

**KAJIAN ANALISIS HASIL SEKUENSING GEN COI PADA INDIVIDU
LEBAH TANPA SENGAT DI LAMPUNG TENGAH**

(Skripsi)

Oleh

**Yuliana Andriyani
2117021007**



**PROGRAM STUDI S-1 BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

KAJIAN ANALISIS HASIL SEKUENSING GEN COI PADA INDIVIDU LEBAH TANPA SENGAT DI LAMPUNG TENGAH

Oleh

Yuliana Andriyani

Indonesia memiliki iklim tropis dengan keanekaragaman flora dan fauna yang tinggi, termasuk lebah tanpa sengat. Lebah tanpa sengat memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena dapat menghasilkan madu, propolis, dan mudah dibudidayakan, serta bernilai ekologi melalui perannya dalam membantu penyerbukan. Tingginya keanekaragaman lebah tanpa sengat di Lampung, terkhusus Lampung Tengah dapat dianalisis melalui analisis molekuler menggunakan gen COI yang terdapat di dalam mitokondria dan bersifat stabil. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi basa nukleotida pada hasil sekuensing gen COI dan jarak genetik sampel lebah tanpa sengat di Lampung Tengah. Sampel lebah tanpa sengat didapatkan di Dusun Sari Katon dan Sido Mulyo, Desa Sidomulyo, Kecamatan Punggur, Kabupaten Lampung Tengah. Sampel yang digunakan berjumlah empat individu kemudian dilakukan analisis molekuler hingga tahap sekuensing DNA dan dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA XI. Amplifikasi gen COI pada sampel lebah tanpa sengat menghasilkan pita DNA dengan ukuran 600 – 750 bp. Keempat sampel lebah tanpa sengat memiliki variasi basa nukleotida yang tinggi dan menunjukkan adanya keragaman di dalam individu lebah tanpa sengat. Jarak genetik antara keempat sampel lebah tanpa sengat berkisar antara 0,52% – 1,12%, yang menunjukkan adanya perbedaan genetik pada keempat individu lebah tanpa sengat.

Kata kunci: analisis molekuler, jarak genetik, Lampung Tengah, lebah tanpa sengat, perangkat lunak MEGA

ABSTRACT

STUDY OF ANALYSIS OF COI GENE SEQUENCING RESULTS IN INDIVIDUALS STINGLESS BEES IN CENTRAL LAMPUNG

By

Yuliana Andriyani

Indonesia has a tropical climate with high diversity of flora and fauna, including stingless bees. Stingless bees have high economic value as they produce honey, propolis, and are easy to cultivate, as well as ecological value through their role in pollination. The high diversity of stingless bees in Lampung, especially Central Lampung, can be analyzed through molecular analysis using the COI gene found in mitochondria. This study aims to determine the variation of nucleotide bases in the COI gene sequencing results and the genetic distance of stingless bee samples in Central Lampung. Four stingless bee individuals were obtained in Sari Katon and Sido Mulyo, Sidomulyo, Punggur, Central Lampung. Molecular analysis was carried out up to the DNA sequencing stage and analyzed using MEGA XI software. Amplification of the COI gene in stingless bee samples produced DNA bands with a size of 600-750 bp. The four stingless bee samples had high nucleotide base variations and showed diversity within stingless bee individuals. The genetic distance between the four stingless bee samples ranged from 0.52% – 1.12%, indicating that there were genetic differences among the four stingless bee individuals.

Keywords: Central Lampung, genetic distance, MEGA software, molecular analysis, stingless bee

**KAJIAN ANALISIS HASIL SEKUENSING GEN COI PADA INDIVIDU
LEBAH TANPA SENGAT DI LAMPUNG TENGAH**

Oleh

YULIANA ANDRIYANI

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
2025**

Judul Skripsi : Kajian Analisis Hasil Sekuensing Gen COI pada Individu Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah

Nama Mahasiswa : Yuliana Andriyani

NPM : 2117021007

Program Studi : S-1 Biologi


Jurusan : Biologi


Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



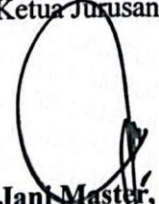
Pembimbing I

Pembimbing II


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

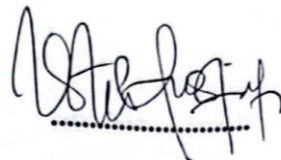

Priyambodo, S.Pd., M.Sc.
NIP 198611142015041003

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi


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

1. Tim Penguji

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



Sekretaris : Priyambodo, S.Pd., M.Sc.



Anggota : Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP-1971/10012005011002

Tanggal : 2 Juli 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yuliana Andriyani
NPM : 2117021007
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya berjudul:

**“Kajian Analisis Hasil Sekuensing Gen COI Ppda Individu Lebah Tanpa
Sengat di Lampung Tengah”**

Baik gagasan dan pembahasannya merupakan karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku. Jika di kemudian hari terbukti pernyataan saya ini tidak benar, saya bersedia menerima sanksi akademik baik berupa pencabutan gelar sarjana maupun tuntutan hukum.

Bandar Lampung, 23 Juli 2025

Penulis,



Yuliana Andriyani
NPM 2117021007

RIWAYAT HIDUP



Penulis merupakan anak pertama dari Bapak Andri Sulistiyo Nur Cahyono dan Ibu Denik Musrifah yang dilahirkan di Karanganyar, Solo, pada hari Senin, 4 November 2002.

Penulis menempuh pendidikan dasar di Sekolah Dasar (SD) Negeri 06 Malangjiwan pada tahun 2009 – 2015 dan pada tingkat menengah pertama di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 03 Colomadu pada tahun 2015 – 2018. Penulis

melanjutkan pendidikan tingkat menengah atas di Lampung Tengah, yaitu di Sekolah Menengah Atas (SMA) Negeri 1 Kotagajah pada tahun 2018 – 2021. Penulis menjadi mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur masuk Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) pada tahun 2021.

Selama menjalankan pendidikan akademik di Jurusan Biologi, penulis pernah menjadi asisten praktikum ekologi perairan. Penulis melakukan praktik kerja lapangan (PKL) di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Balai Veteriner Lampung pada tahun 2024 dengan judul **“Uji Cemaran Bakteri *Escherichia coli* Pada Sampel Daging Ayam Menggunakan Metode Enumerasi di Balai Veteriner Lampung”**. Penulis juga melakukan kuliah kerja nyata (KKN) di Desa Rajabasa Lama, Kecamatan Labuhan Ratu, Kabupaten Lampung Timur pada Juni – Agustus 2024.

Selain menjalankan kegiatan akademik, penulis aktif mengikuti organisasi, yaitu Himpunan Mahasiswa Biologi sebagai anggota Bidang Ekspedisi pada periode 2022. Penulis juga aktif dalam organisasi Universitas, yaitu UKM Penelitian Universitas Lampung periode 2022 – 2024. Penulis menjadi anggota Departemen Hubungan Luar dan Pengabdian Masyarakat pada periode 2022 dan menjadi sekretaris departemen pada periode 2023. Penulis melanjutkan keikutsertaannya dalam organisasi sebagai sekretaris umum UKM Penelitian pada periode 2024. Selama mengikuti organisasi, penulis berkontribusi dalam berbagai kepanitiaan kegiatan jurusan, universitas, nasional, dan mengikuti pelatihan keterampilan.

Hasil penelitian ini telah dipublikasikan pada Jurnal Biogenerasi (2025) 10 (2): 1009 - 1014, dengan judul “Amplifikasi Gen COI Pada Sampel Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah: Analisis Secara Kualitatif”.

PERSEMBAHAN

Bismillaahirrahmaanirrahiim.

Dengan mengucap Alhamdulillahirabbil'alamiin.

Saya persembahkan hasil karya ini dengan penuh kasih sayang kepada:

*Bapak, Ibu, dan keluarga yang telah memberikan dukungan, kasih, sayang,
menjadi motivasi, dan mengiringi langkah saya dengan do'a.*

*Bapak dan Ibu dosen yang telah memberikan bimbingan, ilmu, arahan, dan
pengalaman.*

*Teman-teman yang telah berjuang bersama dan saling memberikan dukungan
dan semangat.*

Almamater tercinta, Jurusan Biologi, Universitas Lampung.

MOTTO

"Diwajibkan atasmu berperang, padahal itu kamu benci. Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal itu baik bagimu dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu buruk bagimu. Allah mengetahui, sedangkan kamu tidak mengetahui."

(QS. Al-Baqarah: 216)

"Sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan."

(QS. Al-Insyirah: 6)

Tatag, teteg, tutug.

Each person's light is a precious one. In the dark night don't feel lonely like all the stars we shine. Don't disappear because our existence is a big one. Let us shine.

Mikrokosmos - BTS

When things get hard, stop for awhile and look back and see how far you've come. Don't forget how rewarding it is. You are the most beautiful flower, more than anyone else in this world.

– Kim Taehyung –

SANWACANA

Bismillaahirrahmaanirrahiim.

Assalaamu'alaikum Warahmatullaahi Wabarakaatuh.

Alhamdulillaahirabbil'alamiin.

Puji dan syukur penulis haturkan ke hadirat Allaah SWT. yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, inayah, nikmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi sebagai syarat dalam mencapai gelar Sarjana Sains.

Skripsi dengan judul **“Kajian Analisis Hasil Sekuensing Gen COI pada Individu Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah”** telah dilaksanakan pada bulan Oktober 2024 – Mei 2025, bekerja sama dengan Balai Veteriner Lampung.

Penulis menyadari bahwa selama proses penyusunan skripsi ini terdapat pihak-pihak yang berperan dalam memberikan dukungan dan bantuan kepada penulis. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., IP., ASEAN Eng., sebagai Rektor Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
3. Bapak Dr. Jani Master, S. Si., M. Si., sebagai Ketua Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung.
4. Ibu Kusuma Handayani, M. Si., sebagai Ketua Program Studi S-1 Biologi, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung.
5. Ibu Dzul Fithria Mumtazah, S.Si., M.Si., sebagai dosen pembimbing akademik.

6. Ibu Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc., sebagai Dosen Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, dukungan, arahan, dan ilmu pembelajaran kepada penulis dalam proses penelitian hingga penyusunan skripsi.
7. Bapak Priyambodo, S.Pd., M.Sc., sebagai Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, dukungan, dan arahan kepada penulis dalam proses penelitian hingga penyusunan skripsi.
8. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si., sebagai Dosen Penguji yang telah memberikan saran dan masukan kepada penulis dalam penyusunan skripsi.
9. Pemilik lahan yang telah memberikan izin untuk melakukan pengambilan sampel lebah tanpa sengat.
10. Kedua orang tua penulis, Bapak Andri Sulistiyo Nur Cahyono dan Ibu Denik Musrifah, serta keluarga yang telah mencurahkan kasih sayang, do'a, dan dukungan penuh kepada penulis selama proses pendidikan hingga penyusunan skripsi.
11. Bapak drh. Surnyantana, M.Si., sebagai Kepala Balai Veteriner Lampung yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian di Balai Veteriner Lampung.
12. Bapak drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc., Ibu drh. Enny Saswiyanti, M.Si., Bapak Firwantoni, Ibu drh. Fransiska Panasea Anggy, M.Sc., Ibu Dwi Ayu Febriani, A.Md., dan Ibu Ahyul Heni, S.ST., yang telah memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis dalam melakukan penelitian di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung.
13. Ibu Dian Neli Pratiwi, S.Si., M.Ling., yang telah membantu dan membimbing penulis dalam melakukan penelitian serta penyusunan skripsi.
14. Seluruh tenaga pendidik yang telah membantu selama masa perkuliahan.
15. Minanti Mayda Ashari sebagai *partner* penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi yang telah memberikan dukungan, bantuan, serta telah berjuang bersama dalam menyelesaikan skripsi.
16. Septi Wahyu Lestari, Shifa Sandra, Laila Salwa Azzahra, Ersya Imelda Adelia, Sevira Nur Azmi, Elfita Nova Yunior, dan Vidyanti Kurniasih sebagai teman seperjuangan penulis yang telah berjuang bersama dalam menyelesaikan skripsi.

17. Fasilia Putri Wulandari, Inas Falihah, Azizah Nur Isnaini, Mita Ardelia, Mela Liswida Sari, Lulu Lusita, dan Shelo Mitha Salma, sebagai teman penulis yang telah memberikan dukungan dan kebersamaan penulis.
18. Keluarga besar UKM Penelitian Universitas Lampung Periode 2022 – 2024 yang telah menjadi wadah bagi penulis untuk mengembangkan diri di luar perkuliahan.
19. Le-V yang telah bekerja sama setiap saat dengan baik dalam membantu proses perkuliahan hingga penyusunan skripsi.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan kesalahann, sehingga diperlukan kritik dan saran yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan ilmu pengetahuan.

Bandar Lampung, 23 Juli 2025

Penulis,

Yuliana Andriyani

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL	x
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
1.4 Kerangka Pemikiran	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Lebah	6
2.1.1 Lebah Tanpa Sengat	7
2.1.2 Morfologi dan Siklus Hidup Tanpa Sengat.....	8
2.1.3 Ekologi Lebah Tanpa Sengat	10
2.1.4 Manfaat Lebah Tanpa Sengat.....	12
2.1.5 Genetika Lebah Tanpa Sengat	13
2.2 Gen <i>Cytochrome Oxidase Subunit I</i> (COI).....	14
2.3 Analisis Molekuler	16
2.4 Analisis Sekuens <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA).....	19
2.5 Bioinformatika.....	20
III. METODE PENELITIAN	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2 Alat dan Bahan	22
3.3 Metode Penelitian.....	23
3.3.1 Persiapan dan Perizinan	23
3.3.2 Pengambilan Sampel Lebah Tanpa Sengat.....	23
3.3.3 Ekstraksi DNA Lebah Tanpa Sengat	25

3.3.4	Uji Kualitas DNA Lebah Tanpa Sengat.....	26
3.3.5	Optimasi Suhu <i>Annealing</i>	27
3.3.6	Amplifikasi DNA Lebah Tanpa Sengat	28
3.3.7	Elektroforesis dan Visualisasi DNA Lebah Tanpa Sengat	29
3.3.8	Sekuensing DNA.....	31
3.4	Analisis Data	31
3.4.1	Penyejajaran Urutan Basa Nukleotida	31
3.4.2	<i>Multiple Alignment Sequencing</i>	34
3.4.3	Analisis dan Visualisasi Jarak Genetik	36
3.5	Diagram Alir Penelitian.....	39
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1	Pengambilan Sampel Lebah Tanpa Sengat	40
4.2	Analisis Molekuler	40
4.3	Analisis Data	43
4.3.1	Penyejajaran Urutan Basa Nukleotida	43
4.3.2	Perbedaan Urutan Basa Nukleotida	44
4.3.3	Ketidakterbacaan Basa Nukleotida	47
4.3.4	Analisis dan Visualisasi Jarak Genetik	52
V.	SIMPULAN DAN SARAN	56
5.1	Simpulan.....	56
5.2	Saran	56
	DAFTAR PUSTAKA	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur tubuh lebah bersengat.	7
2. Sarang lebah tanpa sengat.	8
3. Struktur tubuh lebah tanpa sengat.	9
4. Peta lokasi pengambilan sampel.	24
5. Penggerusan sampel lebah tanpa sengat.	25
6. Proses penambahan DNA <i>template</i>	28
7. Proses <i>master mix</i>	28
8. Pemasangan katoda dan anoda.	30
9. Tampilan data sekuens.	32
10. Tahap <i>alignment</i> sekuens <i>forward</i> dan <i>reverse</i>	32
11. Tahap pemotongan situs awal.	33
12. Tahap pemotongan situs akhir.	33
13. Tahap memasukkan data sekuens ke dalam <i>notepad</i>	34
14. Tahap memasukkan data sekuens sampel.	35
15. Tahap <i>alignment</i> sekuens sampel.	35
16. Tahap pemotongan situs awal sekuens sampel.	36
17. Tahap pemotongan situs akhir sekuens sampel.	36
18. Tampilan urutan sekuens sampel.	37
19. Proses analisis jarak genetik.	37
20. Pengaturan konstruksi pohon filogenetik.	38
21. Proses konstruksi pohon filogenetik.	38
22. Diagram alir penelitian dengan judul “Kajian Analisis Hasil Sekuensing Gen COI pada Individu Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah”	39
23. Hasil optimasi suhu <i>annealing</i>	41

24. Visualisasi hasil amplifikasi sampel lebah tanpa sengat (M= <i>marker</i> , 1= Sampel 1, 2= Sampel 2, 3= Sampel 3, 4= Sampel 4).....	42
25. Elektroferogram sampel lebah tanpa sengat.	50
26. Elektroferogram sampel lebah tanpa sengat.	51
27. Elektroferogram sampel lebah tanpa sengat.	51
28. Visualisasi jarak genetik sampel lebah tanpa sengat.	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sekuen Primer LCO1490 dan HCO2198.....	29
2. Perbedaan urutan basa nukleotida.....	45
3. Ketidakterbacaan basa nukleotida.....	48
4. Hasil analisis jarak genetik	52

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki iklim tropis yang mendukung tingginya keanekaragaman flora dan fauna (KemenLHK, 2020). Kekayaan flora di Indonesia meliputi 30.000 – 40.000 jenis tumbuhan berbunga, 91.251 jenis tumbuhan berspora, dan 120 jenis tumbuhan *Gymnospermae*. Keanekaragaman fauna Indonesia mencakup 151.847 jenis serangga yang 30.000 di antaranya berasal dari *Order Hymenoptera* (KemenPPN/BAPPENAS, 2016). Flora dan fauna erat kaitannya dengan ekosistem, baik ekosistem alami maupun buatan. Indonesia memiliki 19 tipe ekosistem meliputi ekosistem alami dan buatan dengan 74 tipe vegetasi yang tersebar di berbagai wilayah Indonesia. Ekosistem terdiri atas berbagai macam flora, fauna, dan mikroba yang hidup berdampingan dan membentuk hubungan yang kompleks (Kartawinata, 2013).

Tumbuhan berperan sebagai sumber pakan bagi hewan, termasuk lebah yang berasal dari *Order Hymenoptera*. Terdapat dua kelompok lebah yang terdiri dari lebah bersengat dan lebah tanpa sengat (*stingless bee*) (Harmain dkk., 2022). Indonesia memiliki keanekaragaman lebah tanpa sengat berjumlah 46 jenis dan 23 di antaranya dapat ditemukan di Sumatera. Nama daerah dimiliki oleh lebah tanpa sengat, di antaranya kelulut di Riau dan Sumatera Selatan, klanceng di Jawa, serta galo-galo di Sumatera Barat (Priawandiputra dkk., 2020). Lebah tanpa sengat termasuk ke dalam *Sub Family Meliponinae* dan hidup secara *eusocial* dengan membentuk koloni (Achyani dan Wicandra, 2019).

Koloni lebah tanpa sengat dapat ditemukan di pemukiman melalui proses budidaya. Lebah tanpa sengat telah banyak dibudidayakan karena memiliki peran ekologis dan nilai ekonomi yang tinggi. Lebah tanpa sengat berperan sebagai penyerbuk utama dalam ekosistem yang dapat meningkatkan kualitas produk tumbuhan. Nilai ekonomi yang tinggi berasal dari madu dan propolis yang dihasilkan oleh lebah tanpa sengat serta bermanfaat bagi kesehatan manusia. Propolis yang dihasilkan lebah tanpa sengat memiliki jumlah empat kali lebih tinggi dibandingkan lebah bersengat sehingga sangat bermanfaat untuk dibudidayakan (Priawandiputra dkk., 2020).

Karakteristik morfologi lebah tanpa sengat bersifat kompleks, sehingga sulit untuk dilakukan identifikasi (Sayusti *et al.*, 2023). Pengelompokan berdasarkan karakter morfologi bersifat kurang akurat karena karakter generatif suatu spesies tidak terlihat sepenuhnya. Tingkat evolusi suatu spesies tidak dapat diketahui melalui analisis karakter morfologi. Data morfologi dapat didukung dengan menggunakan DNA sebagai penanda molekuler untuk identifikasi dan pengelompokan spesies. Penanda molekuler digunakan dalam proses amplifikasi DNA yang telah diisolasi untuk selanjutnya dilakukan sekuensing serta dianalisis untuk mendapatkan pohon filogenetik (Lestari dkk., 2018).

Analisis molekuler dapat mendukung hasil identifikasi morfologi yang memiliki variasi intraspesifik. Gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI) telah banyak digunakan dalam analisis molekuler (Ariyanti dan Farajallah, 2019). Gen COI terdapat pada DNA mitokondria (Zein, 2018) dan memiliki sifat yang stabil dalam mengkode asam amino (Wulandari dkk., 2019). Wilayah lestar gen COI yang luas dan homologi yang tinggi menjadi daya dukung penggunaan gen COI untuk melakukan analisis terhadap sekuens. Tingkat konservasi yang dimiliki oleh gen COI yang tinggi dan variasi genetik yang sederhana menjadi kelebihan gen COI sebagai penanda molekuler dalam melakukan analisis molekuler (Bingpeng *et al.*, 2018).

Penanda gen COI telah berhasil digunakan dalam menunjukkan jarak genetik pada sampel serangga laut (Maramis dan Warou, 2014), lebah tanpa sengat (Sayusti *et al.*, 2023), dan *Spodoptera frugiperda* (Widarti dkk., 2022).

Keberhasilan tersebut bermakna bahwa gen COI dapat berperan baik sebagai penanda molekuler dalam melakukan analisis molekuler. Penelitian yang dilakukan melalui analisis molekuler, akan didapatkan sampel DNA murni yang akan dilanjutkan pada proses sekuensing (Darmawan dkk., 2024). Hasil yang didapatkan dari proses sekuensing berupa sekuens DNA atau susunan basa nukleotida dan kurva elektroferogram yang selanjutnya dilakukan analisis (Aisyah dkk., 2021).

Sekuens yang diperoleh terdiri dari sekuens *reverse* dan *forward* serta elektroferogramnya. Elektroferogram berupa kurva dengan puncak spektrum yang menunjukkan basa nukleotida tertentu. Kualitas elektroferogram yang baik ditunjukkan dengan spektrum yang tinggi dan menunjukkan satu basa nukleotida. (Mawardi dkk., 2018). Puncak elektroferogram yang jelas dan tidak terjadi tumpang tindih antara satu puncak dengan puncak lainnya menunjukkan kualitas elektroferogram yang baik (Taariwuan dkk., 2021). Elektroferogram digunakan sebagai konfirmasi basa nukleotida untuk mendapatkan sekuens DNA yang tepat. Sekuens DNA sampel dilakukan penyejajaran dan analisis untuk mengetahui variasi basa nukleotida dan jarak kekerabatan antara sekuens yang digunakan (Muliani dkk., 2020).

Spesies lebah tanpa sengat dapat diketahui jarak kekerabatannya melalui analisis perbandingan sekuens dan jarak genetik. Sumatera memiliki keanekaragaman lebah tanpa sengat, termasuk Lampung di dalamnya. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya penelitian yang telah dilakukan di Provinsi Lampung, seperti di Lampung Selatan (Rudini dkk., 2024), Lampung Timur (Filly, 2018), dan Pesawaran (Priyambodo dkk., 2023), serta terdapat peternakan lebah di Bandar Lampung (Purnama, 2021). Adanya keanekaragaman lebah tanpa sengat di Lampung memerlukan identifikasi menggunakan analisis molekuler, termasuk di Lampung Tengah. Proses

analisis yang dilakukan dapat bermanfaat untuk mengetahui jenis dan hubungan kekerabatan lebah tanpa sengat di Provinsi Lampung Tengah berdasarkan gen COI.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui variasi basa nukleotida pada hasil sekuensing DNA individu lebah tanpa sengat di Lampung Tengah berdasarkan gen COI.
2. Mengetahui jarak genetik individu lebah tanpa sengat di Lampung Tengah berdasarkan gen COI.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk pengetahuan di masa mendatang, terutama sebagai sumber informasi dalam mengetahui variasi basa nukleotida dan jarak kekerabatan lebah tanpa sengat.

1.4 Kerangka Pemikiran

Indonesia memiliki kawasan hutan yang luas dengan berbagai flora dan fauna yang hidup di dalamnya. Di antara flora yang ada, terdapat berbagai jenis tumbuhan berbunga yang memerlukan proses penyerbukan. Di alam, penyerbukan pada tumbuhan berbunga dapat dibantu oleh berbagai agen polinator, salah satunya lebah. Lebah pada umumnya menghasilkan madu dan memiliki sengat yang dapat melindungi dirinya. Sengat pada lebah dapat membahayakan. Kelompok lebah tanpa sengat banyak dibudidayakan karena tidak memiliki sengat yang membahayakan peternaknya dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi.

Lebah tanpa sengat memiliki keanekaragaman jenis yang tinggi serta memberikan manfaat bagi alam maupun manusia. Jenis lebah tanpa sengat dapat diketahui dengan melakukan analisis secara morfologi dan molekuler. Hasil yang akurat akan diperoleh dengan melakukan analisis secara molekuler. Analisis molekuler dilakukan dengan menggunakan gen dari luar sebagai penanda molekuler. Salah satu gen yang banyak dan sering digunakan untuk analisis keanekaragaman makhluk hidup adalah gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI). Gen COI memiliki sifat yang stabil dan dapat representatif terhadap genom DNA mitokondria.

Ekstraksi dilakukan pada individu lebah tanpa sengat untuk mendapatkan DNA yang ada di dalamnya. Proses analisis molekuler dilakukan dengan teknik PCR untuk mendapatkan hasil sekuens DNA lebah tanpa sengat dari proses elektroforesis. Sekuens yang didapatkan kemudian dilanjutkan proses analisis menggunakan perangkat lunak bioinformatika untuk mengetahui kualitas sekuens sampel lebah tanpa sengat yang dikoleksi di Lampung Tengah. Hasil analisis sekuensing yang diperoleh dapat menunjukkan variasi basa nukleotida dan jarak genetik setiap sekuens sampel.

II. TINJAUAN PUSTAKA

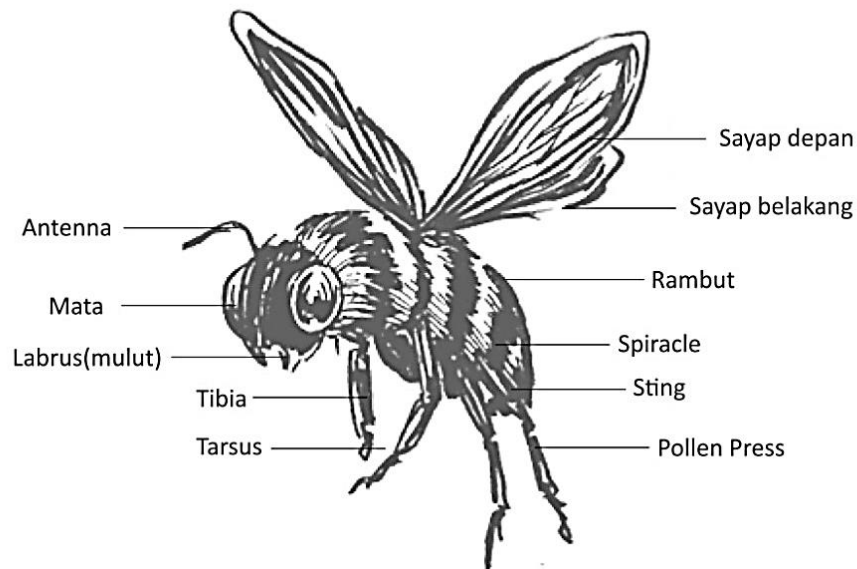
2.1 Lebah

Lebah dapat dibedakan menjadi kelompok lebah bersengat dan lebah tanpa sengat. Lebah bersengat lebih umum dikenal oleh masyarakat, seperti *Apis*. Lebah tanpa sengat, salah satunya *Trigona* diketahui hidup pada masa prasejarah dengan tubuh primitifnya. Dengan demikian, lebah tanpa sengat merupakan lebah tertua yang hidup pada zaman prasejarah. Hal tersebut dibuktikan dengan penemuan fosil lebah *Trigona prisca* sejak 96 – 74 juta tahun yang lalu. Lebah bersengat dan lebah tanpa sengat menghasilkan madu dan propolis yang memiliki nilai ekonomi (Fadhilah dan Rizkika, 2015).

Lebah bersengat dan lebah tanpa sengat dapat dibedakan dengan pengamatan secara anatomi. Lebah bersengat memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan lebah tanpa sengat, memiliki sengat sebagai upaya pertahanan dirinya dan akan terlepas jika digunakan yang menyebabkan lebah tersebut mati. Bentuk pertahanan diri lebah tanpa sengat tidak menggunakan sengat, melainkan memiliki cairan asam yang dapat disemprotkan. Lebah tanpa sengat cenderung lebih aman untuk dibudidayakan dibandingkan dengan lebah bersengat yang dapat membahayakan (Rudini dkk., 2024).

Lebah bersengat *Apis* sp. umumnya memiliki *caput* dan *thorax* berwarna cokelat dengan *abdomen* berwarna kuning kecokelatan disertai garis hitam berjumlah empat buah. Lebah dewasa memiliki tubuh hitam dan pada *abdomennya* terdapat empat buah garis berwarna kuning. Lebah tanpa sengat *Tetragonula* sp. memiliki warna tubuh yang beragam. *Caput* lebah tanpa

sengat dapat berwarna cokelat atau hitam dengan *thorax* dan *abdomen* berwarna kuning, cokelat, atau hitam. Lebah *Apis* sp. memiliki ukuran *caput* dan *thorax* yang lebih besar dibandingkan lebah *Tetragonula* sp. (Purba dkk., 2023) (Gambar 1).



Gambar 1. Struktur tubuh lebah bersengat (Rosadi, 2021).

2.1.1 Lebah Tanpa Sengat

Lebah tanpa sengat termasuk ke dalam *Ordo* Hymenoptera dan *Family* Apidae yang hidup secara berkoloni. Koloni lebah tanpa sengat dapat berjumlah antara 300 – 80.000 individu lebah. Habitat lebah tanpa sengat berada di daerah beriklim tropis dan subtropis, mencakup Indonesia di Sumatra, Kalimantan, Jawa, dan Bali. Alat pertahanan diri lebah tanpa sengat adalah propolis yang dapat melindungi sarang dari predator sekaligus berperan dalam menjaga stabilitas suhu di dalam sarangnya. Sarang lebah tanpa sengat umumnya berada di dalam lubang pohon, celah dinding, atau di dalam lubang bambu (Achyani dan Wicandra, 2019).

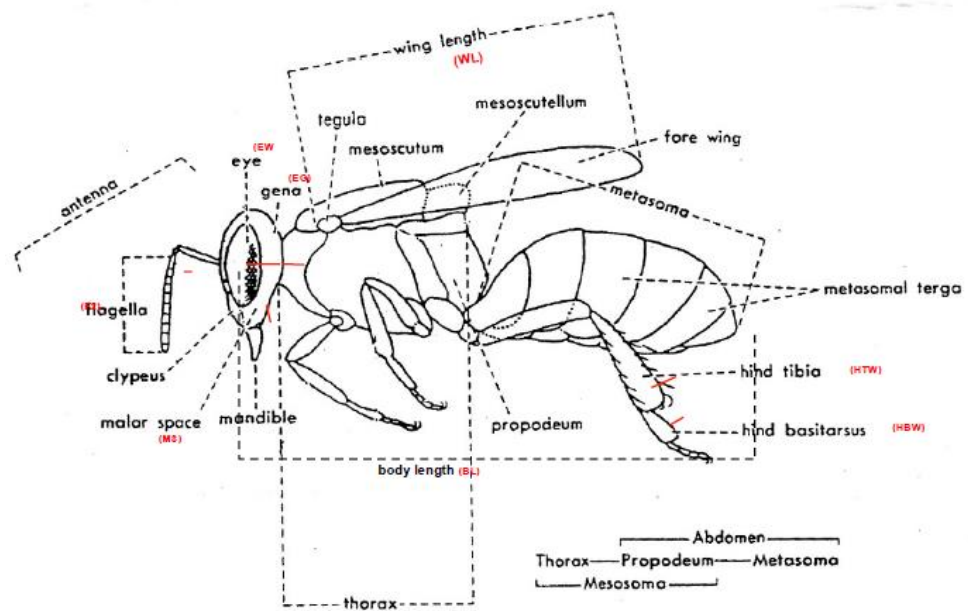
Koloni lebah tanpa sengat dapat ditemukan di hutan maupun pemukiman. Tanda koloni yang dapat ditemukan di alam di antaranya seperti lubang pada pohon, tanda hitam yang berasal dari resin tumbuhan, struktur corong, serta aktivitas lebah tanpa sengat yang keluar masuk sarang. Koloni lebah tanpa sengat di pemukiman dapat ditemukan pada rumah masyarakat yang terbuat dari kayu atau bambu. Terdapat lebih dari 600 jenis lebah tanpa sengat yang hidup di seluruh dunia. Proses identifikasi melalui pengamatan morfologi dan DNA *barcoding* perlu dilakukan untuk mengetahui jenis lebah tanpa sengat (Priawandiputra dkk., 2020) (Gambar 2).



Gambar 2. Sarang lebah tanpa sengat (Priawandiputra dkk., 2020).

2.1.2 Morfologi dan Siklus Hidup Tanpa Sengat

Struktur tubuh lebah tanpa sengat terbagi menjadi tiga bagian yang terdiri dari *caput*, *thorax*, dan *abdomen*. Kepala lebah tanpa sengat terdapat dua jenis mata, yaitu mata oseli dan mata majemuk serta satu pasang antena. Bagian *thorax* terletak di antara kepala dan abdomen. *Thorax* memiliki tiga pasang tungkai yang terdiri dari tungkai depan, tungkai tengah, dan tungkai belakang, serta dua pasang sayap (Gambar 3) (Harjanto dkk., 2020).



Gambar 3. Struktur tubuh lebah tanpa sengat (Sakagami *et al.*, 1990).

Lebah tanpa sengat mencakup empat puluh marga yang ada di Indonesia, di antaranya seperti *Geniotrigona*, *Heterotrigona*, *Lepidotrigona*, dan *Tetragonula* (Harjanto dkk., 2020). Tubuh lebah tanpa sengat memiliki warna tubuh yang beragam, seperti hitam, kekuningan, dan kemerahan. Mulut lebah tanpa sengat berfungsi sebagai alat penghisap nektar untuk dikumpulkan di dalam sarangnya. Gigitan lebah tanpa sengat tidak terasa sakit karena jenis giginya yang tidak tajam. Tungkai lebah tanpa sengat memiliki ruas dan pada tungkai belakangnya berambut dengan pola seperti keranjang. Sepasang tungkai belakang berfungsi sebagai tempat mengumpulkan *bee pollen* dan getah. Ukuran tubuh yang kecil menyebabkan lebah tanpa sengat terbang pelan dan tidak menimbulkan kebisingan (Achyani dan Wicandra, 2019).

Siklus hidup lebah tanpa sengat terbagi menjadi tiga stadia, yaitu larva, kepompong, dan dewasa. Stadium larva terjadi ketika telur yang dihasilkan oleh lebah telah berkembang selama tiga hari. Larva dirawat oleh lebah pekerja dan diberi makan berupa *royal jelly* dengan campuran *pollen* dan nektar. Stadium kepompong terjadi ketika larva

berkembang menjadi kepompong untuk dapat membentuk tubuh lebah sempurna. Pada stadium lebah dewasa terjadi masa kawin di mana lebah jantan membuahi ratu lebah untuk menghasilkan keturunan (Achyani dan Wicandra, 2019).

2.1.3 Ekologi Lebah Tanpa Sengat

Lebah tanpa sengat hidup di alam secara sosial dengan membentuk kelompok atau koloni yang terdiri dari tiga strata. Strata lebah mencakup lebah ratu, lebah pejantan, dan lebah pekerja yang saling bergotong royong (Achyani dan Wicandra, 2019). Dalam satu kelompok lebah pada umumnya terdapat satu atau lebih ratu lebah, ratusan lebah jantan (*drone*), dan ratusan hingga ribuan lebah pekerja. Ratu lebah memiliki peran sebagai pemimpin koloni dan bertelur. Lebah jantan berasal dari telur yang tidak dibuahi, sedangkan lebah pekerja berasal dari telur yang dibuahi dan berkelamin betina (Harjanto dkk., 2020).

Lebah ratu bertelur pada kantung telur yang dibuat oleh lebah pekerja dan telah berisi makanan. Telur yang dihasilkan oleh lebah ratu dapat mencapai jumlah ribuan dan kemudian akan menjadi lebah pekerja. Lebah pekerja hanya berumur sampai dua bulan, tetapi memiliki peran yang sangat penting dalam koloni, mencakup menjaga koloni, mencari *pollen* dan nektar, serta merawat sarang lebah. Koloni dan sarang lebah dijaga oleh lebah pekerja yang terbang di depan pintu masuk dan memanfaatkan resin tumbuhan di kakinya sebagai senjata. Lebah jantan memiliki peran dalam mengawini lebah ratu yang kemudian akan mati setelah melakukan proses kawin (Achyani dan Wicandra, 2019).

Peran utama lebah tanpa sengat di dalam ekologi adalah sebagai agen penyerbukan atau *pollinator*. Penyerbukan pada tumbuhan berbunga dibantu ketika lebah tanpa sengat hinggap atau menyinggahi tumbuhan

tersebut sehingga buah yang dihasilkan memiliki kualitas yang tinggi. Selama proses penyerbukan terjadi simbiosis mutualisme karena lebah tanpa sengat mendapatkan makanan dari tumbuhan berbunga yang disinggahi dan tumbuhan berbunga terbantu penyerbukannya. Kondisi ekologi suatu ekosistem juga akan terjaga melalui proses penyerbukan tumbuhan berbunga yang berjalan dengan baik dan menjaga kelestarian tumbuhan (Achyani dan Wicandra, 2019). Lebah yang hinggap pada tumbuhan berbunga memiliki potensi untuk memindahkan serbuk sari ke kepala putik sehingga terjadi penyerbukan (Herlinda dan Sari, 2022).

Habitat lebah tanpa sengat pada umumnya berada di area yang mencakup tumbuhan berbunga yang memiliki nektar dan *pollen* sebagai sumber pakannya. Koloni lebah tanpa sengat hidup di dalam sarang yang memiliki *entrance* atau tempat keluar dan masuk sarang. Selain sebagai tempat keluar dan masuk lebah tanpa sengat, *entrance* juga dapat digunakan sebagai alat atau perantara untuk identifikasi jenis lebah tanpa sengat di dalam sarang tersebut. Terdapat tiga jenis *entrance* seperti bentuk corong, kantung, ataupun propolis yang mengelilingi suatu lubang (Sadam dkk., 2016).

Aktivitas lebah tanpa sengat dimulai dari pagi hari sampai sore hari, mencakup aktivitas mencari nektar, serbuk sari, dan propolis sebagai sumber pakan dan material sarang. Kelompok lebah pekerja akan menjelajah lingkungan di sekitar sarang untuk mencari keberadaan sumber pakan dan material sarang. Nektar, serbuk sari, dan propolis kemudian dipanen oleh kelompok lebah pengumpul. Lebah pengumpul akan membawa nektar dengan cara memasukkan ke dalam kantung di dalam tubuhnya yang disebut dengan *crop*. Serbuk sari dan propolis dibawa pada *pollen basket* yang terletak di bagian tibia kaki belakang (Harjanto dkk., 2020).

Perilaku lebah tanpa sengat dari pagi hingga sore hari mencakup keluar sarang dan masuk sarang dengan membawa *pollen* serta nektar. Aktivitas mencari nektar dan *pollen* tidak dilakukan secara bersamaan, karena lebah tanpa sengat hanya melakukan satu aktivitas dalam satu kali terbang. Lebah tanpa sengat banyak melakukan perilaku keluar sarang pada pagi hari dikarenakan melakukan aktivitas mencari *pollen*. Perilaku pada sore hari dilakukan dengan tujuan membawa resin dan membersihkan sarang lebah. Aktivitas lebah tanpa sengat dipengaruhi oleh kemampuan nalurinya untuk merespon perubahan faktor lingkungan yang berupa suhu dan kelembaban (Prasetyo dkk., 2022).

2.1.4 Manfaat Lebah Tanpa Sengat

Lebah tanpa sengat berperan sebagai agen penyerbuk bagi tumbuhan berbunga di habitat alaminya. Lebah tanpa sengat dapat menghasilkan madu dan propolis yang dapat bermanfaat bagi kesehatan manusia. Propolis yang dihasilkan oleh lebah tanpa sengat memiliki jumlah yang lebih banyak daripada lebah bersengat. Kandungan yang terdapat di dalam propolis yaitu antioksidan dan fenol yang dapat dimanfaatkan sebagai obat berbagai penyakit serta bernilai ekonomi (Priawandiputra dkk., 2020).

Lebah *Trigona* merupakan salah satu dari kelompok lebah tanpa sengat. Kelompok lebah ini memiliki peran utama di lingkungan sekitar sarangnya sebagai agen penyerbukan. Sehingga lingkungan di sekitar sarang *Trigona* memiliki keanekaragaman tumbuhan berbunga sebagai sumber pakannya. Selain polinator, lebah ini juga memberikan manfaat berupa menghasilkan madu dan propolis yang dapat dimanfaatkan oleh manusia. Budidaya lebah tanpa sengat telah banyak dilakukan mengingat pentingnya lebah tanpa sengat bagi alam dan manusia (Nugroho dan Soesilohadi, 2014).

Madu sebagai salah satu hasil produk lebah tanpa sengat memiliki kandungan antioksidan. Antioksidan berperan untuk menyingkirkan radikal bebas yang berada di dalam tubuh manusia yang dapat menjadi pemicu kanker. Di dalam sarang terdapat getah alami yang dihasilkan oleh lebah madu atau disebut dengan propolis. Propolis berwarna coklat kehijauan sebagai pelindung sarang lebah tanpa sengat. Peran propolis juga dapat dirasakan oleh manusia karena dapat sebagai obat luka, anti kanker, dan menurunkan tekanan darah. Serbuk sari dan nektar dari tumbuhan berbunga serta air liur lebah yang digabungkan akan membentuk *pollen* yang di dalamnya terkandung protein, karbohidrat, lemak, asam amino, vitamin, mineral, dan enzim (Achyani dan Wicandra, 2019).

2.1.5 Genetika Lebah Tanpa Sengat

Deoxyribonucleic Acid (DNA) merupakan polimer yang tersusun dari gula pentosa berupa deoksiribosa, basa nukleotida yang terdiri atas basa purin (adenin dan guanin) dan pirimidin (*tymin* dan *cytosin*), serta gugus fosfat. DNA berisi informasi genetik suatu makhluk hidup dan dapat menentukan karakteristiknya (Effendi, 2020). DNA akan melilit protein histon yang kemudian membentuk kromosom. Protein histon mengandung asam amino berupa arginin dan lisin sehingga merupakan protein yang bersifat basa yang berperan dalam menjaga struktur dan kerja dari kromatin. Kromatin merupakan benang yang terbentuk dari lilitan antara DNA dan protein histon (Nusantari, 2015).

Jenis kelamin lebah ditentukan berdasarkan sifat ploidi yang dimilikinya, karena lebah dapat menghasilkan individu baru tanpa melalui pembuahan atau parthenogenesis (Malik, 2019). Tipe ploidi dapat dibedakan menjadi dua, yaitu diploid ($2n$) dengan jumlah 32 kromosom dan haploid (n) dengan jumlah 16 kromosom (Supeno dan Erwan, 2016)). Lebah jantan hanya memiliki tipe kromosom haploid

atau satu set kromosom karena berasal dari telur yang tidak dibuahi. Lebah betina yang berasal dari telur yang dibuahi memiliki tipe kromosom diploid atau memiliki dua set kromosom. Peran lebah betina akan ditentukan berdasarkan pakan yang dikonsumsi selama lebah berada pada fase larva. Lebah ratu akan diberi pakan berupa *royal jelly*, sedangkan jenis pakan pada lebah pekerja berupa *pollen* (Fadhilah dan Rizkika, 2015).

2.2 Gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI)

Di dalam DNA mitokondria (mtDNA) terdapat satu jenis gen yang disebut dengan gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI). Gen COI yang berperan dalam mengkode susunan asam amino dan protein bersifat stabil. Stabilitas gen COI ditandai dengan sedikitnya substitusi yang terjadi pada susunan asam amino dan protein yang dikode oleh gen COI. Hal tersebut yang menyebabkan gen COI dapat digunakan sebagai penanda dalam melakukan analisis filogenetik. Penanda gen COI dapat memberikan konstruksi filogenetik pada tingkat spesies (Wulandari dkk., 2019).

Gen COI digunakan dalam sistematika molekuler untuk menentukan struktur filogenetik suatu makhluk hidup. Fragmen yang sering digunakan berada di wilayah dekat ujung 5'. Fragmen pada wilayah 3' dan wilayah pusat juga dapat digunakan dalam menentukan filogenetik. Fragmen yang digunakan dapat menghasilkan konservasi dengan tingkat yang berbeda pada setiap kelompok yang diteliti. Hasil analisis yang didapatkan dengan menggunakan satu wilayah gen lebih baik daripada dengan menggunakan lebih banyak wilayah dari gen yang sama (Souza dkk., 2016).

Primer gen COI yang digunakan pada spesies sampel dapat menunjukkan jarak genetik basa-basa nukleotida satu sama lainnya. Jarak genetik suatu spesies dengan spesies pembanding dapat diketahui dengan analisis jarak

genetik. Dari jarak genetik yang diperoleh tersebut kemudian dilakukan konstruksi untuk mendapatkan pohon filogenetik. Pohon filogenetik digunakan untuk menganalisis hubungan kekerabatan dari suatu spesies. Teknik ini dilakukan melalui analisis secara molekuler dengan tingkat keakuratan tinggi yang dapat mengetahui kekerabatan suatu spesies dengan spesies lainnya (Muliani dkk., 2020).

Gen COI telah banyak digunakan untuk melakukan analisis molekuler dan dapat menunjukkan hubungan kekerabatan suatu spesies. Aisyah dkk. (2021) telah melakukan penelitian dengan menggunakan gen COI untuk melakukan identifikasi ikan hiu dengan menggunakan sampel potongan daging dari siripnya. Sampel sirip ikan hiu berhasil diidentifikasi dan menunjukkan kekerabatan yang dekat dengan spesies *Chiloscyllium punctatum* dengan kemiripan mencapai 100%. Analisis molekuler dengan gen COI juga telah dilakukan oleh Arian, dkk. (2016) dengan menggunakan sampel jaringan kaki katak pohon (*Polypedates leucomystax*).

Kusuma, dkk. (2024) melakukan analisis filogenetik terhadap ikan kotes (*Channa gachua*) dan ikan kutuk (*Channa striata*) yang dikoleksi dari Jawa Timur berdasarkan gen COI. Penelitian tersebut menunjukkan sampel ikan kotes berkerabat dekat dengan *C. gachua* dari Jawa Barat sedangkan sampel ikan kutuk berkerabat dekat dengan *C. striata* dari Amerika. Hubungan kekerabatan serangga laut Gerridar yang diisolasi dari pesisir Pantai Mokupa, Sulawesi Utara telah berhasil diketahui dengan menggunakan primer gen COI yang menunjukkan tingkat identik 87% dengan *Rhagovelia tenuipes*, (Maramis dan Warou, 2014). Sayusti, dkk. (2023) telah melakukan identifikasi lebah tanpa sengat yang dikoleksi dari Jambi, Bogor, dan Banten secara molekuler dengan berdasarkan gen COI.

Gen COI dapat digunakan dalam menentukan kekerabatan pada suborder Heteroptera, Family Coreidae dan Pentatomidae. Souza, et al. (2016) melakukan analisis komposisi nukleotida gen COI pada tiga wilayah, yaitu

wilayah 5', wilayah pusat, dan wilayah 3'. Widarti, dkk. (2022) menggunakan sekuen gen COI untuk melakukan identifikasi dan menyusun pohon filogenetik *Spodoptera frugiperda* asal Jawa. Sampel yang digunakan menunjukkan hubungan kekerabatan dengan spesies yang berasal dari Sumatera Barat, China, Korea, dan India. Gen COI juga dapat digunakan untuk melakukan analisis filogenetik pada sapi, seperti yang telah dilakukan oleh Wulandari, dkk. (2019) dan berhasil menunjukkan kekerabatan sapi lokal Indonesia.

2.3 Analisis Molekuler

Analisis molekuler merupakan suatu teknik analisis dengan menggunakan pendekatan berdasarkan DNA. Analisis molekuler dilakukan dengan melalui 4 tahapan, yaitu ekstraksi DNA, PCR, sekuensing, dan analisis data hasil sekuensing. DNA yang diekstraksi berasal dari sampel yang akan digunakan dan dilanjutkan dengan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Di dalam PCR terdapat tahapan elektroforesis yang dapat menunjukkan hasil PCR, di mana pita tunggal menjadi hasil produk PCR yang diharapkan. Pita tunggal kemudian disekuensing untuk membentuk urutan basa nukleotida (Fitrian dkk., 2020).

Proses identifikasi makhluk hidup dapat dilakukan melalui proses analisis molekuler menggunakan DNA. Proses ini dilakukan dengan melalui tahap isolasi, amplifikasi, dan visualisasi DNA. Isolasi dilakukan dengan mengambil sampel DNA suatu makhluk hidup yang kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR. Hasil amplifikasi tersebut akan dilanjutkan dengan proses elektroforesis bersama larutan gel *agarose* untuk mendapatkan hasil visualisasi DNA (Widarti dkk., 2022).

Ekstraksi DNA pada hewan dapat dilakukan dengan menggunakan DNA kromosom dan DNA mitokondria. DNA kromosom terletak di dalam inti sel,

sedangkan DNA mitokondria pada organel mitokondria. Proses ekstraksi diawali dengan tahap pelisisan sel yang bertujuan untuk memecahkan membran dan organel sel sehingga didapatkan DNA murni tanpa ada komponen lainnya. Proses ekstraksi melibatkan tahap lisis menggunakan enzim proteinase-K digunakan pada tahap lisis untuk melakukan hidrolisis protein membran secara enzimatik dan etanol untuk proses presipitasi DNA (Maksum dkk., 2017).

Teknik PCR dilakukan secara *in vitro* untuk melakukan sintesis dan amplifikasi terhadap DNA. Segmen DNA akan diamplifikasi dalam jumlah yang banyak hanya dengan waktu yang singkat (Setyawati dan Zubaidah, 2021). Perbanyakan DNA dilakukan melalui proses amplifikasi enzimatik pada fragmen DNA yang berada di antara dua primer yang digunakan. DNA baru akan disintesis oleh DNA polimerase yang dimulai pada ujung 3' di setiap primernya. Program PCR terdiri atas 3 tahap utama yang meliputi denaturasi, *annealing*, dan *extension* serta terdapat penambahan dua tahapan yang meliputi *pre-denaturasi* dan *post-extension* (Mursyidin, 2024).

Pre-denaturasi bertujuan untuk memastikan terdenaturasinya cetakan DNA secara sempurna dan dilakukan sebelum siklus berjalan. Siklus PCR dimulai dengan tahap denaturasi yang bertujuan untuk memisahkan untai cetakan DNA dan berlangsung selama paling lama 60 detik. Kemudian dilanjutkan dengan tahap *annealing* yang bertujuan untuk proses penempelan primer pada cetakan DNA dengan suhu yang menyesuaikan kandungan primer. Tahap berikutnya yaitu *extension* yang merupakan proses perpanjangan untai DNA dengan waktu yang bergantung pada panjang sekuens DNA target. Proses PCR diakhiri dengan *post-extension* yang bertujuan untuk memastikan hasil perpanjangan DNA telah selesai yang dilakukan selama 5 - 10 menit (Mursyidin, 2024).

Primer merupakan urutan basa nukleotida DNA yang bersifat spesifik dan akan menempel pada sekuens target. Primer yang digunakan berpengaruh

terhadap keberhasilan proses amplifikasi. Sifat spesifik primer berfungsi untuk membatasi fragmen DNA target yang sesuai dengan primer. Basa nukleotida pada primer umumnya berkisar antara 18 – 30 basa. Proses penempelan primer yang terjadi pada sekuens target memerlukan suhu yang tepat dan optimum. Suhu yang tepat diperoleh melalui perhitungan *melting temperature* (T_m) (Rahmawati dan Shabrina, 2024).

Melting temperature (T_m) atau suhu leleh merupakan suhu yang diperlukan oleh separuh primer untuk saling melepas ikatan. T_m umumnya berkisar antara 50 – 65°C yang dihitung berdasarkan basa nukleotidanya. Suhu leleh yang di atas 65°C dapat menurunkan efektivitas *annealing* dalam proses amplifikasi. Perhitungan T_m dilakukan berdasarkan jumlah basa nukleotida pada primer menggunakan rumus $T_m (^{\circ}\text{C}) = ((G+C) \times 4) + ((A+T) \times 2)$. Hasil dari perhitungan *melting temperature* kemudian digunakan dalam menentukan suhu *annealing* (Rahmawati dan Shabrina, 2024).

Sekuens hasil PCR kemudian divisualisasikan dengan bantuan gel *agarose* pada proses elektroforesis. Elektroforesis merupakan proses untuk memisahkan makromolekul DNA dengan berdasarkan pada ukuran dan muatan molekul dalam suatu larutan. Molekul akan bergerak menuju arah dengan muatan dan kecepatan yang berbeda pada gel. Gel *agarose* digunakan dalam proses elektroforesis karena termasuk golongan polisakarida dan merupakan matriks dengan molekul yang menyatu oleh ikatan hidrogen. DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke arah kutub elektroda positif saat proses telah berjalan (Adhiyanto dkk., 2020).

Elektroforesis yang dilakukan bertujuan untuk memisahkan senyawa bermuatan dengan bantuan medan listrik (Harahap, 2018). Menurut Ramadhani dkk. (2024), proses elektroforesis akan menghasilkan pita-pita DNA dengan ketebalan sesuai berat dan jumlah DNA. Gel *agarose* yang diamati di bawah sinari ultraviolet akan terlihat pita berwarna putih di atas gel yang menunjukkan kualitas DNA hasil amplifikasi (Tanzil dan Fanata, 2024).

Indikator kualitas DNA hasil amplifikasi yang baik yaitu apabila hanya terdapat satu pita DNA yang terbentuk dan tidak adanya *smear* (Wasdili dan Gartinah, 2018). Pita DNA yang terlihat secara jelas juga menunjukkan kualitas DNA yang baik (Novitasari dkk., 2014).

2.4 Analisis Sekuens *Deoxyribonucleic Acid* (DNA)

Deoxyribonucleic Acid (DNA) yang terdapat di dalam tubuh organisme dapat digunakan sebagai karakter identifikasi. Melalui proses sekuensing, akan didapatkan sekuens DNA (Sari dkk., 2023). Sekuens DNA merupakan urutan nukleotida yang berisi informasi genetik. Basa nukleotida ditampilkan berupa huruf-huruf A-C-G-T yang merepresentasikan struktur molekul DNA. Setiap huruf akan mewakili masing-masing basa nukleotida, yaitu adenin, sitosin, guanin, dan timin (Rahmawati dan Shabrina, 2024).

Sekuens DNA yang didapatkan dari hasil sekuensing berupa file dengan format AB1. File yang didapatkan terdiri dari urutan sekuens DNA dan elektroferogram, baik *reverse* maupun *forward*. Kualitas elektroferogram yang baik ditunjukkan dengan jumlah pasang basa yang sesuai dengan hasil elektroforesis sampel DNA. Elektroferogram dengan kualitas yang kurang baik menyebabkan pemotongan sekuens pada bagian awal dan akhir sehingga jumlah pasang basa akan berkurang. Faktor yang dapat menjadi penyebab kurang baiknya kualitas elektroferogram yaitu terdapat banyak pengotor pada sampel yang digunakan (Dailami dkk., 2022).

Kualitas hasil sekuensing erat kaitannya dengan kualitas hasil amplifikasi. Hasil amplifikasi dengan konsentrasi DNA yang tinggi akan menghasilkan sekuens DNA dengan kualitas yang baik. Hasil sekuensing DNA akan didapatkan dalam format file AB1 yang terdiri dari urutan basa nukleotida dan elektroferogram. Urutan basa nukleotida dilakukan pengecekan dan pencocokan dengan elektroferogramnya. Elektroferogram menunjukkan

puncak setiap basa nukleotida yang ditandai dengan warna yang berbeda-beda. Basa nukleotida adenin dengan puncak berwarna hijau, guanin dengan warna ungu, timin dengan warna merah, dan sitosin dengan warna biru (Wulandari dkk., 2021).

Sekuens dianalisis dan dicocokkan dengan elektroferogram yang dihasilkan. Puncak elektroferogram akan menunjukkan basa nukleotida secara jelas. Elektroferogram dilihat dan dicocokkan dengan sekuens, karena terdapat basa nukleotida yang disimbolkan dengan “N”. Simbol “N” menunjukkan bahwa basa nukleotida tidak dapat dibedakan antara adenin, timin, guanin, atau sitosinnya. Basa dengan simbol “N” kemudian diperbaiki sesuai dengan puncak intensitas tertinggi pada elektroferogram (Gaffar dan Sumarlin, 2020). Elektroferogram digunakan untuk melakukan konfirmasi basa nukleotida pada setiap sekuens hingga didapatkan urutan sekuens yang benar (Mawardi dkk., 2018).

2.5 Bioinformatika

Bioinformatika merupakan perangkat lunak yang digunakan untuk membantu mengetahui struktur, fungsi, dan evolusi suatu gen, protein atau keseluruhan genom suatu spesies makhluk hidup. Bioinformatika berguna dalam membantu mempersingkat waktu yang diperlukan untuk melakukan analisis dan visualisasi suatu data gen dengan menggunakan teknologi informasi. Data-data biologis dapat dianalisis dengan mudah melalui pengembangan berbagai ilmu, seperti komputer, matematika, dan statistik. Melalui bioinformatika, maka akan didapatkan informasi-informasi yang berasal dari data biologis yang kita miliki (Mahrus dkk., 2021).

Bioinformatika dilakukan dengan memanfaatkan teknik komputasi untuk melakukan analisis terhadap data-data biologis. Data biologis akan dapat dianalisis dengan menggunakan proses otomatis yang bersifat akurat dan

efisien (Sardi, 2022). Data yang digunakan dalam analisis bioinformatika umumnya berupa sekuens DNA dan asam amino yang memiliki informasi genetik. Sekuens akan dilakukan penyejajaran atau *alignment* dan dapat digunakan sebagai *database*. Bioinformatika dapat digunakan dalam menentukan evolusi dengan membandingkan beberapa gen dari spesies yang berbeda (Apsari dkk., 2018).

Salah satu program dalam bioinformatika yang banyak digunakan yaitu penyejajaran sekuens atau *sequence alignment*. Penyejajaran sekuens dilakukan dengan membandingkan dua sekuens untuk mengetahui tingkat kecocokan atau kemiripannya. Ketidakcocokan dapat muncul dalam analisis sekuens yang menandakan terjadinya mutasi. Kesenjangan atau *gap* juga dapat terjadi ketika panjang sekuens yang dibandingkan tidak memiliki panjang yang sama, hal tersebut dikaitkan dengan proses insersi atau delesi. Analisis terhadap sekuens dilakukan mengetahui proses evolusi yang terjadi pada sekuens yang dibandingkan (Apsari dkk., 2018).

Perbandingan dengan menggunakan lebih dari dua sekuens dapat dilakukan dengan metode *multiple sequence alignment* (MSA) untuk menyejajarkan sekuens. Contoh metode yang banyak digunakan yaitu Clustal W karena memiliki waktu yang singkat dan memiliki akurasi yang tinggi. Sekuens yang dibandingkan dapat diperoleh melalui *database* dan data sekuens yang dimiliki (Apsari dkk., 2018). Sekuens hasil *alignment* kemudian diidentifikasi dan dibandingkan untuk mengetahui jarak genetik antara sekuens menggunakan perangkat lunak bioinformatika, yaitu *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) (Ingkiriwang dkk., 2017).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Oktober 2024 – Januari 2025 di bawah penelitian dasar Priyambodo, S.Pd., M.Sc. dan Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc., dengan nomor kontrak 724/UN26.21/PN/2024 yang berjudul “Konstruksi Filogenetik Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah Berdasarkan Gen COI”. Pengambilan sampel lebah tanpa sengat dilaksanakan di Desa Sido Mulyo, Kecamatan Punggur, Kabupaten Lampung Tengah. Analisis molekuler dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung di bawah bimbingan drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc. dan Dian Neli Pratiwi S.Si., M.Ling.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam melakukan koleksi sampel adalah botol vial, kantung plastik, dan *ice box*. Alat yang digunakan dalam melakukan analisis molekuler adalah mortar, alu, pinset, *laminar air flow*, *micropipet* dengan volume 1 – 10 μ l, 10 – 100 μ l, 20 – 200 μ l, dan 100 – 1.000 μ l, *microtip* dengan volume 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l 200 μ l, dan 1.000 μ l, *microtube*, *waterbath*, vortex, *spin column*, *sentrifuge*, *freezer*, Erlenmeyer, cetakan agar, sisir *agarose*, chamber gel *agarose*, alat elektroforesis, *microwave*, kamera, UV *Transilluminator*, *biosafety cabinet*, *thermal cycler*, komputer, dan laptop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel lebah tanpa sengat, larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS), sarung tangan, masker, alkohol 70%, QIAamp® DNA Mini Kit dengan nomor katalog 51306, etanol 96%, *buffer* AL, *buffer* AW1, *buffer* AW2, *buffer* AE, proteinase-K, primer LCO1490 dan HCO2198, bubuk *agarose*, *buffer* TAE, SYBR *safe* DNA gel stain, DNA *marker*, My Taq HS *Red Mix*, *loading dye*, dan *Nuclease Free Water* (NFW).

3.3 Metode Penelitian

Kajian Analisis Hasil Sekuensing Gen COI pada Individu Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah dilakukan melalui delapan tahapan yang meliputi persiapan dan perizinan, pengambilan sampel lebah tanpa sengat, ekstraksi DNA, uji kualitas DNA, optimasi suhu *annealing*, amplifikasi DNA, elektroforesis dan visualisasi DNA, serta sekuensing DNA yang kemudian dilanjutkan dengan proses analisis data.

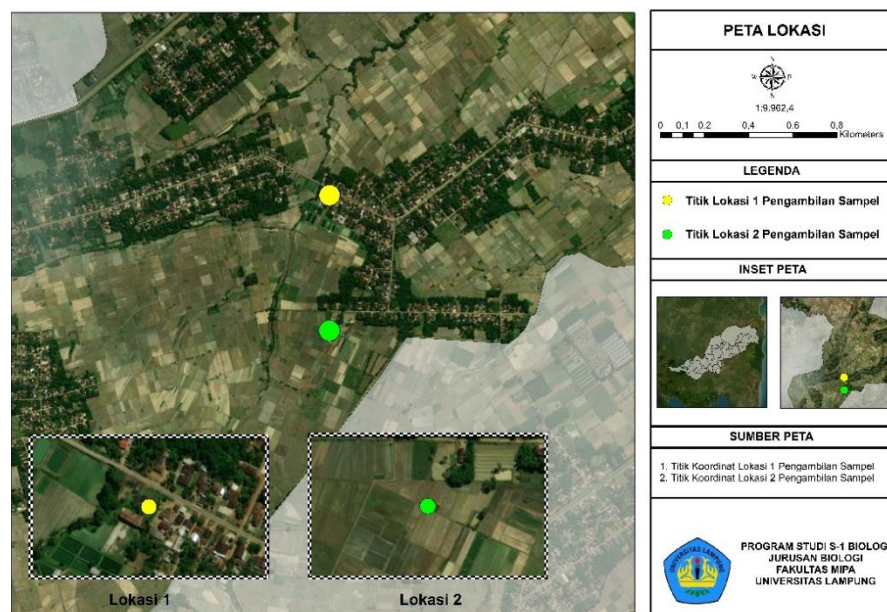
3.3.1 Persiapan dan Perizinan

Persiapan dan perizinan dilakukan dengan melakukan koordinasi antara tim peneliti dengan Balai Veteriner Lampung, sebagai mitra dalam melakukan analisis sampel secara molekuler. Perizinan juga dilakukan dalam pengambilan sampel lebah tanpa sengat kepada pemilik lokasi yang terdapat sarang lebah tanpa sengatnya, berlokasi di Dusun Sari Katon dan Sidomulyo, Desa Sido Mulyo, Kecamatan Punggur.

3.3.2 Pengambilan Sampel Lebah Tanpa Sengat

Sampel lebah tanpa sengat didapatkan dengan metode jelajah (Bookhout, 1996 dalam Lamerkabel, 2021). Jelajah dilakukan dengan tujuan untuk menemukan sarang lebah dan selanjutnya dilakukan koleksi sampel. Penentuan lokasi pengambilan sampel didasarkan pada

informasi yang didapatkan mengenai keberadaan sarang lebah tanpa sengat. Berdasarkan informasi yang diperoleh, didapatkan dua titik lokasi keberadaan sarang lebah tanpa sengat, yaitu pada titik koordinat $5^{\circ}01'44.4''\text{S}$ $105^{\circ}17'56.1''\text{E}$ di Dusun Sari Katon sebagai titik pertama dan $5^{\circ}02'02.0''\text{S}$ $105^{\circ}17'09.5''\text{E}$ di Dusun Sidomulyo sebagai titik kedua. Kedua titik pengambilan sampel berada di Desa Sido Mulyo, Kecamatan Punggur, Kabupaten Lampung Tengah (Gambar 4).



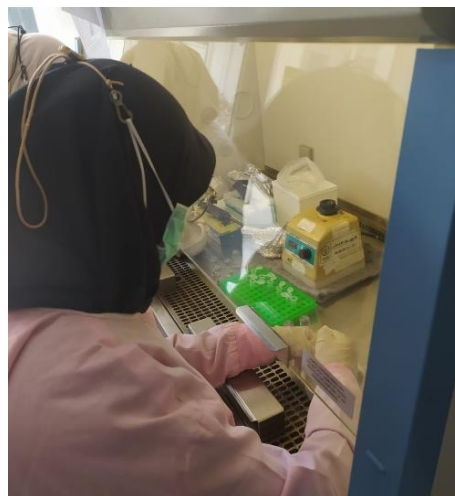
Gambar 4. Peta lokasi pengambilan sampel.

Pengambilan sampel lebah tanpa sengat dilakukan di waktu pagi hari sebelum lebah memulai aktivitasnya. Sampel lebah tanpa sengat dikoleksi dengan mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Lamerkabel (2017), yaitu diawali dengan pemasangan kantung plastik pada *entrance* sarang lebah tanpa sengat. Sarang lebah tanpa sengat diketuk hingga pada kantung plastik terdapat individu lebah yang terperangkap. Individu lebah tanpa sengat kemudian dipindahkan ke dalam botol vial yang di dalamnya telah diisi dengan larutan PBS dan ditutup dengan rapat. Larutan PBS digunakan sebagai larutan fiksatif untuk membius individu lebah (Priyambodo dkk., 2023). Botol vial diberi label untuk memberi tanda sampel dan dimasukkan ke dalam *ice*

box untuk disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -4°C di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung.

3.3.3 Ekstraksi DNA Lebah Tanpa Sengat

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit isolasi DNA, yaitu Qiagen *Blood and Tissue* yang dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* dengan menggunakan masker dan sarung tangan. Sampel lebah tanpa sengat dikeluarkan dari *freezer* dan disimpan di suhu ruang. Botol vial dibuka kemudian diambil sampel lebah tanpa sengat menggunakan pinset dan dipindahkan ke dalam mortar yang telah disterilisasi dengan alkohol 70%. Sampel yang digunakan adalah seluruh bagian tubuh lebah dan ditambahkan larutan PBS, kemudian digerus dengan *pestle* hingga halus. Sampel diambil sebanyak $100\ \mu\text{l}$ menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *microtube* (Gambar 5).



Gambar 5. Penggerusan sampel lebah tanpa sengat.

Tahapan awal dalam melakukan ekstraksi adalah pelisisan dengan menambahkan $20\ \mu\text{l}$ proteinase-K dan $200\ \mu\text{l}$ *buffer* AL ke dalam sampel kemudian divortex hingga homogen. Sampel yang telah homogen kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit di dalam *waterbath*. Sampel yang telah diinkubasi kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak $200\ \mu\text{l}$ dan divortex hingga homogen. Sampel

yang telah homogen dipindahkan ke dalam *spin column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 18.000 rpm selama 1 menit. Sampel yang telah disentrifugasi dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru dan ditambahkan *buffer* AW1 sebanyak 500 µl kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit.

Pada sampel ditambahkan *buffer* AW2 sebanyak 500 µl selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. *Buffer* AW1 dan AW2 merupakan *buffer* yang digunakan untuk proses *washing* atau pencucian sampel dari kontaminan residu. *Spin column* dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 µl dan ditambahkan *buffer* AE sebanyak 100 µl, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Sampel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. *Spin column* dibuang dan sampel DNA yang telah terisolasi disimpan di dalam *freezer* dengan suhu 20°C.

3.3.4 Uji Kualitas DNA Lebah Tanpa Sengat

Pengujian kualitas sampel DNA hasil ekstraksi dilakukan melalui proses elektroforesis. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel *agarose* 1% dan dilanjutkan dengan visualisasi pita DNA pada alat UV *Transilluminator* dengan bantuan kamera (Arian dkk., 2016). Menurut Adhiyanto dkk. (2020), gel *agarose* digunakan sebagai media untuk meletakkan sampel dan untuk memudahkan mengamati pergerakan DNA pada aliran listrik. Gel *agarose* diletakkan pada *chamber* yang telah diisi dengan *buffer* TAE. Alat UV *transilluminator* digunakan sebagai alat untuk mengamati hasil pendaran pita DNA yang dihasilkan menggunakan sinar ultra violet. Sampel DNA sebanyak 5 µl dicampurkan dengan *loading dye* sebanyak 2 µl kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel dalam gel *agarose*. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt dan 400 A selama 13 menit. Kualitas DNA dilihat

berdasarkan hasil visualisasi DNA pada UV transiluminator yang berupa pendaran pita DNA.

3.3.5 Optimasi Suhu *Annealing*

Optimasi suhu *annealing* merupakan tahap yang dilakukan sebelum amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA melibatkan tahap *annealing* dengan suhu tertentu dan berbeda setiap primernya. Tahap optimasi bertujuan untuk mendapatkan suhu optimum *annealing* agar hasil amplifikasi memiliki kualitas yang maksimal (Setyawati dan Zubaidah, 2021). Optimasi dilakukan menggunakan rentang suhu *annealing* yang ditentukan melalui perhitungan *Temperature melting* (T_m).

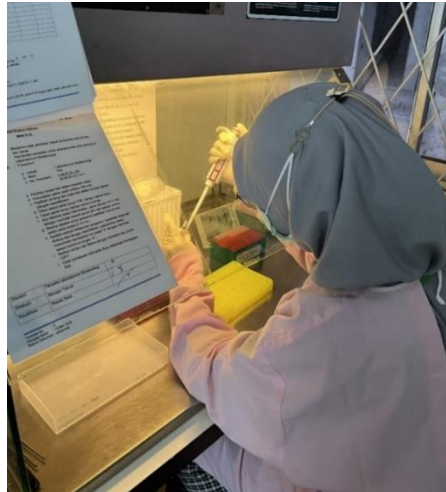
Temperature melting (T_m) dihitung berdasarkan jumlah basa nukleotida yang terdapat di dalam sekuens primer (Rahmawati dan Shabrina, 2024). Menurut Sasmito dkk, (2014), penentuan suhu dalam proses optimasi suhu *annealing* dilakukan berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$T_m (P) = (nG + nC) \times 4 + (nA + nT) \times 2$$

Keterangan:

- $T_m (P)$: *Primer Melting Temperature*
- nG : Jumlah basa guanin pada primer
- nC : Jumlah basa sitosin pada primer
- nA : Jumlah basa adenin pada primer
- nT : Jumlah basa timin pada primer.

Berdasarkan sekuens primer gen LCO1490 dan HCO2198, dilakukan perhitungan sesuai rumus dan pada alat *thermal cycler* sebagai alat untuk melakukan perbanyakan DNA. Program PCR dijalankan dengan menggunakan suhu *annealing* berupa gradien, dengan rentang suhu 52°C – 57°C. Optimasi dilakukan dengan menambahkan 1 µl *forward primer*, 1 µl *reverse primer*, 11,5 µl *red mix*, 3,5 µl *Nuclease Free Water* (NFW) dan 8 µl sampel ke dalam *microtube* (Gambar 6).



Gambar 6. Proses penambahan DNA *template*.

3.3.6 Amplifikasi DNA Lebah Tanpa Sengat

Tahap amplifikasi DNA dilakukan di *biosafety cabinet* dengan menggunakan *tube* yang berisi 5 komponen yang meliputi *red mix*, primer *forward*, primer *reverse*, *Nuclease Free Water* (NFW), dan sampel DNA lebah tanpa sengat. *Tube* masing-masing sampel memiliki volume 40 μl yang terdiri atas *red mix* sebanyak 17 μl , primer *forward* dan *reverse* yang masing-masing sebanyak 1,75 μl , NFW sebanyak 9,5 μl , dan sampel DNA lebah sebanyak 10 μl (Gambar 7).



Gambar 7. Proses *master mix*.

Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi adalah *forward* LCO1490 dan *reverse* HCO2198 (Tabel 1). DNA sampel kemudian diamplifikasi menggunakan mesin *thermal cyclers* untuk melakukan perbanyakan DNA. Mesin *thermal cyclers* dilakukan pengaturan mencakup suhu, waktu, dan pengulangan yang akan dilakukan. *Tube* sampel kemudian disusun ke dalam rak PCR dan ditutup kemudian mulai dijalankan program PCR hingga selesai.

Tabel 1. Sekuen Primer LCO1490 dan HCO2198 (Marconi *et al.*, 2022)

Primer	Sekuen
<i>forward</i> LCO1490	5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'
<i>reverse</i> HCO2198	5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3'

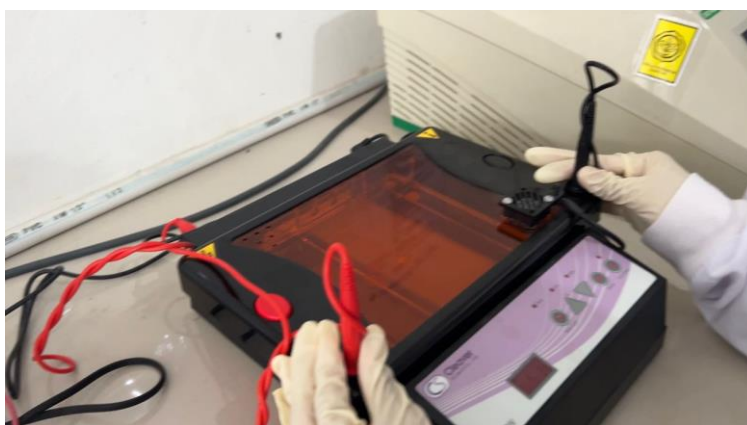
Proses amplifikasi terdiri dari lima tahapan, yaitu *pre-denaturation*, *denaturation*, *annealing*, *extension*, dan *post-extension* yang dilakukan dalam 35 siklus. *Pre-denaturation* dilakukan pada suhu 94°C selama 3 menit dan dilanjutkan dengan *denaturation* pada suhu 94°C selama 30 detik. Tahap *annealing* yang dilakukan pada suhu 50°C selama 30 detik. Amplifikasi dilanjutkan dengan tahap *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit dan diakhiri dengan *post-extension* pada suhu 72°C selama 10 menit (Marconi *et.al.*, 2022). Berdasarkan hasil optimasi kondisi PCR, proses amplifikasi dilakukan modifikasi terhadap jumlah siklus menjadi 40 siklus dan tahap *annealing* pada suhu 57°C.

3.3.7 Elektroforesis dan Visualisasi DNA Lebah Tanpa Sengat

Elektroforesis dilakukan pada gel *agarose* 1% yang dibuat dengan mencampurkan 1 bungkus bubuk *agarose* dan 100 ml *buffer* TAE ke dalam Erlenmeyer, kemudian dimasukkan ke dalam *microwave* selama 3 menit. *Agarose* ditambahkan pewarna SYBR Safe DNA Gel Stain sebagai pewarna sebanyak 10 µl dan dihomogenkan secara perlahan.

Cetakan agar serta sisirnya dipersiapkan kemudian gel dituangkan ke dalam cetakan agar dan ditunggu hingga mengeras. Sisir kemudian dilepaskan dari cetakan agar dan dipindahkan ke dalam chamber. Gel *agarose* digunakan sebagai media pemisah senyawa yang memiliki laju pemisah cenderung cepat. Larutan *buffer* juga diperlukan untuk menjaga stabilitas pH gel *agarose* sekaligus berperan dalam pergerakan arus listrik sebagai larutan yang menyediakan elektrolit (Harahap, 2018). Pewarna yang digunakan dalam pembuatan gel *agarose* bertujuan untuk membantu visualisasi pergerakan DNA sehingga terlihat pita DNA yang terbentuk (Putri dkk., 2024).

Buffer TAE ditambahkan ke dalam chamber hingga gel *agarose* terendam. *Marker* diambil sebanyak 5 μ l lalu dimasukkan ke dalam sumur gel. Sampel DNA diambil sebanyak 5 μ l dan dimasukkan ke dalam sumur gel setelah *marker* secara berurutan. *Marker* digunakan sebagai penunjuk ukuran *base pair* dan akan digunakan sebagai pembanding dalam menentukan ukuran *base pair* sampel (Rosmini dkk., 2024). Setelah semua sampel DNA dimasukkan ke dalam sumur gel, maka chamber ditutup dan dipasang katoda dan anoda lalu dihubungkan ke arus listrik (Gambar 8).



Gambar 8. Pemasangan katoda dan anoda.

Mesin elektroforesis dijalankan selama 35 menit dengan voltase 100 V dan arus 300 A. Mesin elektroforesis kemudian dimatikan dan chamber

dibuka, kemudian gel *agarose* diangkat dari dalam chamber. *Gel agarose* diletakkan pada alat *UV Transilluminator* kemudian alat tersebut ditutup. Kamera dihidupkan dan diatur supaya terhubung dengan komputer kemudian diambil gambar hasil elektroforesis.

3.3.8 Sekuensing DNA

Sampel DNA hasil amplifikasi selanjutnya dilakukan sekuensing di 1st Base, Malaysia, melalui PT. Genetika Science Indonesia. Sekuensing dilakukan setelah pengiriman sampel DNA ke PT. Genetika Science Indonesia. Seluruh prosedur dilakukan melalui *website* 1st Base dan hasil sekuensing dikirimkan melalui email yang telah dicantumkan (Darmawan dkk., 2024). Hasil sekuensing yang dikirimkan berupa AB1 file yang berisi data sekuens DNA sampel (Arian dkk., 2016).

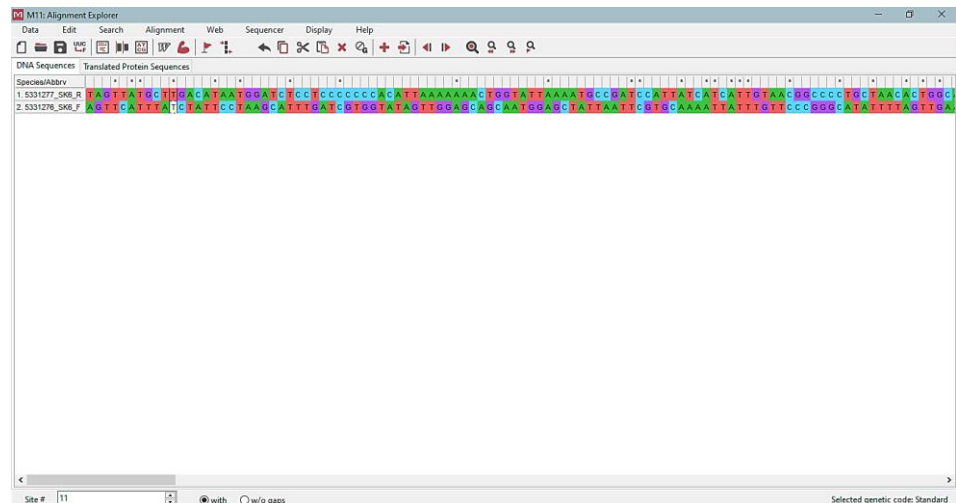
3.4 Analisis Data

Tahap analisis data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version XI* (MEGA XI) untuk proses penyejajaran urutan basa-basa nukleotida dan analisis jarak kekerabatan (Tamura *et.al.*, 2021). Data yang digunakan merupakan data hasil sekuensing yang berupa urutan basa nukleotida pada sampel.

3.4.1 Penyejajaran Urutan Basa Nukleotida

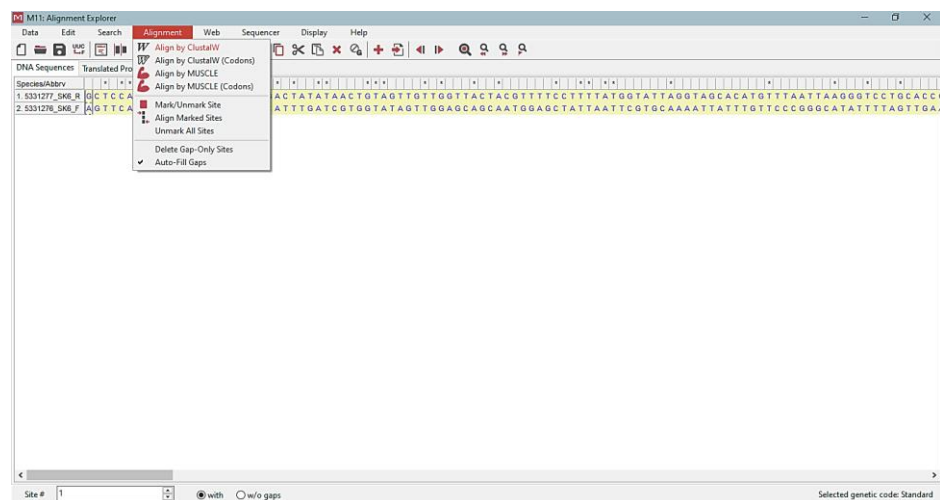
Analisis data dimulai dengan proses penyejajaran (*alignment*) yang dilakukan pada perangkat lunak MEGA XI. Perangkat lunak MEGA XI dibuka dan dipilih menu “Align” pada tampilan awal perangkat lunak kemudian dipilih opsi “*edit/build alignment*”. Pada opsi tersebut kemudian akan menampilkan 3 pilihan, dan dipilih “*create a new alignment*” kemudian dipilih “DNA”. Menu “*edit*” yang terletak di atas

kemudian dipilih lalu dilanjutkan dengan *"insert sequence from a file"*. Data sekuens DNA hasil sekuensing kemudian dipilih dan ditunggu hingga proses selesai dan terlihat data sekuens (Gambar 9).



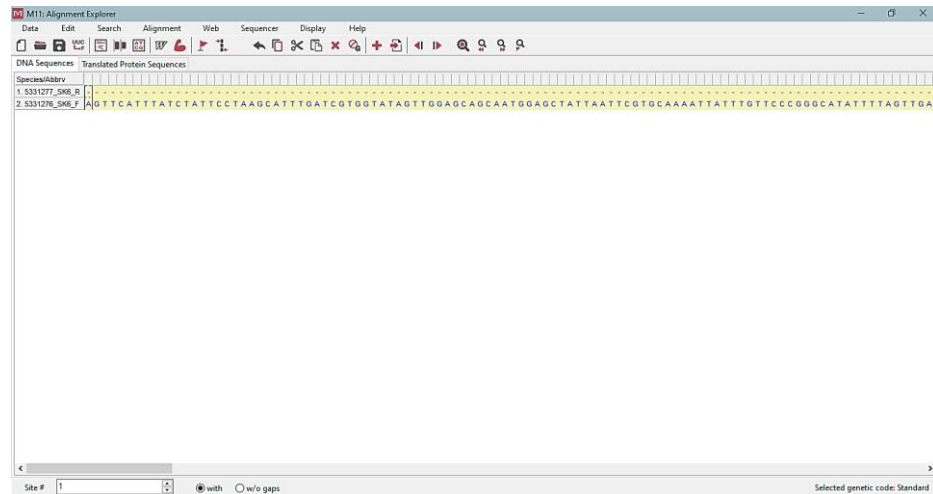
Gambar 9. Tampilan data sekuens.

Urutan basa nukleotida dilanjutkan dengan melakukan *reverse complement*. *Reverse complement* dilakukan dengan memilih data sekuens *"reverse"* kemudian menuju menu *"data"* dan dipilih *"reverse complement"*. Data sekuensing kemudian disejajarkan dengan memilih menu *"Alignment"* dan dipilih *"Align by ClustalW"* (Gambar 10). Kemudian diatur *"pairwise dan multiple alignment"* lalu diklik *"OK"*.

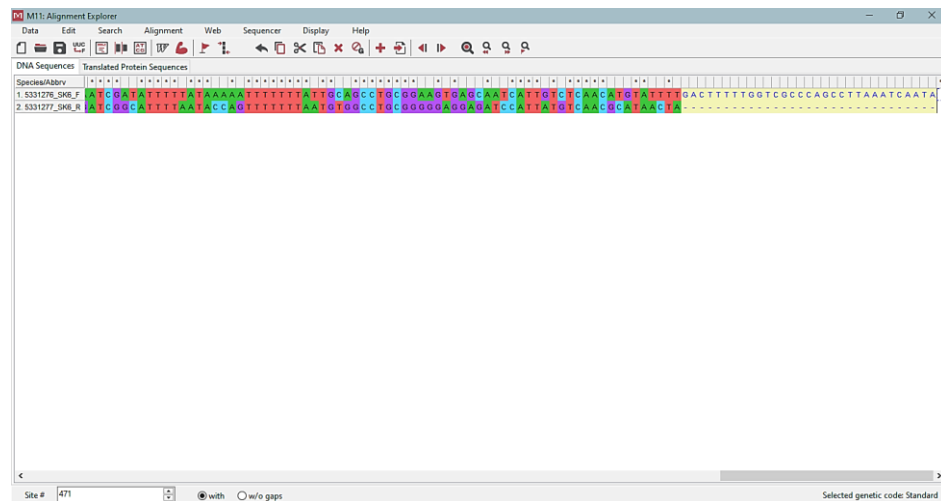


Gambar 10. Tahap *alignment* sekuens *forward* dan *reverse*.

Penyejajaran diawali dengan memotong bagian sekuens *reverse* dan *forward* yang kosong. Situs yang kosong menunjukkan adanya ketidaksejajaran antara kedua sekuens yang digunakan, sehingga perlu dilakukan penghapusan situs. Situs yang dipotong yaitu pada situs awal (Gambar 11) dan situs akhir sekuens (Gambar 12).



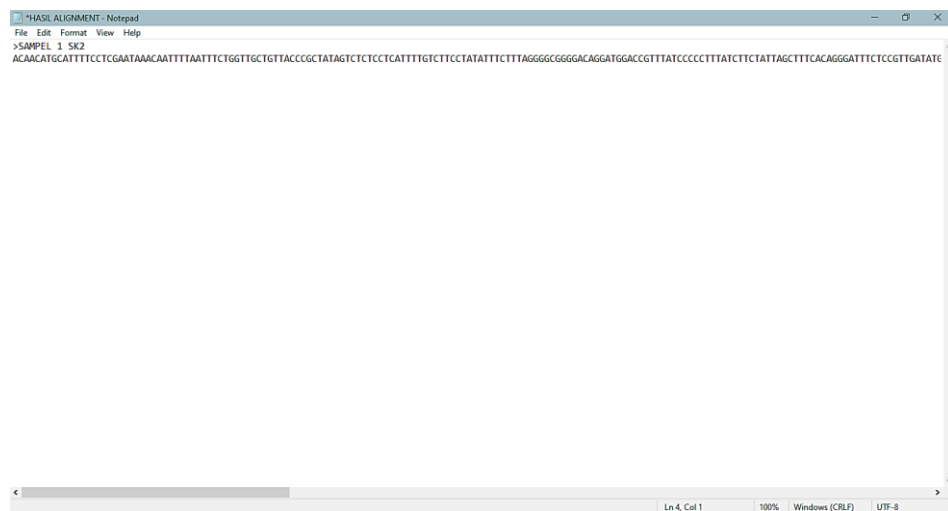
Gambar 11. Tahap pemotongan situs awal.



Gambar 12. Tahap pemotongan situs akhir.

Pembandingan basa nukleotida pada sekuens *reverse* dan *forward* ditandai dengan tanda tidak berbintang dan disesuaikan berdasarkan elektroferogram. Penggantian basa nukleotida dilakukan dengan memilih basa nukleotida yang akan diganti kemudian ditekan tombol

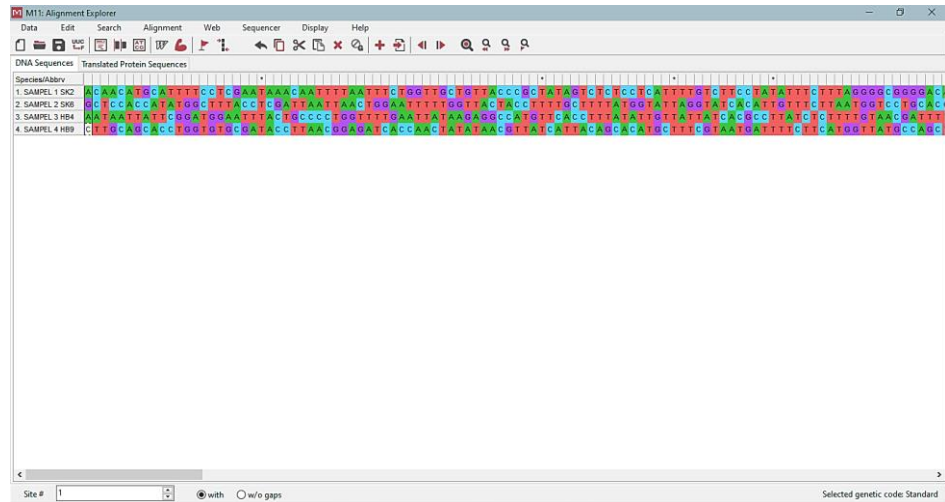
“*delete*” dan diisi dengan basa nukleotida yang baru. Basa nukleotida pada sekuens yang telah sejajar, dilakukan “*save session*”. Hasil sekuens *reverse* maupun *forward* disalin dan ditempel di *notepad*, kemudian diberi nama “>Sampel 1 Lebah Tanpa Sengat”(Gambar 13). Dilakukan hingga didapatkan seluruh sekuens sampel individu lebah tanpa sengat. File *notepad* disimpan untuk dilakukan analisis data.



Gambar 13. Tahap memasukkan data sekuens ke dalam *notepad*.

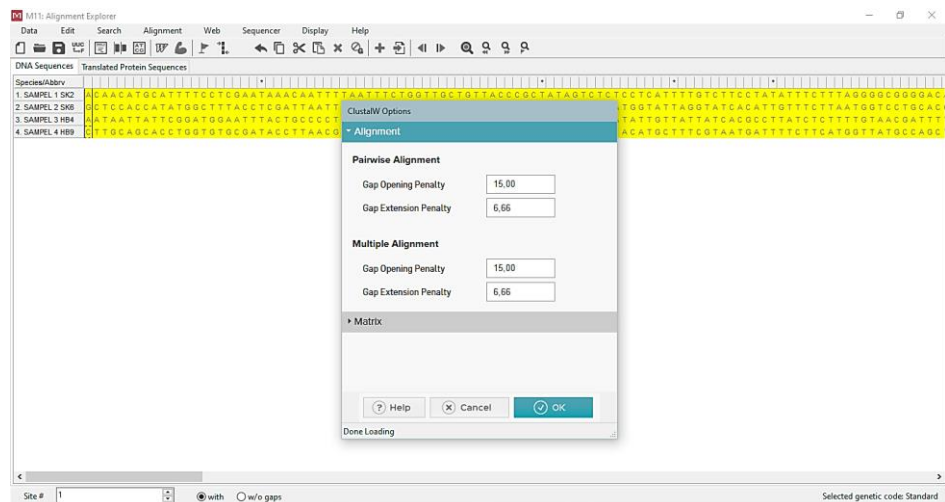
3.4.2 *Multiple Alignment Sequencing*

Seluruh sekuens sampel yang didapatkan kemudian dilanjutkan dengan melakukan *multiple alignment sequencing*. *Multiple alignment sequencing* dilakukan dengan memilih menu “*Align*” pada tampilan awal perangkat lunak MEGA XI kemudian dipilih opsi “*edit/build alignment*”. Opsi “*create a new alignment*” dipilih dan dilanjutkan dengan memilih opsi “DNA”. Menu “*edit*” yang terletak di atas kemudian dipilih lalu dilanjutkan dengan “*insert sequence from a file*”. Data sekuens yang telah disimpan di *notepad* kemudian dipilih dan akan terlihat seluruh sekuens sampel yang akan dianalisis (Gambar 14).



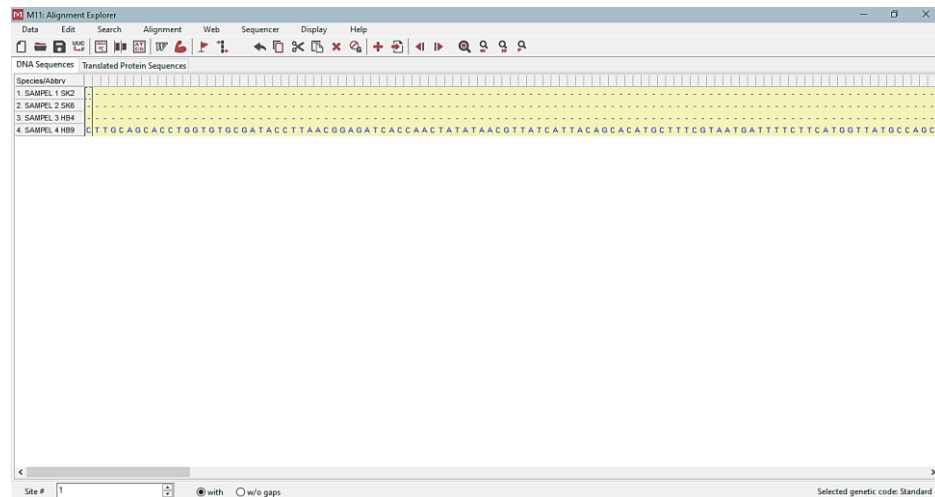
Gambar 14. Tahap memasukkan data sekuens sampel.

Analisis dilanjutkan dengan proses penyejajaran pada menu “*Alignment*” dan dipilih “*Align by ClustalW*”. Kemudian diatur “*pairwise* dan *multiple alignment*” lalu diklik “OK” (Gambar 15).

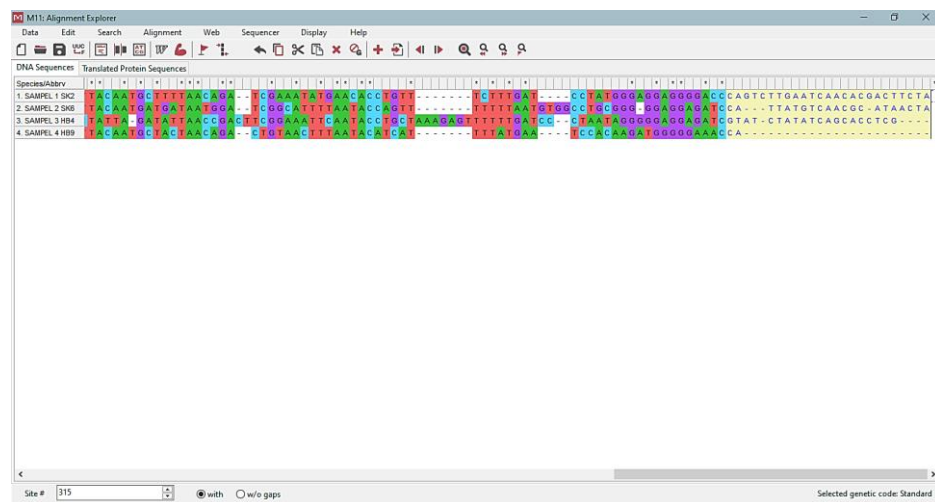


Gambar 15. Tahap *alignment* sekuens sampel.

Sekuens yang telah disejajarkan kemudian dilakukan penghapusan deretan yang kosong pada situs awal (Gambar 16) dan akhir sekuens (Gambar 17). Hasil penyejajaran sekuens kemudian dilakukan perbandingan antara satu sekuens dengan sekuens lainnya dengan memperhatikan basa nukleotida yang berbeda dan ditandai dengan tidak adanya bintang.



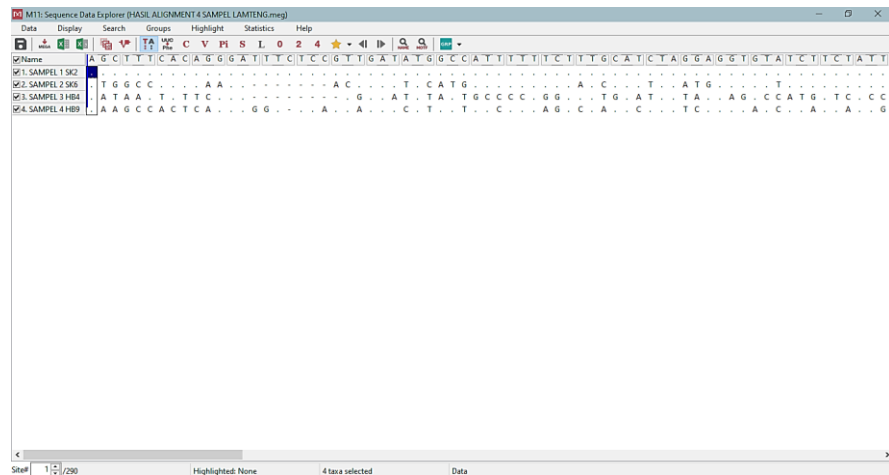
Gambar 16. Tahap pemotongan situs awal sekuens sampel.



Gambar 17. Tahap pemotongan situs akhir sekuens sampel.

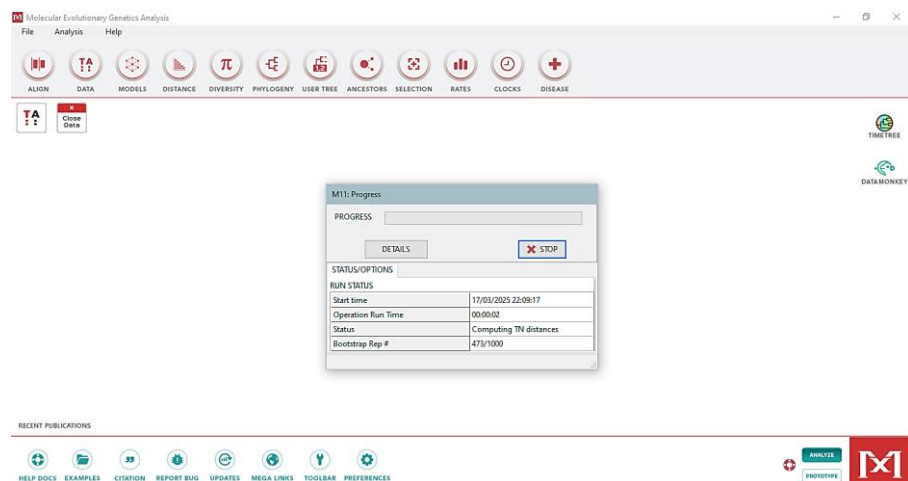
3.4.3 Analisis dan Visualisasi Jarak Genetik

Analisis dan visualisasi jarak genetik dilakukan pada perangkat lunak MEGA XI. Jarak genetik dianalisis melalui menu “Distance” yang ada pada perangkat lunak MEGA XI dan dipilih opsi “Compute Pairwise Distances”. File data sekuens kemudian dipilih dan tekan “yes”. Data sekuens sampel yang akan dianalisis kemudian akan terlihat (Gambar 18).



Gambar 18. Tampilan urutan sekuens sampel.

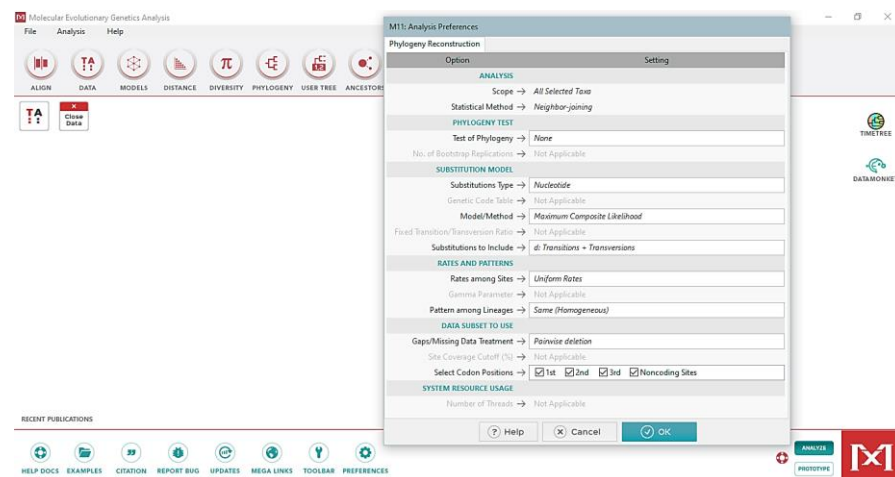
Menu pengaturan yang muncul kemudian diedit pada bagian "*estimate varriance*" pada opsi "*No. of Bootstrap Replications*" diatur menjadi 1000 lalu ditekan tombol "OK". Proses akan berjalan dan menghasilkan jarak genetik dan homologi antar individu yang digunakan (Gambar 19).



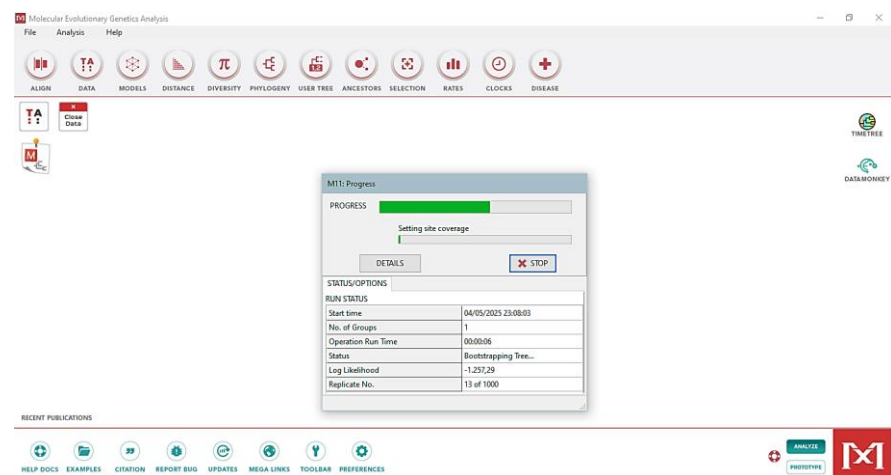
Gambar 19. Proses analisis jarak genetik.

Jarak genetik sampel lebah tanpa sengat kemudian divisualisasikan dengan melakukan konstruksi pohon filogenetik. Konstruksi pohon filogenetik diawali dengan memilih menu "*phylogeny*" yang berada pada tampilan awal aplikasi MEGA XI. Opsi "*Construct/ Test Neighbor Joining Tree*" dipilih dan dimasukkan data sekuens yang

akan digunakan lalu tekan opsi “yes”. Menu pengaturan akan muncul kemudian ditekan tombol “OK” (Gambar 20). Proses konstruksi pohon filogenetik akan berjalan dan ditunggu hingga proses selesai (Gambar 21). Konstruksi pohon filogenetik yang menunjukkan kekerabatan sampel yang digunakan kemudian akan muncul setelah proses selesai.



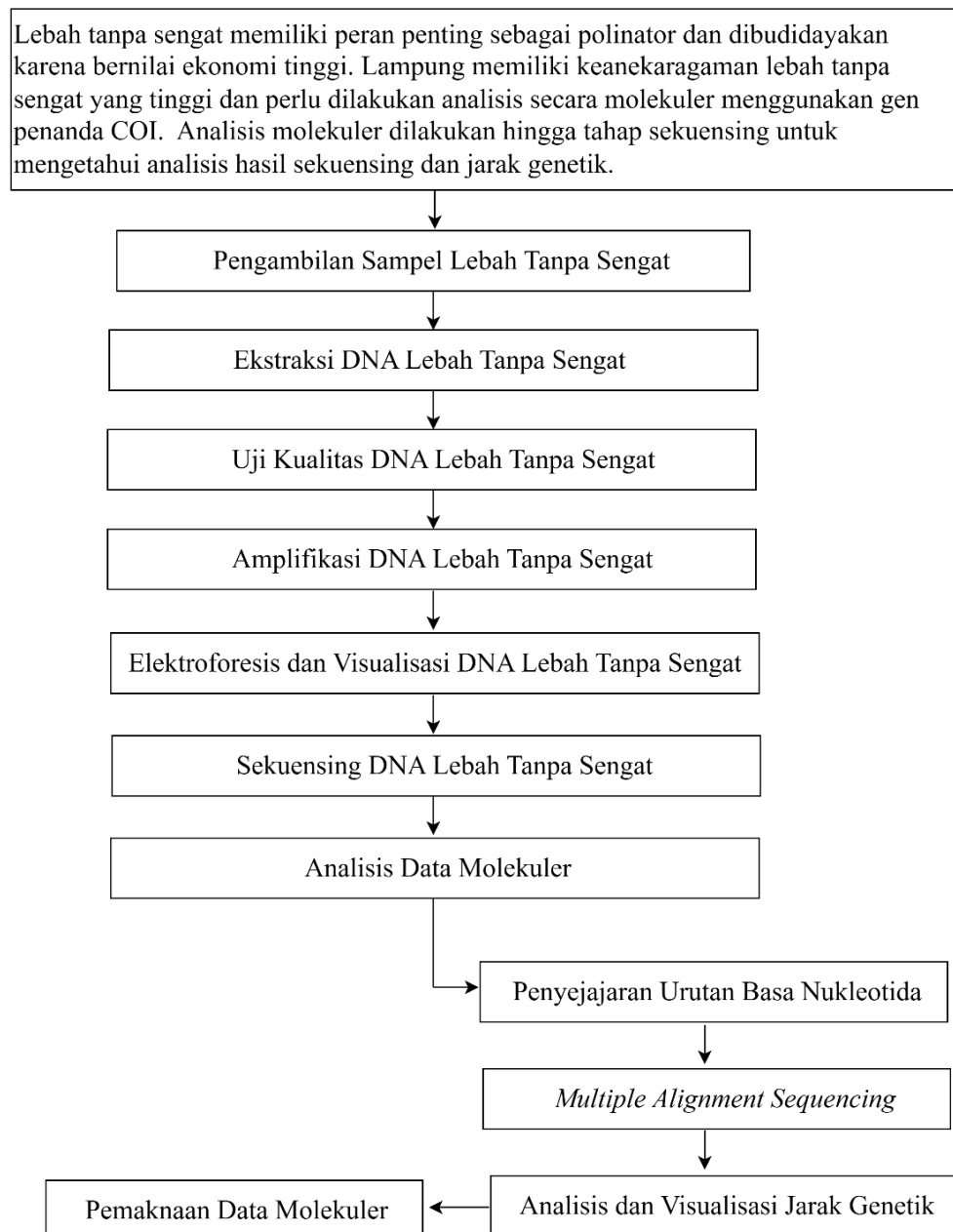
Gambar 20. Pengaturan konstruksi pohon filogenetik.



Gambar 21. Proses konstruksi pohon filogenetik.

3.5 Diagram Alir Penelitian

Penelitian “Kajian Analisis Hasil Sekuensing Gen COI pada Individu Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah” dilakukan dengan berdasarkan diagram alir berikut (Gambar 22):



Gambar 22. Diagram alir penelitian dengan judul “Kajian Analisis Hasil Sekuensing Gen COI pada Individu Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah”.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Penelitian dengan judul “Kajian Kajian Analisis Hasil Sekuensing Gen COI pada Individu Lebah Tanpa Sengat di Lampung Tengah” mendapatkan simpulan sebagai berikut:

1. Variasi basa nukleotida yang tinggi pada keempat sekuens sampel DNA lebah tanpa sengat menunjukkan terjadinya keragaman di dalam individu lebah tanpa sengat yang dikoleksi di Lampung Tengah.
2. Keempat sampel DNA lebah tanpa sengat memiliki jarak genetik berkisar antara 0,52% – 1,12%, menunjukkan adanya perbedaan genetik pada keempat individu lebah tanpa sengat yang dikoleksi di Lampung Tengah.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan yaitu melakukan identifikasi hingga tingkat spesies menggunakan primer spesifik yang diperoleh dengan melakukan desain primer.

DAFTAR PUSTAKA

- Achyani dan Wicandra, D. (2019). *Kiat Praktis Budidaya Lebah Trigona (Heterotrigona itama)*. Penerbit Laduny. Metro.
- Adhiyanto, C., Hendarmin, L., dan Puspitaningrum, R. (2020). *Pengenalan Dasar Teknik Bio-Molekuler*. Penerbit Deepublish. Sleman.
- Aisyah, S., Thania, O. S., dan Syarif, A. F. (2021). Identifikasi Molekuler Sirip Ikan Hiu Menggunakan Gen Mitokondria *Cytochrome C Oxidase Subunit I* (COI) yang Didaratkan di Pesisir Kabupaten Bangka Selatan. *Jurnal Enggano*, 6 (1): 99-109.
- Andalia, N., Herma Wardani, A., Taufik Sahli, I., Yunus, R., Solfaine, R., Azmah Nikmatullah, N., Rusdin, A., dan Maulida Safitri, N. (2022). *Biologi Molekuler*. PT. Global Eksekutif Teknologi. Padang.
- Apsari, G. R., Adawiyah, R., Linatari, M. A., Rahmahyadi, D., dan Syaiful Pradana, M. (2018). *Bioinformatika Analisis Pensejajaran Sequence*. Pustaka Ilalang.
- Arian, P., Artika, I. M., dan Falah, S. (2016). Amplification and Analysis of Cytochrome Oxidase I Of Polypedates Leucomystax From Bogor Agricultural University Area. *Current Biochemistry*, 3 (1): 13-19.
- Ariyanti, Y., dan Farajallah, A. (2019). Penentuan Jenis Ikan Kerapu Subfamily Epinephelinae Asal Wilayah Raja Ampat (Papua Barat) Menggunakan Sekuens Gen CO1. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera: A Scientific Journal*, 36 (3): 112-117.
- Aulia, S. L., Suwignyo, R. A., dan Hasmeda, M. (2021). Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Ilmiah Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 18 (1): 44-54.

- Balladona, F. K., Maskromo, I., Sukma, D., dan Sudarsono. (2019). Pengembangan Penanda Molekuler Berdasarkan Situs SNP Indel Genom Kloroplas Kelapa. *Jurnal Agronida*, 6 (1): 1-13.
- Bingpeng X, Heshan L, Zhilan Z, Chunguang W, Yanguo W, Jianjun W. (2018). DNA Barcoding for Identification Of Fish Species in the Taiwan Strait. *PLoS ONE*. 13 (6): e0198109.
- Bookhout, T.A. (1996). *Research and Management Techniques for Wildlife and Habitats. Kansas (US)*: Allen Press Inc. ISBN-10: 093586881X.
- Dailami, M., Saleky, D., Toha, A. H. A., dan Agamawan, L. P. I. (2022). Identifikasi Genetik Udang Mantis Dengan Pendekatan DNA Barcoding Gen Sitokrom Oksidase 1 (CO1). *ACROPORA: Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan Papua*, 5 (1).
- Dailami, M., Yuniarti, A., Widodo, M. S., Pratama, R. N., Ariyani, D. F., Siahaan, M. D. T. G., dan Mayor, C. E. M. P. (2025). Genetic Identification of Nilem Fish using the DNA Barcoding Approach. *Journal of Tropical Diversity*, 1 (1): 33-42.
- Darmawan, R. F., H. Mahrus, Syamsul Bahri, dan Zulkifli, L. (2024). Analisis Karakter Molekuler dan Filogenetik Ikan Tuna (*Auxis rochei*) Berdasarkan Gen CO1 di Perairan Lombok Barat. *Jurnal Biologi Tropis*, 24 (2): 89–94.
- Dharmayanti, N. L. P. I. (2011). Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme. *Wartazoa*, 21 (30): 1–10.
- Dwininda, W., Dwira, S., dan Paramita, R. I. (2023). Analisis Polimorfisme Gen CYP pada Metabolisme Obat Melalui Pendekatan Bioinformatika. *Pratista Patologi*, 8 (1): 5-16.
- Effendi, Y. (2020). *Buku Ajar Genetika Dasar*. Penerbit Pustaka Rumah C1nta. Magelang.
- Fadhilah, R. Dan Rizkika, K. (2015). *Laba Lebah Tanpa Sengat*. PT. Trubus Swadaya. Jakarta.
- Fauziyyah, I. dan Suhadi. (2021). Variasi Sekuens Dan Filogenetik *Leptocoris* Oratorius (Fabricius) di Jawa Timur Berdasarkan Gen COX2. *Jurnal Ilmu Hayat*, 5 (2): 71-79.

- Filly, N. N. (2018). *Kontribusi Usaha Budidaya Lebah Madu Terhadap Pendapatan dan Kesejahteraan Petani Lebah Madu Desa Buana Sakti Kecamatan Batanghari Kabupaten Lampung Timur*. Skripsi. Bandar Lampung.
- Firda, W., Toha, A. H. A., Mudjirahayu, M., dan Dailami, M. (2025). Keragaman Genetik Antar Individu Bulu Babi (*Tripneustes gratilla*) di Pantai Rendani Kabupaten Manokwari. *Journal of Tropical Diversity*, 1 (1): 56-63.
- Fitrian, T., Madduppa, D. H., Kelautan, D. T., Perikanan, F., Kelautan, I., Pertanian, I., dan Dramaga, B. J. R. (2020). Penentuan Jenis Ikan Layang (*Decapterus macrosoma*) Menggunakan Metode Analisis Morfologi dan DNA Barcoding Dari Pasar Ikan Muara Baru Jakarta Utara. *Bawal Widya Riset Perikanan Tangkap*, 12 (3): 127-135.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations [FAO]. (2019). *Declining Bee Populations Pose Threat To Global Food Security And Nutrition*. <https://www.fao.org/newsroom/detail/Declining-bee-populations-pose-threat-to-global-food-security-and-nutrition/en>. Diakses pada 2 Juni 2025 pukul 21.30.
- Gaffar, S. dan Sumarlin. (2020). Analisis sekuen mtDNA COI Pari Total Biru yang didaratkan di Tempat Pendaratan Ikan Kota Tarakan. In *Jurnal Harpodon Borneo*, 13 (2): 80-89.
- Handayani, H., dan Setia, T. M. (2021). Konservasi Genetika Badak Sumatera di Indonesia. *BIO-SAINS: Jurnal Ilmiah Biologi*, 1(1): 19-25.
- Harahap, M. R. (2018). Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2 (1): 21–26.
- Harjanto, S., Mujianto, M., Arbiansyah, dan Ramlan, A. (2020). *Melipolikultur: Petunjuk Praktis Budidaya Lebah Madu Kelulut Sebagai Alternatif Mata Pencapaian Masyarakat*. Swaroawa. Yogyakarta.
- Harmain, U., Rudiantho Saragih, J., Simarmata, M. M., dan J Pasaribu, M. P. (2022). Sosialisasi Budidaya Lebah Madu Tanpa Sengat (*Stingless Bee*) dan Manfaatnya. *Jurnal Pengabdian Masyarakat Sapangambei Manoktok Hitei*, 2 (2): 159-165.
- Hasibuan, F. E., Mantiri. F. R., dan Rumende, R. R. H. (2017). Kajian Variasi Sekuens Intraspecies Dan Filogenetik Monyet Hitam Sulawesi (*Macaca nigra*) dengan Menggunakan Gen COI. *Jurnal Ilmiah Sains*, 17 (1): 59-67.

Herlinda, S., dan Sari, J. M. P. (2022). Penyerbuk yang Berperan Meningkatkan Produksi Tanaman Semusim dan Tahunan secara Berkelanjutan. *In Seminar Nasional Lahan Suboptimal*, 10 (1): 40-60).

Hidayati, D. B. I. (2022). Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Identification Of Circumsporozoite Protein Gene In Plasmodium Falciparum From Malaria Patients In Working Area Of Primary Health Care Hanura, Pesawaran, Lampung. *Jurnal Medika Hutama*, 3(4): 2758-2764.

Ingkiriwang, M., Repi, R. A., dan Nanlohy, F. N. (2018). Analisis Filogenetik Molekuler Tumbuhan Pala (*Myristica sp*) Dari Tahuna Menggunakan Gen Rbcl DNA Kloroplas. *JSME (Jurnal Sains, Matematika dan Edukasi)*, 5 (2): 137-144.

Kartawinata. (2013). *Diversitas Ekosistem Alami Indonesia*. LIPI Press. Jakarta.

KemenLHK. (2020). *Status Hutan dan Kehutanan Indonesia 2020*. Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan. Jakarta.

KemenPPN/BAPPENAS]. (2016). *Indonesian Biodiversity Strategy and Action Plan (IBSAP) 2015-2020*. Kementerian Perencanaan Pembangunan Nasional/BAPPENAS. Jakarta.

Kusuma, W. E., Widyawati, Y., Dailami, M., Kholil, K. N. A., Paricahya, A. F., Sufaichusan, I., dan Wiadnya, D. G. R. (2024). Posisi Filogenetik Ikan Kotes (*Channa Gachua* (Hamilton, 1822)) dan Ikan Kutuk (*Channa Striata* (Bloch, 1793)) Dari Jawa Timur Berdasarkan Urutan DNA Mitokondria *Cytochrome C Oxidase Subunit I*. *Berita Biologi*, 23 (2): 269-283.

Laltanpuui. N., S. Kumar & M. T. Mathai. (2014). Molecular and Phylogenetic Analysis of the Genus Orthetrum (Odonata: Anisoptera: Libellulidae) using Mitochondrial COI gene. *Science Vision* 14: (3).

Lamerkabel, J.S.A. (2017). *Tabiat Bersarang Lebah Madu Tak Bersengat Tetragonula biroi (F.) dan Tetragonula fuscobalteata (C.) Asal Pulau Ambon, Maluku*. Artikel Ilmiah. Presentasi Oral pada Seminar Nasional Perlebahan Indonesia. Kampus IPB Dramaga, Bogor.

Lamerkabel, J. S. A., Siahaya, V. G., Saepuloh, W., Lastriyanto, A., Junus, M., Erwan, Batoro, J., Jaya, F., dan Masyithoh, D. (2021). Karakteristik Morfologi dan Morfometrik Lebah Madu Tak Bersengat (Apidae; Melliponinae) pada Koloni di Daerah Pesisir Pulau Ambon. *Jurnal Budidaya Pertanian*, 17 (1): 28-35

- Lestari, D. A., Azrianingsih, R., dan Hendrian, H. (2018). Filogenetik Jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan Coding dan Non-coding sekuen DNA. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 3 (1): 1-7.
- Mahrus., Zulkifli, L., Hadisaputra, S., dan Ayu Putu Armyani, I. (2021). Penggunaan Bioinformatika dalam Pembelajaran Sains Untuk Menyelesaikan Kesulitan Belajar Siswa pada Materi Genetika di SMPN 20 Mataram. *Jurnal Pengabdian Magister Pendidikan IPA*, 4 (4): 290-295.
- Maksum, I. P., Sriwidodo, Gaffar, S., Hassan, K., Subroto, T., dan Soemitro, S. (2017). *Teknik Biologi Molekular*. Alqaprint. Jatinangor.
- Malik, D. M. (2019). *E-Modul Biologi*. Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta.
- Maramis, R. T. D., dan Warouw, V. (2014). Karakteristik DNA CO1 Serangga Laut Gerridae Yang Berasal Dari Pantai Mokupa Sulawesi Utara. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 1 (1): 1-7.
- Marconi, M., Modesti, A., Alvarez, L. P., Ogoña, P. V., Mendoza, A. C., Vecco-Giove, C. D., Luna, J. O., Giulio, A. D., and Mancini, E. (2022). DNA Barcoding of Stingless *Bees* (Hymenoptera: Meliponini) in Northern Peruvian Forests: A Plea for Integrative Taxonomy. *Diversity*, 14 (8): 632.
- Mawardi, A., Aisoi, L. E., dan Lefaan, P. N. (2018). Kloning dan Analisis Bioinformatika Gen MSP1 Plasmodium falciparum Isolat Kota Jayapura. *Jurnal Biologi Papua*, 10 (1): 1-10.
- Muliani, D. R., Yulianda, F., dan Butet, N. A. (2020). Karakteristik Gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI) Tiram Daging dari Genus *Crassostrea* Sebagai Identitas Jenis di Delta Cimanuk, Jawa Barat. *Jurnal Moluska Indonesia*. 4 (1): 8–16.
- Mursyidin, D. H. (2024). *Teknik Dasar Biologi Molekuler (Jilid 1)*. ULM Press. Banjarmasin.
- Novitasari, D. A., Elvyra, R., Roslim, D. I., Program, M., Biologi, S., Biologi, D. J., Matematika, F., Pengetahuan, I., Kampus Bina, A., dan Pekanbaru, W. (2014). Teknik Isolasi Dan Elektroforesis DNA Total Pada Kryptopterus Apogon (Bleeker 1851) Dari Sungai Kampar Kiri Dan Tapung Hilir Kabupaten Kampar Provinsi Riau. In *JOM FMIPA*, 1 (2): 258-261.

- Nugroho, R. B., dan Soesilohadi, H. (2014). Identifikasi Macam Sumber Pakan Lebah *Trigona* sp (Hymenoptera: Apidae) di Kabupaten Gunungkidul. *Biomedika*, 7 (2): 42-45.
- Nur, A. dan Syahrudin, K. (2016). *Aplikasi Teknologi Mutasi dalam Pembentukan Varietas Gandum Tropis*. Puslitbang Tanaman Pangan. Bogor.
- Nusantari, E. (2015). *Genetika Belajar Genetika dengan Mudah dan Komprehensif*. Penerbit Deepublish. Yogyakarta.
- Prasetyo, A., Raffiudin, R., Batubara, I., dan Ariyani, N. S. (2022). Perilaku Mencari Polen *Tetragonula laeviceps* pada dua Kebun Tanaman Obat. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 27 (3): 341-350.
- Prayuni, K., Razari, I., Nihayah, S., dan Yuliwulandari, R. (2023). Pengembangan Metode PCR Multipleks untuk Analisis Genotipe Null Gen GSTM1/GSTT1 pada Pasien Tuberkulosis. *ARTERI: Jurnal Ilmu Kesehatan*, 4 (4): 200-206.
- Priawandiputra, W., Azizi, M. G., Djakaria, K. M., Wicaksono, A., Raffiudin, R., Atmowidi, T., dan Buchori, D. (2020). *Panduan Budidaya Labah Tanpa Sengat (Stingless Bees) di Desa Perbatasan Hutan*. ZSL Indonesia.
- Priyambodo, Rustiati, E. L., Pratiwi, D. N., Susanto, A. W., Imtitsal, A., Fahrezi, A., Febriansyah, M., Kusuma, A. W., Srihanto, E. A., Saswiyanti, E., Sidik, M., Sa'uddah, L. D., Lestari, I. A., Yani, A. A., dan Ramadhan, V. (2023). Analisis Kualitatif Amplikon 16S rRNA Parsial Gen Mitokondria Lebah Tak Bersengat di Pesawaran. *Jurnal Biologi Tropis*, 23 (1): 557-563.
- Purba, M. S., Lamerlabel, J. S. A., dan Patty, J. A. (2023). Karakter Morfologi dan Morfometrik Lebah Sosial (Aphidae) di Pertanian Organik BEEMA HONEY Bogor. *Jurnal Pertanian Kepulauan*, 7 (2), 97-103.
- Purnama, Y. (2021). *Mengenal Wisata Peternakan Lebah Madu Suhita Bee Farm Bandarlampung*. <https://kabarsiger.com/read/mengenal-wisata-peternakan-lebah-madu-suhita-bee-farm-bandarlampung>. Diakses pada 10 November 2024 pukul 21.15.
- Putri, A. N. A., Indra, A. I. N., Merdekawati, F., dan Abror, Y. K. (2024). Optimasi Variasi Voltase Dan Waktu Terhadap Kualitas Pita DNA *Escherichia coli* Pada Proses Elektroforesis Gel Agarosa. *Jurnal Kesehatan Siliwangi*, 5 (2): 298-309.

- Rahayu, I. S., Budiarsa, I. M., Ashari, A., Trianto, M., Masrianih, dan Rafiq. Analisis Filogenetik Lebah Tukang Kayu *Xylocopa appendiculata* Smith, 1852 Berdasarkan Gen Cytochrome Oxidase 1 (CO1). *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 13 (1): 431 – 541.
- Rahayu, R. A., Pancasakti, H., dan Budiharjo, A. (2016). Pelacakan Gen Sitokrom Oksidase Subunit 1 (CO1) DNA Mitokondria Pada Itik Tegal (*Anas sp.*). *Bioma*, 18 (2): 114-133.
- Rahmad. (2013). *Taksonomi Molekuler DNA Barcoding dan Analisis Filogenetik Ikan Hiu di Pelabuhan Perikanan Palabuhanratu Berdasarkan Marka Mitokondria*. [Skripsi]. Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Rahmawati, D. dan Shabrina Hasyati. (2024). *Analisis Molekuler dan Bioinformatika*. SEAMEO BIOTROP. Bogor.
- Ramadhani, S., Rizky, V. A., dan Siregar, S. (2024). Analysis of The Result of DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) Electrophoresis on Vaginal Mucosal Swabs with Cervical Cancer Patients. *Medistra Medical Journal (MMJ)*, 2 (1), 20–25.
- Rani, W. M., Puspita, R. D., Sefina, N., Saâ, N., dan Achyar, A. (2024). Analisis Variasi Genetik Gen L1 HPV-52 Menggunakan RFLP secara in Silico. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 4 (1): 82-96.
- Rosadi. (2021). *Pengelolaan Lebah Madu Hutan Tesso Nilo Secara Lestari* (3). <https://prcfindonesia.org/pengelolaan-madu-hutan-tesso-nilo-secara-lestari-3/>. Diakses pada 10 Maret 2025 pukul 21.30.
- Rosmini, Rismiarti, Z., Indra, A. I. N., dan Wahyuni, Y. (2024). Variasi Konsentrasi dan Penggunaan Buffer Tris Acetat EDTA Berulang Terhadap Kualitas Pita DNA *Mycobacterium tuberculosis*. *Nutriture Journal*, 3 (2): 85-95.
- Rudini, M., Monita, D. N. K., Kuswanto, E., dan Listiana, I. (2024). Identifikasi Jenis dan Karakteristik Sarang Lebah Madu Tanpa Sengat (*Stingless Bee*) di Peternakan Lebah Simpur Desa Kecapi. *Biospecies*, 17 (1): 56-64.
- Sadam, B., Hariani, N., dan Fachmy, S. (2016). Jenis Lebah Madu Tanpa Sengat (*Stingless Bee*) di Tanah Merah Samarinda. *Prosiding Seminar Tugas Akhir FMIPA UNMUL*.

- Sahaba, M. A. B., Abdullah, A., dan Nugraha, R. (2021). DNA barcoding untuk autentikasi produk hiu segar dari perairan Nusa Tenggara Barat. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 24 (3), 425-432.
- Sardi, A. (2022). Bioinformatics: Challenges in Integrating Biological Information. *Jurnal Biologi Tropis*, 22 (4), 1297–1301.
- Sari, A. P. P., Mulyanti, D., dan Soewondo, B. P. (2024). Prediksi Epitop Sel B Berbasis Peptida Glikoprotein 160 sebagai Kandidat Vaksin Subunit untuk Infeksi Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Bandung Conference Series: Pharmacy*, 4 (2): 1063-1069.
- Sari, E., Jannah, M., Hariri, M. R., dan Homepage, J. (2023). Analisis Filogenetik *Tetrastigma* spp. in Silico. *Indonesian Genetic and Biodiversity Journal*. 1 (1): 1-6.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R dan Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer Pada Polymerase Chain Reaction (PCR) Untuk Sekuensing DNA: *Mini review*. In *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*. 5(1) : 93-102.
- Sayusti, T., Raffiudin, R., Atmowidi, T., Aisyah, C. N., Ludiyo, F. R., Bahar, R. A., Putra, R. E., Soesilohadi, R. H., dan Purnobasuki, H. (2023). High Genetic Variations of The Stingless Bee *Tetragonula laeviceps* Based on Mitochondrial DNA of Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (COI) Gene in Sumatra And Java, Indonesia. *Serangga*, 28 (3): 295–311.
- 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.
- Sakagami SF, Inoue T and Salmah. (1990) *Stingless Bees of Central Sumatra*. In *Sakagami SF, Ogushi R and DW Roubik (Eds). Natural History of Social Wasps and Bees in Equatorial Sumatera*. Hokkaido University Press. Sapporo:
- Souza, H. V., Marchesin, S. R. C., and Itoyama, M. M. (2016). Analysis of The Mitochondrial COI Gene and its Informative Potential for Evolutionary Inferences in The *Families Coreidae And Pentatomidae* (Heteroptera). *Genetics and Molecular Research*. *Genetics and Molecular Research*. 15 (1): 1-14.
- Supeno, B. dan Erwan. (2016). *Pengenalan Pembelajaran Tentang Lebah Madu (Honey Bees)*. Penerbit Arga Uji Press. Lombok.

- Taariwuan, M. B., Ngangi, J., Mokosuli, Y., dan Gedoan, S. (2021). DNA Barcoding Dalugha (*Cyrtosperma Merkusii*) di Kepulauan Talaud dan Minahasa Selatan Berdasarkan Gen *rbcl*. *JURNAL BIOS LOGOS*, 11(2), 134-138.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38 (7): 3022-3027.
- Tanzil, A. I., dan Fanata, W. I. D. (2024). Pengaruh Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Tembakau Terhadap Kualitas dan Kuantitas Hasil Ekstraksi. *Agradix*, 7 (2): 21-28.
- Wasdili, A. Q., dan Gartinah, F. (2018). Penentuan Kualitas Isolasi DNA *Salmonella Typhimurium* dengan Metode Spektrofotometri dan Elektroforesis. *Prosiding Pertemuan Ilmiah Nasional Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (PINLITAMAS 1) Dies Natalis ke-16 STIKES. In Jenderal Achmad Yani Cimahi PINLITAMAS 1*, 1 (1): 578-582.
- Widarti, A., Tauruslina, E., Faridah, I., Bagariang, W., Suyanto, H., Mahmudah, D., Susanti, R., Maryana, R., dan Carwika. (2022). Identifikasi dan Penentuan Pohon Filogenetik *Spodoptera frugiperda* Asal Jawa Berdasarkan Analisis Sekuen MtDNA COI. *Jurnal Proteksi Tumbuhan*, 4 (1): 44–53.
- Wulandari, A., Nurgiartiningsih, V. A., Kuswati, S. T., dan Agung, P. P. (2019). Filogeni Beberapa Sapi Lokal Indonesia Menggunakan DNA Mitokondria COI (*Cytochrome Oxidase Sub unit 1*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 6 (2): 278-282.
- Wulandari, E. F., Lenda Mawikere, N., dan Abbas, B. (2021.). Keragaman Morfologi dan Genetik Beberapa Aksesori Tanaman Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) Berdasarkan Penanda Molekuler Gen Mat-K. *Cassowary*, 4 (1): 68–86.
- Zein, M. S. A. (2018). Barkoding DNA Burung Elang (Famili Accipitridae) di Indonesia. *Berita Biologi*, 17 (2): 165-173.