical, Afrotropical, dan Australasian. Lebah tanpa sengat yang

telah tercatat dari Indonesia sebanyak 46 spesies dalam 10 genus dan 23 jenis lebah tanpa sengat ditemukan di Sumatera (Azizi dkk., 2020).

Keragaman lebah tanpa sengat dan hubungan kekerabatan masing-masing kelompok lebah tanpa sengat dapat diketahui dengan melakukan identifikasi morfologi. Analisis secara morfologi digunakan untuk mengetahui keanekaragaman suatu spesies dengan mengamati ciri-ciri tubuh yang dimiliki hewan. Data morfologi dapat digunakan untuk menjelaskan perbedaan dan persamaan antar populasi dan menggambarkan kekerabatan morfologi populasi (Efin dkk., 2019). Penggunaan data morfologi memiliki kekurangan seperti rendahnya nilai konsistensi yang menunjukkan hubungan filogenetik pada tingkat variasi spesies, sehingga perlu dibandingkan dengan data molekuler untuk mendapatkan hasil yang maksimal (Trianto dan Purwanto, 2020).

Genetika molekuler berguna sebagai ilmu dan alat untuk melakukan identifikasi dalam kegiatan konservasi seperti menentukan spesies dan subspecies dan menentukan kelangsungan populasi. Semua informasi memiliki aplikasi dalam konservasi. Genetika molekuler telah dimanfaatkan untuk memberikan rekomendasi konservasi pada tingkat gen, spesies, dan ekosistem yang selalu berubah (Tammu, 2018).

Analisis molekuler keragaman lebah tanpa sengat dapat menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) lebah. DNA mitokondria bersifat khusus yaitu diturunkan melalui induk betina tanpa mengalami rekombinasi. Pada lebah, semua keturunan dari ratu yang sama membawa DNA mitokondria yang sama sehingga individu-individu hibrid yang ada tidak membawa mtDNA parental, Hibrid tersebut hanya mengandung mtDNA dari induk betinanya. Keunikan sistem penurunan yang menarik ini telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang yaitu penentuan hubungan kekerabatan, studi evolusi dan migrasi global manusia modern, bidang forensik dan identifikasi penyakit genetik (Ratnayani dkk., 2007). Salah satu gen penanda yang berasal dari DNA mitokondria yaitu gen 16S rRNA.

Analisis molekuler menggunakan gen 16S rRNA telah terbukti berhasil dalam studi filogenetik lebah, dan keluarannya berupa data pohon filogenetik (Rasmussen dan Cameron, 2007). Pada penelitian Baharuddin dkk. (2014) telah dilakukan konfirmasi spesies pada *Trigona sp.* di Malaysia dengan menggunakan gen rRNA mitokondria 16S parsial. Gen 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini memiliki perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies (Pangastuti, 2006).

Studi keragaman genetik menggunakan DNA mitokondria dapat menghasilkan konstruksi filogenik dari spesies yang saling berdekatan. DNA mitokondria memiliki hanya sifat khusus dan positif yang dapat dijadikan sebagai penanda variasi genetik sehingga besar sekali manfaatnya untuk studi keragaman genetik. Whitfield dan Cameron (1998) mendukung bahwa gen 16S rRNA mitokondria memiliki keunggulan sebagai gen yang paling informatif untuk filogenetik analisis antara spesies atau populasi yang berkerabat dekat. Beberapa penelitian deteksi spesies lebah tanpa sengat menggunakan gen 16S rRNA telah dilakukan di Indonesia yaitu di Taman Nasional Halimun Salak, Jawa Barat (Pratama dkk., 2023) dan Yogyakarta (Purwanto dan Trianto, 2020), tetapi belum tercatat adanya penelitian tentang keragaman genetik lebah tanpa sengat di Kabupaten Lampung Timur.

1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui spesies lebah tanpa sengat secara molekuler berdasarkan profil gen 16S rRNA di Kabupaten Lampung Timur.
2. Mengetahui kekerabatan spesies lebah tanpa sengat dengan melakukan konstruksi peta filogenetik.

1.3 Kerangka Teoritis

Lebah masuk dalam kelompok Apideae dan memiliki 3 subfamili yaitu Apinae (lebah madu), Bombiinae (lebah tukang kayu) dan Meliponinae (lebah tanpa sengat). Dalam klasifikasi dunia serangga lebah ke dalam ordo Himenoptera yang artinya “sayap bening”. Lebah madu dibagi menjadi dua kelompok, yaitu lebah bersengat dan lebah tanpa sengat (Sadam dkk., 2016)

Lebah tanpa sengat memiliki banyak keunggulan dibandingkan dengan lebah bersengat. Salah satu keunggulan yang dimiliki lebah tanpa sengat yaitu menghasilkan propolis lebih banyak dibandingkan lebah bersengat. Studi keanekaragaman genetik dari lebah tanpa sengat akan memberikan informasi terkait hubungan keanekaragaman dengan potensi pengembangan atau pendayagunaan dari spesies lebah di suatu wilayah. Upaya konservasi pada lebah juga dapat dilakukan dengan mengetahui keanekaragaman genetik dan kekerabatan antar spesies lebah. Hal ini disebabkan karena tinggi rendahnya keragaman genetik menentukan kemampuan beradaptasi suatu spesies dalam jangka pendek dan jangka panjang (Mas’ud dkk., 2023).

Salah satu analisis keanekaragaman spesies yang akurat yaitu dengan menggunakan analisis molekuler dengan menggunakan DNA mitokondria pada lebah. Hal ini dikarenakan DNA mitokondria memiliki laju mutasi lebih tinggi daripada DNA inti dan DNA mitokondria bersifat monofiletik, diturunkan secara maternal dalam bentuk haploid berdasarkan garis keturunan maternal. DNA mitokondria hewan secara umum memiliki gen yang digunakan sebagai penanda dari gen pengkode protein yaitu cytochrome c oxidase I (COI) dan cytochrome b (cyt-b), sedangkan dari gen RNA ribosom adalah 12S rRNA dan 16S rRNA (Rahayu dan Jannah 2020).

Gen 16S rRNA merupakan salah satu marker molekular yang digunakan dalam klasifikasi filogenetik karena terdapat pada organisme baik yang berada pada bacteria, archaea, dan eukarya. Informasi mengenai sekuen DNA 16S rRNA

sudah sangat banyak tersedia pada database. Pada data NCBI, sekuens jenis lebah tak bersengat hanya terdiri dari sekuens yang menggunakan gen 16S rRNA dan bukan gen lainnya, sehingga dapat digunakan sebagai sumber analisis atau data pembandingan sekuens (Trianto dan Purwanto, 2020).

Identifikasi spesies menggunakan analisis molekuler sangat menguntungkan. Hal ini dikarenakan karakter molekuler lebih stabil terhadap pengaruh lingkungan. Identifikasi dengan menggunakan sekuens DNA telah dilakukan pada semua tingkatan takson, yaitu family, genus, dan species. Beberapa keunggulan analisis molekuler yaitu jumlah sampel yang digunakan sedikit, dapat diambil dari semua bagian organ tumbuhan dan hewan, dan dapat menunjukkan variasi yang tidak dapat dilakukan dengan pengamatan morfologi (Rahayu dan Jannah, 2020).

Analisis molekuler dilakukan dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dapat memperbanyak sekuens nukleotida dengan menggunakan mesin PCR secara *in vitro*. PCR memiliki sensitivitas, memberikan hasil dalam waktu yang singkat, dapat digunakan untuk mengidentifikasi secara detail hingga tingkat spesies (Popping *et al.*, 2010). Analisis molekuler dengan metode PCR lebih mudah dilakukan karena dapat dilakukan terhadap jumlah sampel DNA yang sedikit dan menggunakan primer yang sesuai dengan gen target yang diinginkan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lebah Tanpa Sengat (*Stingless Bee*)

2.1.1 Klasifikasi dan ciri umum lebah tanpa sengat

Meliponini merupakan takson lebah terbesar dengan 600 spesies yang telah dideskripsikan. Kelompok serangga sosial ini biasa ditemukan di daerah tropis dan subtropis, diantaranya daerah tropis Amerika (Neotropik), Afrika sub-Sahara (Afrotropis) dan kawasan Indo-Australia (Australasia) (Ayala *et al.*, 2014). Keragaman jenis lebah tanpa sengat di Indonesia tercatat sekitar 46 spesies yang tersebar di Pulau Sumatera, Kalimantan, Jawa, Timur, Sulawesi, Ambon, Maluku dan Irian Jaya.). Kelompok serangga eusosial ini disebut lebah tanpa sengat (Gambar 1) (Pujirahayu dkk., 2022).



Gambar 1. Lebah tanpa sengat (Sumber: National Geographic, 2022).

Lebah tanpa sengat terbagi dalam beberapa genus antara lain yaitu *Trigona*, *Geniotrigona*, *Tetrotrigona*, *Lepidotrigona*, *Tetragonula*, dll (Rasmussen, 2008). Lebah tanpa sengat secara umum memiliki ciri-ciri seperti tubuh yang terbagi ke dalam tiga bagian yaitu kepala, dada (*thorax*), serta perut (*abdomen*).

Bagian dada terdapat dua pasang sayap dan tiga pasang tungkai. Terkhusus di bagian tungkai belakang dilengkapi dengan pollen basket, terdapat sepasang mata majemuk dan tiga mata sederhana (*ocelli*) yang berada di bagian kepala, serta sepasang antena menjadi organ peraba di dekat mata. Klasifikasi dari lebah tanpa sengat:

Kingdom : Animalia
 Phylum : Arthropoda
 Class : Insecta
 Order : Hymenoptera
 Family : Apidae
 Genus : *Trigona*, *Geniotrigona*, *Heterotrigona*,
Lepidotrigona, *Tetragonula*, dll.
 (Harjanto dkk., 2020).

Lebah tanpa sengat membuat sarang dalam lubang-lubang pohon, celah-celah dinding, dan lubang bambu di dalam rumah. Pintu keluar masuk tersedia lubang kecil sepanjang 1 cm yang dilindungi zat perekat. Sarang lebah tersusun atas beberapa bagian. Setiap bagian digunakan untuk menyimpan madu, menyimpan karangan-karangan bola berisi telur, tempayak dan kepompong, di bagian sudut terdapat bola-bola hitam untuk menyimpan madu dan tepung sari (Rasmussen, 2008).

2.1.2 Distribusi dan Perilaku

Distribusi lebah tanpa sengat banyak ditemukan di daerah tropis dan subtropis seperti di Amerika Selatan, Australia dan Asia Tenggara. Lebah tanpa sengat memanfaatkan hutan sebagai tempat tinggal dan mencari makan, sarang lebah trigona biasanya terdapat pada pohon mati, tanah, pohon berlubang serta bangunan yang bisa memungkinkan untuk membuat sarang, bentuk pintu

sarang lebah tanpa sengat memiliki perbedaan pada setiap genus, mulai dari berbentuk corong, berbentuk bulat tidak beraturan, atau tanpa tonjolan di pintu masuknya (Sanjaya dkk., 2019).

Lebah tanpa sengat hidup dengan cara eusosial, yaitu perilaku hidup berdampingan dengan sistem yang didasarkan pada pembagian kerja. Cara hidup ini mirip dengan lebah apis dan beberapa serangga lain seperti semut dan rayap. Kemampuan bertahan hidup koloni lebah tergantung pada tingkat keberhasilan lebah pekerja dalam mengumpulkan nektar, karbohidrat, dan polen yang merupakan sumber protein dan vitamin dari bunga (Aleixo *et al.*, 2017).

Perilaku sosial dalam satu koloni lebah terdapat satu atau lebih ratu lebah, ratusan lebah jantan dan ratusan bahkan sampai ribuan lebah pekerja. Ratu lebah harus subur dan bertugas untuk bertelur serta menjadi pemimpin koloni. Lebah tanpa sengat hidup dalam satu koloni atau sarang yang terdiri dari lebah ratu (*queen*), lebah jantan (*drone*) dan lebah betina sebagai lebah pekerja (*worker*). Ratu memiliki warna coklat kekuningan, dan memiliki ukuran lebih besar (3-4 kali) dibandingkan lebah betina pekerja, dengan ukuran perut lebih besar dibanding dengan tubuhnya, ciri- ciri lainnya sayap lebah ratu memiliki ukuran yang lebih pendek terhadap ukuran tubuh. Lebah ratu melepaskan *pheromones* yang fungsinya untuk mengatur aktivitas koloni (Wahyuningsih dkk., 2020).

2.1.3 Aspek Ekologi dan Konservasi Lebah Tanpa Sengat

Lebah merupakan serangga yang memiliki peran penting dari segi ekologis. Lebah memberikan manfaat secara tidak langsung dalam proses pelestarian sumber daya hutan, peningkatan produktivitas tumbuhan, dan hubungan simbiosis mutualisme. Tumbuhan menghasilkan banyak nektar dan pollen sebagai pakan lebah, di sisi lain lebah memberikan bantuan dengan cara melakukan penyerbukan pada bunga. Proses tersebut terjadi hubungan yang saling menguntungkan antar lebah dan bunga, karena lebah mendapatkan nektar serta pollen dari bunga, sebaliknya pada saat itu juga bunga telah dibantu oleh lebah dalam penyerbukan (Saepudin, 2013).

Peningkatan produksi tanaman sebanyak 2 kali lipat terjadi karena bantuan dari penyerbukan lebah. Hampir semua tanaman pertanian ataupun perkebunan memerlukan bantuan serangga seperti lebah untuk melakukan penyerbukan agar dapat menghasilkan biji/buah. Tumbuhan yang tidak dapat melakukan penyerbukan sendiri sangat membutuhkan bantuan dari lebah tanpa sengat dalam melakukan penyerbukan (Purwantiningsih, 2014).

Lebah tanpa sengat memiliki peran besar penyerbukan di ekosistem pertanian karena aktivitas manusia mempengaruhi peran lebah tanpa sengat dalam melakukan penyerbukan. Berdasarkan peran pentingnya diperlukan upaya konservasi lebah tanpa sengat untuk mendukung pelestarian bunga dan penyerbukan di ekosistem pertanian. Menurut *International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened* spesies lebah tanpa sengat tidak masuk dalam daftar spesies terancam punah tetapi beberapa spesies lebah tanpa sengat telah diidentifikasi sebagai spesies yang rentan terhadap kepunahan, seperti *Tetragonula sapiens* dan *Tetragonula laeviceps* (Norowi *et al.*, 2010).

2.2 DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*)

Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan sebagai pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada keturunannya. Secara struktural, DNA tersusun atas gula deoksiribosa, pospat, dan basa. Polimer pada DNA membentuk struktur *double heliks*, kedua heliks disatukan oleh ikatan hidrogen antara basa-basa yang terdapat dalam DNA, yaitu adenin, sitosin, guanin, dan timin (Yuliana dan Fathurohman, 2020).

DNA terdapat pada nukleus, mitokondria, dan kloroplas. Perbedaan ketiganya adalah DNA nukleus berbentuk linear dan berasosiasi sangat erat dengan protein histon, sedangkan DNA mitokondria dan kloroplas berbentuk sirkular dan tidak berasosiasi dengan protein histon. Selain itu DNA mitokondria dan kloroplas memiliki ciri khas, yaitu hanya mewariskan sifat-sifat yang berasal dari garis induk betina. Sedangkan DNA nukleus memiliki pola pewarisan sifat dari induk (Hairuddin, 2013). Sel hanya memiliki satu inti sel yang mengandung 2 set kromosom, yaitu satu set paternal dan satu set maternal. Meliponini memiliki jumlah kromosom $2n = 34$ kromosom untuk betina dan $n = 17$ untuk jantan (Teixeira *et al.*, 2023)

2.3 Analisis DNA Mitokondria

Mitokondria adalah organel yang bertanggung jawab di dalam metabolisme aerobik pada sel-sel eukariot. Mitokondria memiliki molekul DNA tersendiri yang susunannya berbeda dengan DNA inti. Setiap sel mengandung satu sampai ratusan mitokondria. DNA mitokondria merupakan DNA utas ganda yang berbentuk sirkuler. Mitokondria memiliki perangkat genetik sendiri yaitu DNA mitokondria atau sering disingkat mtDNA. Dengan bantuan DNAny,

mitokondria mempunyai kemampuan untuk mensintesis sendiri beberapa proteinnya. Namun bagian terbesar protein mitokondria disandi di dalam inti sel, kemudian disintesis pada ribosom yang bebas dalam sitoplasma dan diimpor ke dalam mitokondria (Koolman *et al.*, 1994).

Kelebihan dari mtDNA berbeda dengan DNA inti yaitu tingkat evolusi lebih cepat, berukuran lebih kecil, dan terdapat dalam jumlah *copy* tinggi pada DNA mitokondria dibandingkan dengan DNA inti, sehingga DNA mitokondria mudah dalam proses isolasi. Mitokondria memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan gen lain dalam proses analisisnya, terutama pada ordo Hymenoptera. Hal ini didukung oleh penelitian Nuraini dan 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.

Sel dapat mengandung ratusan hingga ribuan mitokondria dan masing-masing mitokondria dapat mengandung beberapa kopi mtDNA. DNA inti memiliki jumlah basa yang lebih banyak dibandingkan mtDNA, tetapi molekul mtDNA terdapat dalam jumlah *copy* yang jauh lebih banyak daripada molekul DNA inti. Salah satu gen penanda yang berasal dari DNA mitokondria yaitu gen 16S rRNA (Ratnayani dkk., 2007).

Pada lebah keturunan berasal dari ratu yang sama dan membawa DNA mitokondria yang sama sehingga individu-individu hibrid yang ada tidak membawa campuran mtDNA parental. Hibrid tersebut hanya mengandung mtDNA dari induk betinanya. Keadaan tersebut sangat berguna untuk mempelajari dan mengetahui kekerabatan lebah menggunakan DNA mitokondria (Solihin, 1994)

2.4 Gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA merupakan gen penanda molekuler pada DNA mitokondria dan molekul ini bersifat *ubikuitus* dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme, sehingga dapat dirancang suatu primer yang universal untuk seluruh kelompok. Molekul ini juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik. Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Gen 16S rRNA merupakan penanda molekuler yang digunakan dalam klasifikasi filogenetik karena terdapat pada organisme baik yang berada pada domain Bacteria, Archaea, serta Eukarya (Rahayu dan Jannah, 2019).

Pemanfaatan gen 16S rRNA untuk metode deteksi molekuler pada lebah memiliki tingkat diskriminasi yang rendah karena sebagian besar hasil urutan DNA 16S rRNA menunjukkan adanya kesamaan yang tinggi di dalam satu spesies. Gen mitokondria 16S rRNA memiliki keunggulan terutama pada ordo Hymenoptera. Hal ini didukung dengan penelitian Whitfield dan Cameron (1998) menyatakan bahwa gen 16S rRNA merupakan gen yang paling informatif untuk filogenetik terutama pada ordo Hymenoptera. Pemilihan gen 16S rRNA juga didasarkan pada ketersediaan *database* lebah tanpa sengat di situs NCBI hanya terdiri dari sekuens yang menggunakan gen 16S rRNA dan bukan gen lainnya, sehingga dapat digunakan sebagai sumber analisis atau data pembandingan sekuens (Trianto dan Purwanto, 2016).

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode enzimatik untuk amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Sebelum dilakukan PCR dengan sampel penelitian, perlu dilakukan optimasi agar didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR yang optimal (Setyawati dan Zubaidah, 2021).

Metode PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan dan memiliki suhu optimal yang sering digunakan yaitu denaturasi template (94 – 95°C), *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target (50 – 60°C) dan pemanjangan (72°C). Denaturasi DNA merupakan proses pemisahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Tahap ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Kemudian tahap penempelan primer DNA, *primer* merupakan suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. Waktu yang biasa digunakan pada proses *annealing* dalam PCR yaitu 30 – 45 detik. Tahap selanjutnya yaitu pemanjangan, pada tahap ini enzim Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA (Yusuf, 2010).

2.6 Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik adalah studi yang mengkaji hubungan antara berbagai organisme dengan analisis molekuler dan morfologi. Filogenetik molekuler telah menjadi bagian dari bermacam-macam jenis penelitian dari biologi molekuler, populasi genetik, perkembangan biologi dan biologi

evolusioner . Filogenetik molekuler merupakan suatu metode yang sering digunakan hampir disemua cabang biologi untuk perbandingan genom dan untuk mengetahui hubungan antar spesies berdasarkan pohon kehidupan melalui perhitungan statistika urutan basa (Tindi dan Wullur, 2017).

Analisis filogenetik molekuler menggunakan gen 16S rRNA telah terbukti berhasil dalam studi filogenetik lebah, dan keluarannya berupa data pohon filogenetik (Rasmussen dan Cameron, 2007). Urutan pengkodean Gen 16S rRNA berguna terutama untuk estimasi filogenetik pada tingkat yang lebih tinggi, karena gen tunggal ini menunjukkan bahwa urutan 16S rRNA berisi informasi sejarah yang berguna pada lebih dari satu tingkat divergensi filogenetik (Akihary dan kolondam, 2020).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian “Analisis mtDNA berdasarkan profil gen 16S rRNA pada lebah tanpa sengat (*Stingless bee*) di Kabupaten Lampung Timur” yang berada dibawah penelitian Bapak Priyambodo, S.Pd., M.Sc. dengan nomor kontrak 724/UN26.21/PN/2023. Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan November 2023 - Februari 2024. Pengambilan sampel dilakukan di daerah Desa Tanjungsari, Kecamatan Batanghari Nuban Kabupaten Lampung Timur. Analisis molekuler yang dilakukan dengan bekerja sama dengan Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung di bawah bimbingan drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua yaitu peralatan pengambilan sampel dan peralatan analisis molekuler. Alat pengambilan sampel yang digunakan meliputi botol *vial* 10 ml, spidol, plastik, dan kotak es. Peralatan analisis molekuler di laboratorium meliputi *microtube*, *spin column*, mikropipet, *vortex*, *tip*, *collection tube*, *water bath*, *centrifuge*, *chamber*, *power supply*, *cetakan agar*, *laminar air flow* (LAF), dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua yakni bahan yang digunakan untuk di lapangan dan untuk di laboratorium. Bahan yang digunakan di lapangan yaitu larutan *Phospate-buffer saline* (PBS) sebagai zat fiksatif sampel *stingless bee*. Bahan yang digunakan di laboratorium untuk melakukan analisis molekuler diantaranya yaitu

QIAmp® Fast DNA Tissue and Blood kit (50) dari QIAGEN untuk isolasi DNA, yang terdiri dari proteinase K, buffer AL, buffer AW1, buffer AW2, dan buffer ATE, bahan elektroforesis terdiri dari DNA hasil isolasi, gel agarosa sebagai fase diam, *bufferTri-Asetat-EDTA* (TAE) sebagai fase gerak dan pelarut agarosa, *loading dye* sebagai pemberat DNA didalam sumuran gel, *SYBR safe* digunakan sebagai pewarna untuk melihat DNA hasil isolasi setelah dilakukan elektroforesis, *marker* 100 bp sebagai penanda, dan bahan untuk amplifikasi terdiri dari *MyTaq TMHS Red Mix*(Bioline) 10 µl dengan primer *forward* 16S rRNA 0,8 µl dan *reverse* 16S rRNA 0,8 µl dan *Nuclease-Free Water*.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dimana pengambilan sampel dilakukan dengan *purposive sampling*. Sarang koloni lebah tanpa sengat didapatkan dengan melakukan jelajah pada wilayah yang sudah ditentukan dan memasang perangkat berupa botol vial pada pintu masuk sarang lebah tanpa sengat. Individu lebah tanpa sengat selanjutnya di fiksasi dengan larutan PBS (Priyambodo dkk.,2023).

3.4 Pelaksanaan

Tahap pelaksanaan pada penelitian ini terdiri dari tujuh tahapan yaitu tahap pengambilan sampel, preparasi sampel, isolasi DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis, sekuensing dan analisis filogenetik. Ketujuh tahapan secara rinci sebagai berikut:

3.4.1 Pengambilan sampel

Kegiatan pengambilan sampel lebah tanpa sengat dilakukan di Kabupaten Lampung Timur dengan menggunakan metode *purposive*

sampling. Pengambilan sampel dilakukan di beberapa titik tempat di Kabupaten Lampung Timur. Tahapan pengambilan sampel:

- a) Botol *vial* yang akan digunakan terlebih dahulu diisi dengan larutan PBS sebagai zat yang akan membantu mempertahankan tingkat pH konstan pada sampel lebah tanpa sengat.
- b) Bagian tutup botol *vial* yang telah berisi PBS dibuka kemudian dimasukkan kedalam sarang lebah melalui bagian pintu masuk sarang lebah dan lebah akan masuk dalam botol *vial*, setelah itu pastikan botol *vial* ditutup dengan sempurna
- c) Botol *vial* yang telah berisi lebah tanpa sengat kemudian diberi identitas sampel (kode sampel dan jenis sampel).
- d) Botol *vial* yang telah berisi sampel selanjutnya disimpan dan diletakkan pada *refrigerator* dengan suhu dingin (-4°C).

3.4.2 Preparasi Sampel

Preparasi dilakukan sebelum melakukan tahap analisis. Preparasi bertujuan untuk mendapatkan sampel yang homogen. Tahap preparasi sampel sebagai berikut:

- a) Preparasi sampel dilakukan dengan mengeluarkan sampel lebah tanpa sengat yang didapatkan pada tahap pengambilan sampel dari dalam *refrigerator*, dan meletakkannya pada *laminar air flow* (LAF).
- b) Sampel lebah sebanyak 1-3 ekor dikeluarkan dari botol *vial*, dan diletakkan pada mortar yang telah ditambahkan dengan larutan PBS, kemudian sampel digerus hingga halus.
- c) Sampel yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam *microtube* dan diberi identitas sampel (kode sampel_jenis sampel).

3.4.3 Isolasi DNA

Isolasi DNA terdiri dari empat tahap yaitu *lysis*, *binding*, *washing* atau purifikasi, dan *elution*. Pada sampel lebah DNA berasal dari seluruh bagian tubuh lebah. Proses isolasi DNA diawali dengan penghancuran struktur sel (*lysis*) sehingga senyawa DNA bisa dikeluarkan dari sel. Senyawa DNA yang telah dikeluarkan akan mengalami proses pengikatan (*binding*) menggunakan *silica gel*. Proses *washing* bertujuan untuk menghilangkan kontaminan lain yang terdapat pada larutan, menyisakan senyawa DNA yang telah diikat pada *silica gel*.

Pada tahap purifikasi atau elution DNA yang terikat pada silica gel dilarutkan menggunakan senyawa buffer ATE (QIAGEN, 2020). Tahap isolasi DNA lebah tanpa sengat sebagai berikut:

- a) Sampel lebah yang telah di preparasi sebanyak 200 µl, dimasukkan ke dalam *microtube* yang telah berisi proteinase K sebanyak 20 µl dan Buffer AL sebanyak 200 µl, kemudian *microtube* yang telah berisi sampel, proteinase K dan Buffer AL dilakukan homogenisasi menggunakan vortex.
- b) Suspensi yang telah dihomogenkan kemudian diinkubasi menggunakan *waterbath* dengan suhu 56°C selama 5 menit yang berfungsi untuk mencegah pengendapan.
- c) Suspensi yang telah diinkubasi ditambahkan *alcohol absolut* sebanyak 200 µl, kemudian dilakukan homogenisasi selama 1 menit, suspensi tersebut dipindahkan dalam tabung spin column yang dilengkapi dengan tabung koleksi 2 ml, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.
- d) Tabung *spin column* yang berisi DNA lebah dipindahkan ke dalam tabung koleksi baru, kemudian ditambahkan buffer AW1

sebanyak 500 μ l dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.

- e) Tabung *spin column* yang berisi DNA lebah dipindahkan lagi ke dalam tabung koleksi baru, kemudian pada tabung *spin column* ditambahkan larutan buffer AW2 sebanyak 500 μ l dan disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 14.000 rpm.
- f) Tahap *elution* atau purifikasi dilakukan dengan mengganti tabung koleksi dengan *microtube* 1 ml, kemudian menambahkan buffer AE ke dalam *spin column* berisi DNA lebah sebanyak 100 μ l dan diinkubasi selama 1 menit dalam suhu ruang.
- g) Sampel DNA yang telah diinkubasi pada suhu ruang, dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Sampel DNA dalam *microtube* disimpan di dalam *refrigerator* dengan suhu -4°C untuk mencegah kerusakan DNA (Asiyah, 2017).

3.4.4 Uji Kualitatif DNA

Uji kualitatif DNA dilakukan dengan menggunakan elektroforesis. DNA sampel untuk mengetahui kualitas dari hasil isolasi DNA sampel dengan melihat ketebalan fragmen DNA. Proses elektroforesis dilakukan dengan cara membuat gel agarose. Gel agarose yang digunakan memiliki konsentrasi 1% dengan perbandingan 1 g bubuk gel agarosa dalam 100 ml larutan TAE. Sebanyak 5 μ L masing-masing DNA sampel dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel. Proses elektroforesis ini menggunakan larutan TAE dan di-running dengan 100 volt selama 30 menit. DNA hasil elektroforesis diamati pada UV transluminator lalu didokumentasikan menggunakan kamera.

3.4.5 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan untuk memperbanyak segmen DNA dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan alat *thermal cyclers*. Amplifikasi DNA dilakukan dalam tiga tahapan, yaitu pembuatan *master mix*, *template addition*, dan *running PCR*.

Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak jumlah gen target, yaitu gen 16S rRNA pada sampel DNA lebah.

Sebelum melakukan tahap amplifikasi DNA dilakukan tahap pembuatan *mix master*, pembuatan *mix master* merupakan proses pencampuran reagen yang dibutuhkan untuk menjalankan reaksi PCR. Tahap pembuatan *mix master* dilakukan dengan mencampurkan keempat reagen yaitu 10 µl MyTaq™ HS Red Mix, 3,4 µl *nuclease-free water* dan 0,8 µl *forward primer*, 0,8 µl *reverse primer* (Tabel 1). Primer yang digunakan merupakan primer yang spesifik pada gen 16S rRNA lebah tanpa sengat (Tabel 2). Keempat reagen tersebut dimasukkan ke dalam *PCR tube* 0,2 ml kemudian dilakukan sentrifugasi menggunakan *spin down* untuk memastikan bahwa reagen tercampur dengan baik dan tidak ada yang menempel pada dinding *PCR tube*. Tahap selanjutnya yaitu *template addition*, pada tahap ini dilakukan pencampuran 5 µl sampel DNA dengan *mix master* yang telah disiapkan.

Tabel 1. Komposisi reagen untuk amplifikasi PCR gen 16S rRNA

Bahan	Volume
MyTaq™ HS Red Mix	10 µl
<i>nuclease-free water</i>	3,4 µl
<i>forward primer</i> (LR13107-F)	0,8 µl
<i>reverse primer</i> (LR12647-R)	0,8 µl
Sampel DNA	5 µl
Total	20 µl

Tabel 2. Urutan basa nitrogen primer gen 16S rRNA (Wang, 2020).

<i>Primer</i>	Urutan Basa Nitrogen
<i>Forward</i>	5'-TGG CTG CAG TAT AAC TGA CTG TAC AAA GG-3'
<i>Reverse</i>	5'-GAA ACC AAT CTG ACT TAC GTC GAT TTG A-3'

Tahap selanjutnya pada amplifikasi DNA adalah *running* PCR, proses *running* PCR dilakukan menggunakan alat *thermal cycler*. Pada tahap *running* PCR diawali dengan tahap predenaturasi dengan suhu 95°C selama 2 menit kemudian dilakukan perbanyakan sebanyak 30 siklus dengan suhu dan waktu optimal yang digunakan yaitu suhu denaturasi (pemisahan utas ganda DNA) 95° C, *annealing* (penempelan primer) 50° C, dan *extension* (pemanjangan segmen DNA) 72° C, masing-masing selama 30 detik, dan tahap *post extension* 4° C (Trianto dan Purwanto, 2020). Reaksi PCR terdiri dari denaturasi yaitu proses pemutusan ikatan hidrogen yang menghubungkan basa nitrogen pada kedua untai DNA dengan bantuan suhu tinggi sehingga terbentuk dua untai DNA tunggal, *annealing* merupakan proses penempelan primer pada untai DNA tunggal yang akan menginisiasi proses replikasi DNA, tahap selanjutnya adalah *extension* merupakan proses perpanjangan DNA dengan bantuan enzim Taq DNA Polymerase, dan adapula proses tambahan pada awal dan akhir reaksi, yaitu predenaturasi dan *post extension*. Tahap predenaturasi yaitu tahap persiapan terjadinya pemisahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal, *post extension* dilakukan sebagai bentuk penyempurnaan tahap amplifikasi (Pestana *et al.*, 2010).

3.4.6 Elektroforesis

Tahap elektroforesis merupakan visualisasi hasil amplifikasi untuk mengetahui keberadaan DNA melalui mendaran sinar UV pada sumuran agarosa yang akan membentuk pita DNA dengan menggunakan UV transiluminator. Elektroforesis dilakukan dengan cara mengaliri DNA pada sumur gel agarosa dengan arus listrik. Gel agarosa 1% dibuat

dengan cara melarutkan 1 g bubuk gel agarosa dalam 100 ml larutan TAE dan dipanaskan di dalam microwave selama tiga menit. Setelah itu, larutan agarosa ditambahkan dengan SYBR® safe DNA *gel stain* sebanyak 10 µl. Kemudian, larutan agar dimasukkan ke dalam cetakan yang telah diberikan sisir. Larutan tersebut dibiarkan selama 30 menit hingga mengeras.

Larutan agarosa yang telah padat dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditambahkan *buffer* TAE hingga agarosa terendam. DNA marker sebanyak 5 µl dimasukkan terlebih dahulu ke dalam sumuran pertama sebagai data dasar untuk mengetahui ukuran molekul DNA yang didapatkan setelah proses amplifikasi. Sampel sebanyak 5 µl dimasukkan ke dalam sumur yang ada di dalam agar, setelah sampel dimasukkan ke dalam sumuran, *chamber* disambungkan pada *power supply*. Proses elektroforesis dijalankan selama 30 menit dengan tegangan 100 V dan kuat arus 400 A. Hasil elektroforesis divisualisasikan di bawah sinar *bluelight* dan difoto dengan menggunakan kamera yang telah terhubung dengan komputer melalui aplikasi *EOS Utility*. Pengamatan foto hasil visualisasi dilakukan untuk melihat keberadaan pita DNA pada gel agarosa.

3.4.7 Sekuensing

Proses sekuensing akan dilakukan dengan cara mengirimkan sampel ke PT Genetika Science Indonesia. Sampel yang akan dikirimkan dikemas dalam kotak berisi *ice gel*. Kedua primer juga disertakan dalam kotak tersebut.

Proses sekuensing dilakukan di dalam alat bernama *sequencer* dengan cara memodifikasi proses PCR. Sampel DNA dalam tabung ditambahkan dengan enzim DNA Polimerase dan deoksinukleotida trifosfat (dNTP), yang terdiri dari dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP sebagai penyusun molekul DNA baru. *Sequencer* dilengkapi dengan

laser dan detector untuk mendeteksi penanda fluoresen yang terdapat pada untai DNA hasil amplifikasi (Hofmann and Clokie, 2018).

3.5 Analisis Data

Analisis data hasil sekuensing yang diperoleh dari PT Genetika Science Indonesia akan diterima dalam bentuk elektroferogram dan AB1 *file*. Hasil sekuensing yang didapatkan terlebih dahulu dilakukan pengecekan untuk memastikan hasil sekuensing tersebut sesuai dengan target yang diinginkan menggunakan program Uji *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Hasil proses sekuensing dianalisis menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versi kesebelas (MEGA 11) yang diawali dengan pensejajaran sekuen gen (*alignment*), analisis jarak genetik, dan konstruksi peta filogenetik. Data yang didapatkan dari analisis hasil sekuensing adalah runutan basa nitrogen, nilai jarak genetik, nilai homologi, dan pohon filogenetik.

3.5.1 Uji BLAST

Metode pencarian referensi dan acuan sekuen yang disediakan oleh *website* NCBI adalah *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Blast dapat menyediakan referensi data sekuen dalam waktu cepat dengan akurasi dan presisi yang tinggi. Pada penelitian ini pencarian referensi sekuen dilakukan dengan memasukkan file sekuen format FASTA pada program BLAST yang dapat diakses pada tautan (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Gambar 2) dengan memilih “*Nucleotide BLAST*” dipilih untuk melakukan uji BLAST pada sekuen nukleotida (Wangiyana, 2020).

3.5.2 Pensejajaran sekuen gen

Hasil sekuensing yang didapatkan dari PT Genetika Science Indonesia akan memiliki format AB1 *file*. Pensejajaran atau *alignment* sekuen gen dilakukan pada aplikasi MEGA 11 yang berfungsi untuk menyusun sekuen *forward* dan *reverse* menjadi *consensus*, sekuen DNA yang terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer reverse dan forward disebut sebagai sekuen *consensus* (Sari, 2022). Setelah mendapatkan *consensus* akan dilakukan pensejajaran beberapa sekuen yang akan menjadi *outgroup* dan *ingroup* yang didapatkan dan tersedia di *genbank* dan menyimpannya dalam bentuk *fasta file* (.txt). Tahap awal untuk memulai pensejajaran adalah dengan membuka aplikasi MEGA 11 (Lampiran 2).

3.5.3 Analisis Jarak Genetik

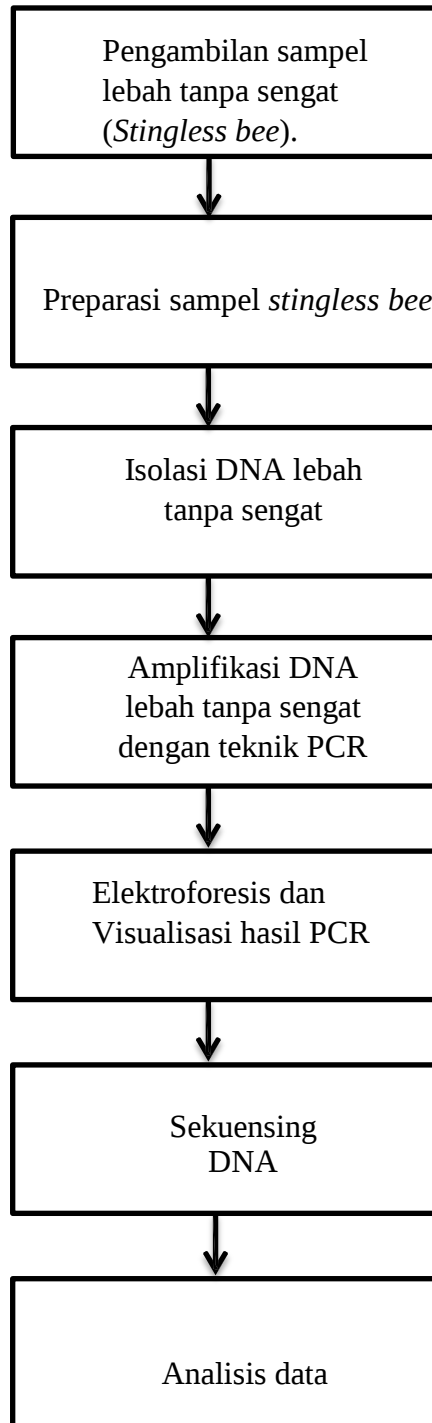
Analisis jarak genetik merupakan analisis berdasarkan penghitungan matriks dari jarak antar pasangan basa sekuens spesies yang diukur melalui kuantitas numerik (Fietro dkk., 2021). Jarak genetik didapatkan dari hasil perhitungan dengan metode Kimura-2-parameter yang terintegrasi di dalam MEGA 11. Analisis jarak genetik dilakukan untuk membentuk pohon filogenetik dengan menggunakan program MEGA 11 (Lampiran 3).

3.5.4 Membuat Konstruksi Peta Filogenetik

Konstruksi filogenetik merupakan metode yang umum digunakan dalam analisis kekerabatan yang dapat digunakan untuk menafsirkan kekerabatan antar spesies (Anafarida dan Badruzsaufari, 2020). Pohon filogenetik merupakan diagram berbentuk cabang yang menggambarkan suatu susunan hubungan kekerabatan pada suatu populasi atau kelompok tertentu dan dengan menggunakan metode “*Construct/Test Maximum Likelihood Tree*” (Lampiran 4).

3.6 Bagan Alir Penelitian

Bagan alir penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 2. Bagan alir rancangan penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini “Analisis Molekuler DNA Mitokondria Berdasarkan Profil Gen 16S rRNA untuk Deteksi Spesies Lebah Tanpa Sengat (*Stingless bee*) di Kabupaten Lampung Timur” adalah sebagai berikut.

1. Analisis secara molekuler sampel lebah tanpa sengat yang didapatkan di Desa Tanjungsari, Kec Batanghari Nuban, Kabupaten Lampung Timur terdeteksi sebagai *Heterotrigona itama*.
2. Berdasarkan konstruksi peta filogenetik, diketahui 3 sampel paling dekat kekerabatannya dengan *H. itama* dengan nilai homologi 0,0176 dan paling jauh dengan *Paratrigona lineatifrons* dengan nilai homologi 0,1501.

5.2 Saran

Kajian pengenalan individu untuk mengetahui estimasi populasi dan hubungan kekerabatan antar spesies lebah tanpa sengat perlu dilakukan sebagai upaya konservasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Akihary, C. V., dan Kolondam, B. J. 2020. Pemanfaatan gen 16s rna sebagai perangkat identifikasi bakteri untuk penelitian-penelitian di Indonesia. *pharmacon*, 9(1), 16-22.
- Aleixo, K. P., Menezes, C., Imperatriz Fonseca, V. L., & da Silva, C. I. (2017). Seasonal availability of floral resources and ambient temperature shape stingless bee foraging behavior (*Scaptotrigona aff. depilis*). *Apidologie*, 48, 117-127.
- Anafarida, O., dan Badruzsaufari, B. 2020. Analisis Filogenetik Mangga (*Mangifera Spp.*) Berdasarkan Gen 5, 8s Rna. *Ziraa'ah Majalah Ilmiah Pertanian*, 45(2), 120-126.
- Ardiana, S. A., Astarini, I. A., Putra, I. N. G., Pertiwi, P. D., Sembiring, A., Yusmalinda, A., dan Al Malik, D. 2021. Keragaman Genetik dan Filogenetik Longtail Tuna (*Thunnus tonggol*) yang Didaratkan di Pasar Ikan Pabean, Surabaya. *Musamus Fisheries and Marine Journal*. Vol.3 (No.2): hal 107-115.
- Asiyah, S. 2017. *Uji Kualitatif DNA Gajah Sumatra (Elephas maximus sumatranus) di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas*. Skripsi. Lampung. Jurusan Biologi, Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
- Ayala, R., Gonzalez, V. H., & Engel, M. S. 2014. Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): diversity, distribution, and indigenous knowledge. In *Pot-honey: a legacy of stingless bees* (pp. 135-152). New York, NY: Springer New York.
- Azizi, M. G., Priawandiputra, W., dan Raffiudin, R. 2020. Morphological identification of stingless bees from Belitung. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol. 457, No. 1, p. 012011.
- Bu'ulolo, I. C., Simamora, N., Tampubolon, S., dan Pinem, A. 2010. Sequence Alignment Menggunakan Algoritma Smith Waterman. *Jurnal Integrasi*, 2(2), 36-41.
- Efin, A., Atmowidi, T., dan Prawasti, T. S. 2019. Morphological characteristics and morphometric of stingless bee (Apidae:

- Hymenoptera) from Banten Province, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(6).
- Febrianti, F., Iskandar, A. M., dan Muflihati, M. 2020. Bentuk Pintu Masuk Sarang *Trigona* sp. Di Kawasan Hutan Mangrove Surya Perdana Mandiri Kelurahan Setapak Besar Singkawang Utara. *Jurnal Hutan Lestari*, 8(3).
- Fietri, W. A., Rasak, A., & Ahda, Y. 2021. Analisis Filogenetik Ikan Tuna (*Thunnus* spp) di Perairan Maluku Utara Menggunakan COI (Cytochrome Oxydase I). *BIOMA: Jurnal Biologi Makassar*, 6(2), 31-39.
- Gaffar, S., dan Sumarlin, S. 2020. Analisis sekuen mtDNA co1 pari totol biru yang didaratkan di tempat pendaratan ikan kota tarakan. *Jurnal Harpodon Borneo*, 13(2), 80-89.
- Hairuddin, R. 2015. Analisis DNA pada Tanaman Gandum (*Triticumaestivum* L.). *Dinamika*, 4(2).
- Harjanto, S., Mujiyanto, M., Arbainsyah, A. R., dan Ramlan, A. 2020. Budidaya Lebah Madu Kelulut Sebagai Alternatif Mata Pencaharian Masyarakat. *Yogyakarta: Yayasan Swaraowa*.
- Janra, M., Herwina, H., dan Salmah, S. 2020. Identifikasi Potensi Predator dan Hama pada Peternakan Kelulut (Hymenoptera; Apidae; Meliponini; Tetragonula, Lepidotrigona) melalui Pengamatan Cepat di Kabupaten Padang Pariaman, Sumatera Barat. *Jurnal Sumberdaya HAYATI*, 6(2), 67-74.
- Kamal, M. M., Butet, N. A., Rahayu, E. S., dan Hakim, A. A. 2021. Identifikasi karakteristik molekuler gen 16S rRNA parsial pada paus sperma (*Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758). *Habitus Aquatica: Journal of Aquatic Resources and Fisheries Management*, 2(1), 21-28.
- Mas'ud, A., Hasan, S., dan Sundari, S. 2023. Identifikasi Jenis Lebah madu Asal Kepulauan Sula Menggunakan Aplikasi DNA Barcode LCO GEN. *Jurnal Biosilampari: Jurnal Biologi*, 5(2), 163-168.
- National Geographic. 2022. *Stingless bee*. <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/stingless-bees-honey-helping-peruvian-amazon>, diakses pada Rabu, 21 Juni 2023.
- Norowi, M. H., Mohd, F., Sajap, A. S., Rosliza, J., dan Suri, R. 2010. Conservation and sustainable utilization of stingless bees for pollination services in agricultural ecosystems in Malaysia. In *Proceedings of International Seminar on Enhancement of Functional Biodiversity Relevant to Sustainable Food Production in ASPAC* (pp. 1-11).

- Nuraini, N., dan 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.
- Pangastuti, A. 2006. Species definition of procaryotes based on 16S rRNA and protein coding genes sequence. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 7(3).
- Pratama, M.N., Agus, A., Umami, N., Agussalim, Purwanto, H. 2023. Morphometric and molecular identification, domestication, and potentials of stingless bees (Apidae: Meliponini) in Mount Halimun Salak National Park, West Java. *Indonesia. Biodiversitas* 24(11): 6107–6118.
- Priyambodo, P., Rustiati, E. L., Pratiwi, D. N., Susanto, A. W., Imtitsal, A., Fahrezi, A., Ramadhan, V. 2023. Qualitative Analysis of Partial 16S rRNA Amplicon of Mitochondrial Gene of Stingless Bees in Pesawaran. *Jurnal Biologi Tropis*, 23(1), 557-563.
- Pujirahayu, N., Hardianto, F., dan La Ode Agus Salim Mando, Z. 2022. Karakteristik Sarang dan Tumbuhan Sumber Getah Propolis Lebah Tak Bersengat (*Stingless Bee*) Dari Buton Utara. *MAKILA:Jurnal Penelitian Kehutanan* Volume 16, Nomor 1 (69-79)
- Purwantiningsih, B. 2014. *Serangga polinator*. Universitas Brawijaya Press.
- Quraishia, S. F., Panneerchelvam, S., Zainuddin, Z., dan Abd Rashid, N. H. 2015. Molecular characterization of Malaysian marine fish species using partial sequence of mitochondrial DNA 12S and 16S rRNA markers. *Sains Malaysiana*, 44(8), 1119-1123.
- Rahayu, D. A., dan Jannah, M. 2019. *Dna barcode hewan dan tumbuhan Indonesia*. Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.
- Rahmad, B., Damiri, N., dan Mulawarman, M. 2021. Jenis Lebah Madu Dan Tanaman Sumber Pakan Pada Budi Daya Lebah Madu Di Hutan Produksi Subanjeriji, Kabupaten Muara Enim, Sumatera Selatan (Honeybee Diversity and Woof Source of Beekeeping in Subanjeriji Production Forest, Muara Enim District, South Sumatera). *Journal Penelitian Kehutanan FALOA*, 5(1), 47-61.
- Rasmussen, C. 2008. Catalog of the Indo-Malayan/Australasian stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Zootaxa*. 1935:1–80.
- Rasmussen, C., dan Cameron, S. A. 2007. A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32(1), 26-39.

- Ratnayani, K., Wirajana, I. N., dan Laksmiwati, A. A. I. A. M. 2007. Analisis variasi nukleotida daerah D-Loop DNA mitokondria pada Satu individu suku bali normal. *Jurnal Kimia*, 1(1), 7-14.
- Sadam, B., Hariani, N., dan Fachmy, S. 2016. Jenis Lebah Madu Tanpa Sengat (Stingless Bee) di Tanah Merah Samarinda. In *Prosiding Seminar FMIPA UNMUL* (pp. 374-378).
- Saepudin, R. 2013. Analisis keberlanjutan model integrasi lebah dengan kebun kopi (*sinkolema*) dalam rangka peningkatan produksi madu dan biji kopi. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 8(1), 1-15.
- Sanjaya, V., Astiani, D., dan Sisillia, L. (2019). Studi habitat dan sumber pakan lebah kelulut di kawasan cagar alam Gunung Nyiut Desa Pisak Kabupaten Bengkayang. *Jurnal Hutan Lestari*, 7(2).
- Sari, N., Fitri, F., Nurseha, T., Suliansyah, I., dan Purwati, E. 2022. Penentuan Spesies Bakteri Asam Laktat (BAL) Melalui Analisis Sekuen Gen 16S rRNA dan Pendekatan Bioinformatika. In *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan* (Vol. 5, pp. 561-567).
- Setyawati, R., dan Zubaidah, S. 2021. Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*, 4(1), 36-40.
- Solihin, D.D. 1994. Ulas Balik Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam Studi Keragaman Genetik dan Biologi Populasi pada Hewan. *Hayati*. 1(1):1-4.
- Stackebrandt, E. dan B.M.Goebel. 1995. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 846-849.
- Subari, A., Razak, A., dan Sumarmin, R. 2021. Phylogenetic Analysis of *Rasbora* spp. Based on the Mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1), 89-94.
- Tammu, R. M. 2018. Peran Pembelajaran Biologi Sel Dan Molekuler Dalam Pengelolaan Dan Konservasi Keanekaragaman Hayati Indonesia. In *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi* (pp. 878-885).
- Teixeira, G. A., de Paiva Ferreira, R., & Lopes, D. M. 2023. Comparative cytogenetic analysis reveals chromosomal variability in five stingless bees of the genus *Trigona* (Apidae, Apinae, Meliponini). *Apidologie*, 54(2), 22.

- Tindi, M., Mamangkey, N. G. F., dan Wullur, S. 2017. DNA Barcode dan analisis filogenetik molekuler beberapa jenis bivalvia asal perairan Sulawesi Utara berdasarkan gen COI. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 5(2), 32-38.
- Trianto, M., dan Purwanto, H. 2020. Molecular phylogeny of stingless bees in the Special Region of Yogyakarta revealed using partial 16S rRNA mitochondrial gene. *Buletin Peternakan*, 44(4), 225-232.
- Toledo-Hernández, E., Peña-Chora, G., Hernandez-Velazquez, V. M., Lormendez, C. C., Toribio-Jiménez, J., Romero-Ramírez, Y., & León-Rodríguez, R.. 2022. The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. *Apidologie*, 53(1), 8.
- Wahyuningsih, E., Wulandari, F. T., dan Lestari, A. T. 2020. Peningkatan produktivitas lebah madu *Trigona* sp dengan kayu dadap (*Erythrina vareigata* l) sebagai bahan baku stup lebah, Di Desa Pendua, Kec. Kayangan, Kab. Lombok Utara, NTB. *Jurnal Pendidikan dan Pengabdian Masyarakat*, 3(4).
- Wang, C. Y., Zhao, M., Xu, H. L., Zhang, F. L., Zhong, Y. H., Feng, Y., dan Wang, S. J. 2020. Complete mitochondrial genome of the stingless bee *Lepidotrigona terminata* (Hymenoptera: Meliponinae) and phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B*, 5(1), 752-753.
- Whitfield J. B. dan Cameron S. A. 1998. Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S Rna gene among Hymenoptera. *Mol Biol Evol.* 15: 1728-1743.
- Wangiyana, I. G. A. S. 2020. DNA Barcoding Library Database of *Aquilaria* Member and *Gyrinops* Member. *Jurnal Silva Samalas*, 3(2), 68-75.
- Winarno, G. D., Harianto, S. P., Masruri, N. W., dan Bintoro, A. 2019. *Buku ajar pengelolaan hasil hutan bukan kayu andalan lampung*. Graha ilmu.
- Yuliana, A., dan Fathurohman, M. 2020. *Teori Dasar dan Implementasi Perkembangan Biologi Sel dan Molekuler*. Jakad Media Publishing.
- Yusuf, Z. K. 2010. Polymerase chain reaction (PCR). *Jurnal Saintek*, 5(6), 1-6.