

Morphology, morphometrics, and molecular characteristics of *Apis cerana* and *Apis nigrocincta* from Central Sulawesi, Indonesia

Nur'aini & Hari Purwanto*

Departemen Biologi Tropika, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Article History

Received : April 20th, 2021

Revised : April 29th, 2021

Accepted : May 02th, 2021

Published : May 08th, 2021

*Corresponding Author:

Hari Purwanto,

Departemen Biologi Tropika,

Fakultas Biologi, Universitas

Gadjah Mada, Yogyakarta,

Indonesia;

Email:

hari.purwanto@ugm.ac.id

Abstract: Systematics of honey bees has developed rapidly. Several studies have attempted to infer the kinship between each group of honey bees. This paper described morphology, morphometrics, and molecular characteristics of *A. cerana* and *A. nigrocincta*. The research was conducted in Central Sulawesi. This research was conducted in July 2020 - January 2021 at several sampling locations in Bakubakulu Village, Palolo District, Sigi Regency, Central Sulawesi Province, Indonesia. The selection of research locations was based on the different habitat conditions (diversity of plant sources for bee food and altitude) between sampling points, so that it was possible to find the two types of honey bees at the same location. The results showed that the two *Apis* bee species analyzed in this study, had similar morphological features compared to specimens of the same species from the other regions, whereas the morphometry of the two had variations in size compared to the same species that have been reported in other regions. The variations in the size or morphometric character of worker bees, both those with a larger or smaller size, possibly being a form of morphological adaptation to different environmental conditions. The CO1 and 16S Mitochondrial DNA sequences of *A. cerana* and *A. nigrocincta* from this study were similar to the sequences of the same species in the GeneBank's database. This study provide preliminary data contributing to the preservation and utilization of one of Indonesia's important biodiversity resources.

Keywords: Central Sulawesi; honey bees; morphology; morphometrics; molecular

Pendahuluan

Indonesia memiliki banyak spesies lebah madu yang tersebar luas di seluruh pulau (Engel, 2012). Pulau Sulawesi merupakan salah satu pulau dengan tingkat organisme yang tinggi, karena terbentuk dari proses ekologi dan geologi yang panjang, sehingga menghasilkan lanskap pulau yang unik (Whitmore, 1975). Pertama dari Sundaland yang menjadi wilayah Sulawesi Selatan; yang kedua muncul dari dasar Laut Banda Selatan membentuk Sulawesi Tenggara dan yang ketiga, yang semula bertabrakan dengan benua Australia, kini menjadi Sulawesi Utara (Hall, 2013). Dengan demikian, berbagai bagian Sulawesi ini adalah kawasan bagi banyak fauna asli dan endemik, termasuk lebah madu.

Lebah madu dikategorikan dalam ordo

Hymenoptera. Lebah ini termasuk dalam kelompok serangga eusosial yang hidup bersama di dalam sarang (Michener, 2007). Di alam, lebah madu berperan penting dalam proses penyerbukan tanaman (Roubik, 1989). Lebah madu dari genus *Apis* merupakan serangga sosial yang terkenal dengan produksi madunya. Indonesia memiliki lima spesies lebah madu yang berhasil yaitu *A. andreniformis*, *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nigrocincta*. *A. nigrocincta* merupakan lebah madu endemik di pulau Sulawesi dan pulau-pulau disekitarnya, sementara *A. cerana* merupakan lebah madu introduksi dari wilayah lain di Indonesia (Hadisoesilo, 2001).

Sulawesi Tengah merupakan salah satu provinsi di Sulawesi yang memiliki banyak bentang alam lingkungan yang berbeda;

perkebunan, lahan pertanian, hutan sekunder, taman nasional, dan pemukiman. Secara umum masyarakat di provinsi ini lebih memilih memelihara lebah madu Asia *A. cerana*, karena spesies ini lebih mudah didapatkan dibanding spesies lebah *Apis* lainnya. Informasi dan publikasi tentang keberadaan spesies lebah madu di Pulau Sulawesi masih kurang. Oleh karena itu, eksplorasi lebah madu di Pulau Sulawesi, dalam hal ini, akan memberikan informasi baru tentang keanekaragaman dan persebaran lebah madu tersebut. Karakter morfologi, morfometri dan analisis molekuler DNA mitokondria perlu diketahui karena dapat membantu dalam identifikasi spesies serta mempelajari biogeografi dan filogenetik lebah madu. Namun di Indonesia penelitian tentang hal ini masih kurang.

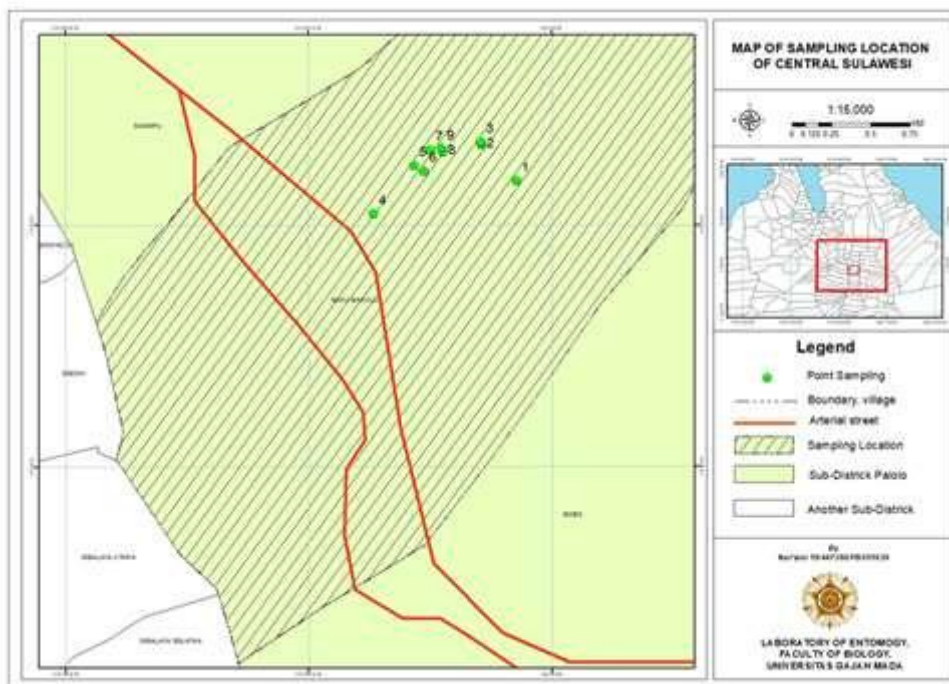
Untuk mendukung keberhasilan budidaya lebah madu dan konservasinya di Provinsi Sulawesi Tengah, perlu dilakukan identifikasi

spesies lebah madu yang ada di daerah tersebut. Dalam studi ini, kami mengeksplorasi karakteristik morfologi, morfometri, dan molekuler lebah madu *A. cerana* dan *A. nigrocincta* dari Provinsi Sulawesi Tengah, Indonesia.

Bahan dan Metode

Waktu dan Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2020 - Januari 2021 pada beberapa titik lokasi pengambilan sampel di Desa Bakubakulu, Kecamatan Palolo, Kabupaten Sigi, Provinsi Sulawesi Tengah, Indonesia (Gambar 1). Pemilihan lokasi penelitian didasarkan pada kondisi habitat (keanekaragaman tumbuhan sumber pakan lebah dan ketinggian tempat) yang berbeda antar titik sampling, sehingga memungkinkan ditemukannya kedua jenis lebah madu tersebut pada satu lokasi yang bersamaan.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel lebah madu di Desa Bakubakulu, Kecamatan Palolo, Kabupaten Sigi, Provinsi Sulawesi Tengah, Indonesia

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah termo cycle, dan mikroskop binocular XSZ-107 BN. Sedangkan, bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesimen lebah madu *A. cerana* dan *A. nigrocincta* (20 sampel untuk analisis morfologi dan morfometri, 12 untuk

analisis molekuler), etanol 96%, KIT Geneaid®. Pasangan primer mitokondria DNA 16S rRNA yang digunakan dalam penelitian ini adalah LR13107-F sebagai primer *Forward*: 5'-TGGCTGCAGTATAACT GACTGTACAAAGG-3' dan LR12647-R sebagai primer *Reverse*: 5'-GAAACCAATC

TGACTTACGTCGATTTGA-3' (Thummajitsakul *et al.*, 2013). Pasangan primer mitokondria DNA CO1 yang digunakan dalam penelitian ini adalah LCO 1490-F sebagai primer *Forward*: 5'-GGTCAAAAATCATAAAGATATTGG-3' dan HCO2198-R sebagai primer *Reverse*: 5'-TAAACTTCAGG GTGACC AAAAAATCA3' (Hammer *et al.*, 2001), PCR Kit (Go Taq Green ©), Nuclease free water, , Promega Wizard sv gel © dan PCR clean / up system kit ©, gel elektroforetik 1%, *buffer* TAE.

Identifikasi Morfologi dan Morfometri

Identifikasi spesimen lebah madu berdasarkan karakter morfologi didasarkan pada karakteristik seperti struktur tubuh secara keseluruhan, toraks, abdomen, kepala, antena, sayap, dan tungkai. Selanjutnya, sebanyak lima karakter morfologi lebah madu dipilih sebagai parameter pengukuran karakter morfometrik mengikuti Hadisoesilo (2001).

Analisis morfologi dan morfometri dilakukan di Laboratorium Entomologi Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Beberapa spesimen dari masing-masing spesies diambil untuk pengukuran dan pengamatan morfologi, terutama bagian warna. Gambar bagian tubuh seperti struktur tubuh secara keseluruhan, dada, perut, kepala, antena, sayap, dan tungkai untuk masing-masing spesies diambil dan dimasukkan ke dalam deskripsi masing-masing spesies. Analisis morfologi dan morfometri dilakukan dengan menggunakan mikroskop binocular XSZ-107 BN dengan perangkat Optilab viewer dan software Image Raster.

Identifikasi Molekuler

Setelah proses identifikasi morfologi dan morfometrik selesai dilakukan, maka dilakukan proses identifikasi molekuler. Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada. Proses analisis terdiri dari tiga tahap yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan sekuensing DNA di PT Genetika Science, Jakarta.

Untuk ekstraksi DNA, digunakan seluruh bagian lebah madu kecuali kepala dan sayap. Ekstraksi DNA lebah madu di ekstraksi dengan KIT Geneaid yang terdiri dari lima tahap sesuai protokol kit yaitu disosiasi jaringan, lisis, pengikatan DNA, pencucian, dan elusi DNA.

Selanjutnya dilakukan amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing DNA menggunakan primer mitokondria 16S rRNA dan CO1 seperti yang telah dijelaskan sebelumnya (Thummajitsakul *et al.*, 2013). Primer gen 16S rRNA; diselesaikan dalam 35 siklus dalam volume reaksi 30 µl berdasarkan Na-Nokorn *et al.* (2006) dan Mahendran *et al.* (2006). PCR dilakukan dalam kondisi berikut: pra-denaturasi 95°C selama 2 menit; 35 siklus denaturasi pada 95° C selama 30 detik; *annealing* pada 52°C selama 30 detik; extension pada 72°C selama 30 detik; dan hold pada 4°C. Sedangkan gen mitokondria CO1; PCR diselesaikan dalam 35 siklus dalam volume reaksi 30 µl, berdasarkan Na-Nokorn *et al.* (2006) dan Mahendran *et al.* (2006). PCR dilakukan dengan menggunakan campuran master GoTaq Green (Promega) dalam kondisi berikut: pra-denaturasi 95°C selama 2 menit; siklus denaturasi pada 95°C selama 30 detik; *annealing* pada 54° C selama 30 detik; extension pada 72°C selama 30 detik; dan hold pada suhu 4°C.

Analisis Data

Data morfologi dan morfometri yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA) dengan menggunakan PAST3 (Jolliffe, 2002). Analisis PCA dilakukan untuk mengetahui karakter pengelompokan guna mengetahui karakteristik diagnostiknya. Karakter yang digunakan dalam penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 1.

Data sekuens DNA dari proses sekuensing diperiksa dan diedit menggunakan perangkat lunak Gene Studio. Kemudian, urutan DNA dibandingkan dengan database Genbank menggunakan pencarian Nucleotide BLAST di situs NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Rekonstruksi filogram (pohon filogenetik) diselesaikan menggunakan metode Neighbor-Joining dengan nilai 1000 bootstrap dengan model Kimura 2-Parameter (K2P) pada program MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Hasil dan Pembahasan

Karakter Morfologi Lebah Madu

A. cerana

Tubuh lebah *A. cerana* berwarna kehitaman. Clipeus pada kepala berwarna hitam

ditutupi rambut berwarna kecoklatan. Antena berwarna hitam gelap terdiri atas skapula dan pedisel. Mandibula berwarna kehitaman pada setengah ujung bawah dan kuning kecoklatan pada pangkal dekat area malar bila dilihat dari samping. Toraks berwarna hitam ditutupi dengan rambut berwarna kuning kecoklatan hingga hitam pada bagian mesonotum. Femur kaki belakang berwarna hitam dengan ditutupi rambut berwarna kecoklatan. Tegula berwarna hitam gelap. Tibia pada tungkai berwarna hitam, tibia belakang agak berambut (*plumose*). Propodeum (segmen abdomen yang pertama) berwarna kuning kecoklatan tanpa rambut, licin, dan mengkilap. Tergum kedua sampai tergum ujung berwarna hitam. Jumlah hamuli sebanyak 17 (Gambar 2).

Apis nigrocincta

Tubuh lebah *A. nigrocincta* berwarna kuning kecoklatan. Clipeus pada kepala berwarna kuning ditutupi rambut berwarna kuning kecoklatan. Antena berwarna cokelat terdiri atas skapula dan pedisel. Mandibula berwarna kuning kecoklatan pada setengah ujung bawah dan kehitaman pada pangkal dekat area malar bila dilihat dari samping. Toraks berwarna

hitam ditutupi dengan rambut berwarna kuning kecoklatan hingga hitam pada bagian mesonotum. Femur kaki belakang berwarna kuning dengan ditutupi rambut berwarna kecoklatan. Tegula berwarna kuning kecoklatan. Tibia pada tungkai berwarna kecoklatan, tibia belakang agak berambut (*plumose*). Propodeum (segmen abdomen yang pertama) berwarna kuning kecoklatan tanpa rambut, licin, dan mengkilap. Tergum kedua sampai tergum ujung berwarna hitam. Jumlah hamuli sebanyak 19 (Gambar 3).

Karakter Morfometri Lebah Madu

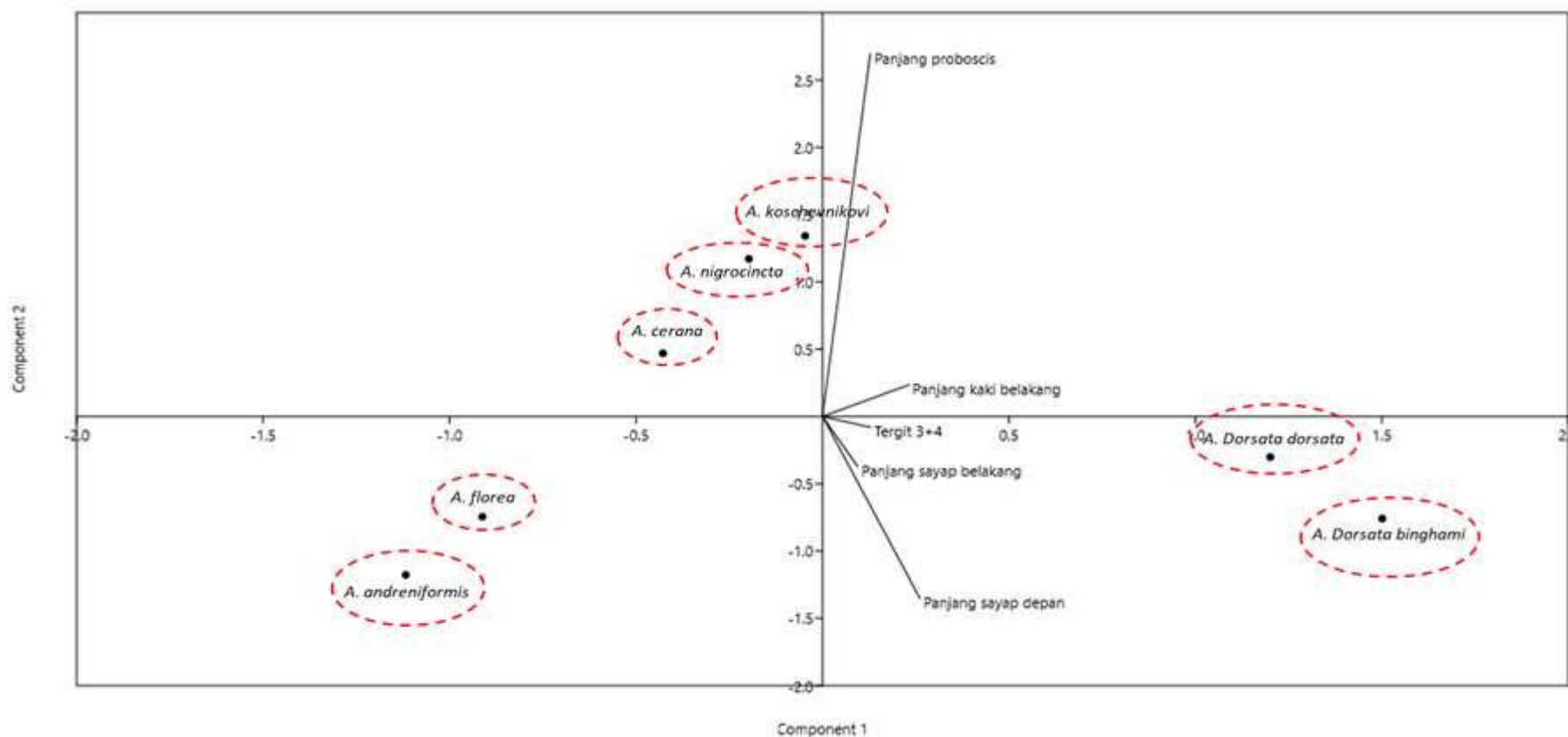
Morfometri *A. cerana* dan *A. nigrocincta* yang diperoleh memiliki ukuran yang bervariasi (Tabel 1). Selanjutnya data morfometri dianalisis menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA) untuk melihat karakter dominan yang mempengaruhi variasi pola pengelompokan individu lebah madu. PCA dilakukan dari data yang dikumpulkan. Analisis korelasi antar kelompok menghasilkan nilai eigen dan %varians ditunjukkan pada Tabel 2, sedangkan scatter plot dapat dilihat pada Gambar 4 dan Gambar 5.



Gambar 2. Karakter morfologi lebah *A. cerana*; a. gambar seluruh tubuh, b. kepala, c. mata ocelli, d. proboscis, e. toraks, f. sayap depan, g. sayap belakang, h. hamulli, i. kaki belakang, dan j. abdomen.

Tabel 1. Karakter morfometri *Apis cerana* dan *Apis nigrocincta* yang dibandingkan dengan data penelitian Hadisoesilo *et al.* (1999)

Karakter	<i>A. cerana</i> (N = 25)			<i>A. nigrocincta</i> (N = 25)			<i>A. cerana</i> (Hadisoesilo <i>et al.</i> , 1999)	<i>A. nigrocincta</i> (Hadisoesilo <i>et al.</i> , 1999)
	Min-Max	Rata-rata	SD	Min-Max	Rata-rata	SD		
Panjang proboscis		4,72			5,30		4,56	4,98
Panjang sayap depan		7,83			8,21		7,64	8,12
Panjang sayap belakang		2,91			2,77		2,66	2,73
Panjang kaki belakang		6,62			7,39		6,57	7,31
Tergit 3+4		3,29			3,82		3,26	3,71



Gambar 4. Hasil analisis PCA lebah madu

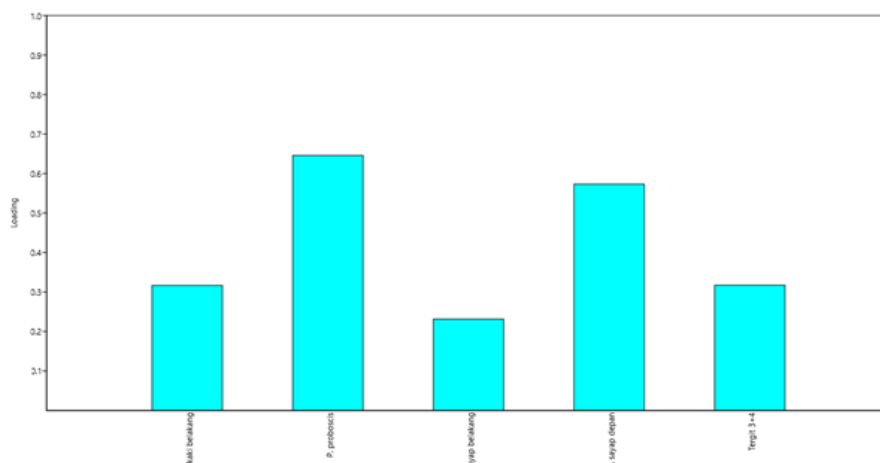


Gambar 3. Karakter morfologi lebah *Apis nigrocincta*; a. gambar seluruh tubuh, b. kepala, c. mata ocelli, d. proboscis, e. toraks, f. sayap depan, g. sayap belakang, h. hamulli, i. kaki belakang, dan j. abdomen.

Tabel 3. Eigenvalue & % Variance

PC	Eigenvalue	% Variance
1	2.09942	88.470
2	0.14281	6.0183
3	0.07752	3.2667
4	0.04604	1.9405
5	0.00318	0.1342

PCA menunjukkan pola pengelompokan sampel berdasarkan peran masing-masing karakter dalam proses pengelompokan. Loading plot komponen. Dari 75 individu *A. cerana* dan 75 individu *A. nigrocincta* yang dianalisis, terbentuk dua kelompok menurut spesiesnya, yaitu kelompok *A. cerana* dan *A. nigrocincta* (Gambar 4).



Gambar 5. Loading plot of component

Karakter Molekuler Lebah Madu

Hasil Amplifikasi DNA dan Similaritas Sampel

Enam sampel DNA mitokondria lebah *Apis* yang terdiri dari tiga sampel *A. cerana* dan tiga sampel *A. nigrocincta* pada penelitian ini berhasil diamplifikasi dengan teknik PCR. Elektroforesis menggunakan primer spesifik 16S rRNA dan COI menghasilkan produk PCR dengan panjang sekitar 510 bp. Sekuen DNA yang diperoleh dianalisis menggunakan *Nucleotide BLAST* pada web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Hasil analisis online *Nucleotide BLAST* berupa nilai *query cover* dan nilai similaritas yang ditunjukkan dengan nilai *identity*. *Query cover* dan *identity* secara berturut-turut merupakan persentase panjang *query* yang digunakan dalam pencarian database dan persentase similaritas dengan urutan database, semakin tinggi nilai parameter ini menunjukkan semakin mirip urutan database yang bersangkutan dengan *query*. Hasil analisis online *Nucleotide BLAST* yang digunakan disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil analisis BLAST gen mitokondria 16S rRNA dan COI

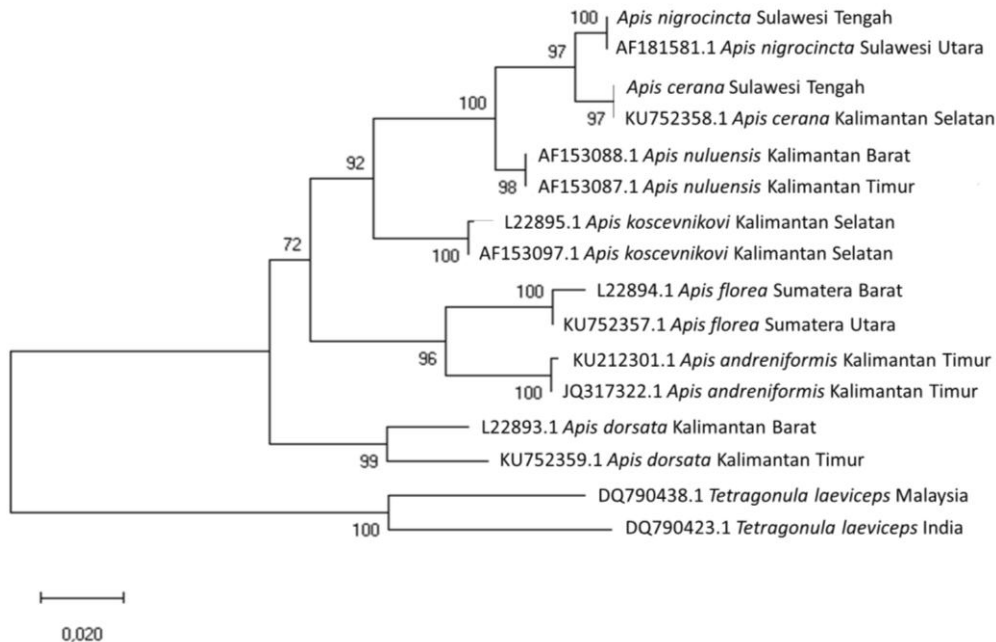
Sample	Sequence in Genebank	Accession Number	Query Qover	Identity	Author
16S rRNA					
AC	<i>A. cerana</i>	KX113623.1	95%	99.12%	Kek et al. (2016)
AC	<i>A. cerana</i>	FJ416891.1	90%	99.07%	Tan et al. (2009)
AC	<i>A. cerana</i>	JQ317307.1	86%	99.02%	Cao et al. (2012)
AC	<i>A. cerana</i>	AF153092.1	86%	99.02%	Tanaka et al. (2001)
AC	<i>A. cerana</i>	AF153089.1	86%	99.02%	Kato et al. (2001)
AC	<i>A. cerana</i>	KF572594.1	98%	98.72%	Tanaka et al. (2001)
AC	<i>A. cerana</i>	AF250954.1	90%	98.61%	Tanaka et al. (2001)
AC	<i>A. cerana</i>	KF572604.1	98%	97.72%	Tan et al. (2009)
AC	<i>A. cerana</i>	KU752358.1	89%	97.65%	Kek et al. (2016)
AC	<i>A. cerana</i>	HQ318939.1	89%	97.65%	Kek et al. (2016)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	AY588421.1	86%	99.75%	Raffiudin et al. (2007)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	AP018398.1	98%	99.36%	Takahashi et al. (2018)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	AF181581.1	86%	99.26%	Cameron (2001)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	NC_038114.1	98%	99.14%	Takahashi et al. (2018)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	KY799147.1	98%	98.72%	Eimanifar et al. (2017)
COI					
AC	<i>A. cerana</i>	MH588670.1	94%	97.53%	Fakrudin et al. (2013)
AC	<i>A. cerana</i>	MH588661.1	94%	97.53%	Fakrudin et al. (2013)
AC	<i>A. cerana</i>	MT027919.1	94%	97.37%	Fakrudin et al. (2013)
AC	<i>A. cerana</i>	KM242599.1	96%	97.26%	Tanaka et al. (2016)
AC	<i>A. cerana</i>	JQ350726.1	95%	97.23%	Tanaka et al. (2016)
AC	<i>A. cerana</i>	MT027916.1	94%	97.22%	Tanaka et al. (2016)
AC	<i>A. cerana</i>	KU212341.1	96%	97.11%	Takahashi et al. (2018)
AC	<i>A. cerana</i>	KU212337.1	96%	97.10%	Takahashi et al. (2018)
AC	<i>A. cerana</i>	KM242593.1	98%	97.01%	Tanaka et al. (2016)
AC	<i>A. cerana</i>	KM242600.1	98%	96.86%	Tanaka et al. (2016)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	MK880239.1	87%	99.33%	Lombogia et al. (2019)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	DQ020231.1	75%	98.84%	Tanaka et al. (2016)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	DQ020228.1	75%	98.84%	Tanaka et al. (2016)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	AP018398.1	99%	98.82%	Takahashi et al. (2018)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	DQ020232.1	75%	98.64%	Tanaka et al. (2016)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	DQ020233.1	75%	98.45%	Tanaka et al. (2016)

AN	<i>A. nigrocincta</i>	DQ020230.1	75%	98.45%	Tanaka et al. (2016)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	DQ020226.1	75%	98.45%	Tanaka et al. (2016)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	KY799147.1	99%	98.08%	Takahashi et al. (2018)
AN	<i>A. nigrocincta</i>	KY834222.1	95%	92.04%	Fakrudin et al. (2013)

Pohon Filogenetik

Rekonstruksi pohon filogeni fragmen DNA gen 16S rRNA (Gambar 6) dan CO1 (Gambar 7) pada lebah *Apis* menggunakan

software MEGA X dengan menggunakan data sekuen pembandingan dari kelompok *in group* dan *out group* yang di unduh dari NCBI.



Gambar 6. Rekonstruksi pohon filogeni gen 16S rRNA pada lebah madu

Pembahasan

Karakter Morfologi dan Morfometri Lebah Madu

Karakter morfologi *A. cerana* dari hasil penelitian ini memiliki karakter morfologi yang sesuai dengan deskripsi Hadisoesilo dan Otis (1996), Otis (1996), Damus dan Otis (1997), Hadisoesilo dan Otis (1998), dan Hadisoesilo *et al.* (1999).

Lebih lanjut, spesimen *A. cerana* (Gambar 2) yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki panjang proboscis (4,72 mm) yang lebih panjang dari spesimen yang dilaporkan oleh Hadisoesilo *et al.* (1999) menggunakan sampel dari Sulawesi Selatan (4,56 mm) dan Novita *et al.* (2013) menggunakan spesimen dari Bengkulu (2,89 mm). Hasil serupa juga terjadi pada empat karakter morfometrik lainnya yang diukur dalam penelitian ini, yaitu panjang sayap depan, panjang sayap belakang, panjang kaki belakang, dan tergit 3 + 4 yang lebih panjang dari penelitian

Hadisoesilo *et al.* (1999) dan Novita *et al.* (2013). Sedangkan jika dibandingkan dengan data penelitian Jasmi *et al.* (2012) yang menggunakan sampel dari Kepulauan Mentawai (4,81 mm) spesimen dalam penelitian ini memiliki panjang belalai yang lebih pendek.

Lebah pekerja *A. nigrocincta* (Gambar 3) yang dijelaskan dalam penelitian ini memiliki karakter morfologi yang sesuai dengan deskripsi Damus dan Otis (1997), Hadisoesilo dan Otis (1998). Lebih lanjut, spesimen *A. nigrocincta* yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki panjang proboscis (5,30 mm) lebih panjang dari spesimen yang dijelaskan oleh Hadisoesilo *et al.* (1999) menggunakan sampel dari Sulawesi Selatan (4,98 mm). Hasil serupa juga terjadi pada empat karakter morfometrik lainnya yang diukur dalam penelitian ini, yaitu panjang sayap depan, panjang sayap belakang, panjang kaki belakang, dan tergit 3 + 4 yang lebih panjang dari penelitian Hadisoesilo *et al.* (1999).

Secara morfologi karakter pembeda antara spesies *A. cerana* dan *A. nigrocincta* adalah pada bagian Clypeus serta femur kaki belakang yaitu pada *A. cerana* berwarna hitam sedangkan *A. nigrocincta* berwarna kuning.

Selanjutnya data morfometri yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan metode *Principal Components Analysis* (PCA). Menurut Saadudin (2012), analisis komponen utama merupakan teknik analisis yang sering digunakan dalam penelitian taksonomi karena teknik ini dapat mengidentifikasi peran masing-masing karakter dalam setiap kelompok yang terbentuk. Berdasarkan hasil analisis PCA didapatkan bahwa variasi ukuran morfometri pada setiap spesies lebah *Apis* asli Indonesia menyebabkan pola pengelompokan sampel yang berbeda. Komponen utama yang digunakan dan merepresentasikan data dalam proses analisis PCA adalah nilai pada PC1 (Tabel 3). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Jolliffe (2002), menyatakan bahwa banyaknya komponen utama yang dapat digunakan atau dianggap cukup representatif dalam analisis PCA adalah apabila %variance yang dihasilkan lebih dari 70%.

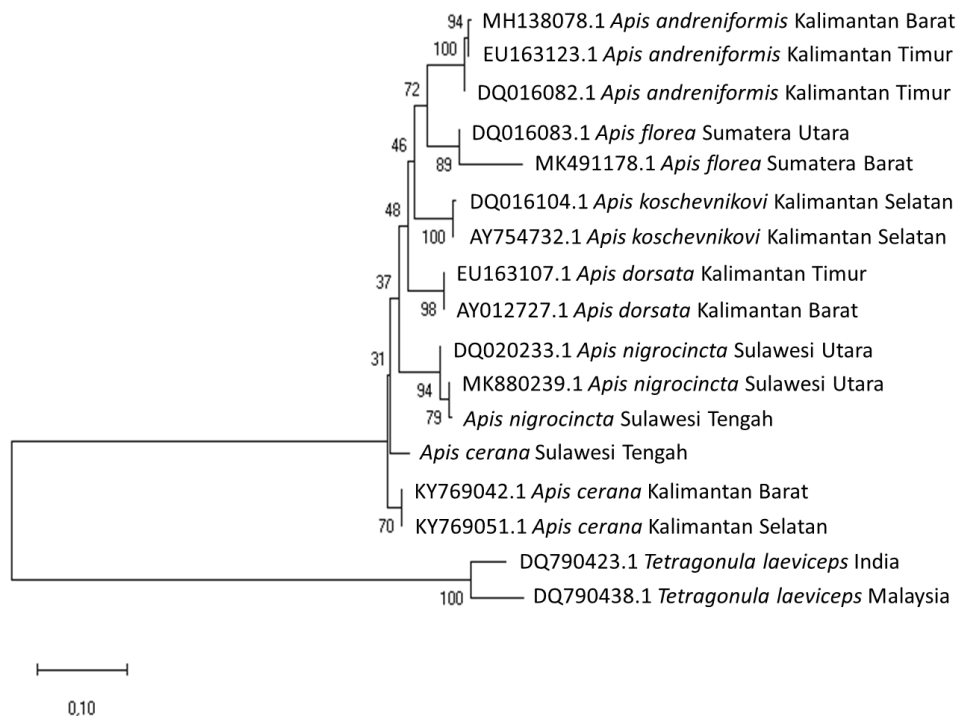
Dari lima karakter morfometri yang dianalisis, karakter yang paling dominan mempengaruhi pengelompokan lebah *Apis* adalah panjang proboscis. Hal ini dapat dilihat dari panjang garis panah (Gambar 4) dan panjang diagram yang dihasilkan (Gambar 5). Semakin panjang garis panah dan diagram yang terbentuk maka semakin tinggi peran karakter tersebut dalam pengelompokan tersebut. Berdasarkan hasil analisis PCA diperoleh hasil yang mendukung pengelompokan berdasarkan analisis cluster. Dari beberapa individu lebah *Apis* yang dianalisis, terbentuk tujuh kelompok berdasarkan spesiesnya, yaitu *A. andreniformis*, *A. florea*, *A. dorsata dorsata*, *A. dorsata binghami*, *A. cerana*, *A. nigrocincta*, dan *A. koschevnikovi*. Diagram menunjukkan pola pengelompokan sampel berdasarkan peran masing-masing karakter dalam proses pengelompokan.

Kedua spesies lebah *Apis* yang dianalisis dalam penelitian ini, yaitu *A. cerana* dan *A.*

nigrocincta, juga memiliki kemiripan morfologi dengan spesimen sejenis dari daerah lain, sedangkan morfometri kedua spesies tersebut memiliki variasi ukuran dibandingkan dengan spesies yang sama yang telah dilaporkan di wilayah lain. Variasi ukuran atau karakter morfometri lebah pekerja, baik yang memiliki perbedaan besar maupun kecil, dianggap sebagai bentuk adaptasi morfologi terhadap kondisi lingkungan yang berbeda. Penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Raffiudin (1999) dan Novita *et al.* (2013) yang menggunakan sampel lebah madu *A. cerana*. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan hukum Bergmann tentang pengaruh ketinggian terhadap ukuran hewan. Hukum Bergmann menyatakan bahwa hewan yang hidup di daerah tinggi memiliki ukuran tubuh yang lebih besar dibandingkan kerabatnya di daerah rendah. Selain itu, variasi ukuran atau karakter morfometri lebah pekerja, baik yang memiliki perbedaan ukuran besar maupun kecil, dianggap sebagai bentuk adaptasi morfologi terhadap kondisi lingkungan yang berbeda. Perbedaan kondisi lingkungan tersebut menyebabkan perbedaan aktivitas terbang dan mencari makan yang mempengaruhi ukuran rangkong. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Novita *et al.* (2013) bahwa perubahan suhu atau kondisi lingkungan akan menyebabkan makhluk hidup beradaptasi secara morfologis sebagai bentuk penyesuaian diri terhadap lingkungan dan perbedaan aktivitas terbang dan mencari makan. Hal ini juga didukung oleh pernyataan Ruttner (1992) bahwa pada lebah madu, perubahan kondisi lingkungan akan menyebabkan organisme beradaptasi secara morfologis sebagai bentuk penyesuaian terhadap lingkungan

Karakter Molekuler Lebah Madu

Dalam penelitian ini *Tetragonula laeviceps* dan *Tetragonula iridipennis* yang juga termasuk dalam anggota famili Apidae digunakan sebagai *out group*, sedangkan anggota masing-masing spesies dari lokasi yang berbeda di GenBank digunakan sebagai data pembanding *in group*.



Gambar 7. Rekonstruksi pohon filogeni gen CO1 pada lebah madu

Analisis filogenetik dilakukan antara 12 sampel lebah madu yang ditemukan dalam penelitian dengan data pembandingan hasil BLAST pada GenBank. Hasil analisis filogenetik berdasarkan urutan nukleotida gen mitokondria 16S rRNA (Gambar 6) dan CO1 (Gambar 7) menunjukkan telah terbentuk beberapa clade dengan masing-masing spesies berada pada clade yang sama. Hal ini didukung oleh nilai bootstrap yang besar antara 98-100% dan memiliki jarak genetik yang kecil yaitu di bawah 3,5% yang menunjukkan bahwa individu tersebut masih dalam satu spesies. Karena menurut Zemplak *et al.* (2009) ambang jarak genetik suatu spesies adalah 3,5%. Sedangkan berdasarkan analisis pada BOLD System dengan menggunakan gen CO1, ambang jarak genetik suatu spesies adalah 3%. Jika jarak genetik dua individu atau kelompok individu melebihi nilai tersebut, maka mereka tidak berada dalam kelompok spesies yang sama (spesies berbeda).

Berdasarkan rekonstruksi pohon filogenetik, terlihat bahwa 2 spesies lebah *Apis* yang dianalisis memiliki hubungan genetik yang paling dekat dengan spesies sejenis yang datanya berasal dari GenBank. Berdasarkan analisis gen 16S rRNA (Gambar 6), clade pertama

menunjukkan bahwa *A. nigrocincta* Sulawesi Tengah 1, *A. nigrocincta* Sulawesi Tengah 2, dan *A. nigrocincta* Sulawesi Tengah 3 berada dalam clade yang sama dengan sampel *A. nigrocincta* dari Genbank dengan nomor akses AF181581.1 yang berasal dari Sulawesi Utara dengan nilai bootstrap 100%. Jarak genetik *A. nigrocincta* Sulawesi Tengah dan AF181581.1 *A. nigrocincta* Sulawesi adalah 0% (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa sampel lebah madu yang ditemukan dalam penelitian ini adalah spesies *A. nigrocincta*.

Selanjutnya pada clade kedua terlihat bahwa sampel *A. cerana* Sulawesi Tengah memiliki hubungan genetik yang paling dekat dengan sampel KU752358.1 yang berasal dari Kalimantan Selatan. Hal ini didukung dengan nilai bootstrap yang tinggi yaitu 97% (Gambar 6).

Sedangkan berdasarkan analisis menggunakan gen mitokondria CO1, clade pertama dapat diketahui bahwa sampel *A. nigrocincta* Sulawesi Tengah 1, *A. nigrocincta* Sulawesi Tengah 2, dan *A. nigrocincta* Sulawesi Tengah 3 berada pada clade yang sama dengan sampel *A. nigrocincta* dari Genbank dengan nomor akses MK880239.1 yang berasal dari

Sulawesi Utara dengan nilai bootstrap 94%, dibandingkan dengan sampel DQ020233.1 yang berasal dari Sulawesi Utara dengan nilai bootstrap sama 94% (Gambar 7). Jarak genetik *A. nigrocincta* Sulawesi Tengah dan *A. nigrocincta* Sulawesi Utara adalah 0,1% (Tabel 6). Hal ini menunjukkan bahwa sampel lebah madu yang ditemukan dalam penelitian ini adalah spesies *A. nigrocincta*.

Selanjutnya pada clade kedua terlihat bahwa sampel *A. cerana* Sulawesi Tengah memiliki hubungan genetik yang paling dekat dengan sampel KY769042.1 yang berasal dari Kalimantan Barat dan KY769051.1 yang berasal dari Kalimantan Selatan dengan nilai bootstrap sebesar 70% (Gambar 7). Adapun nilai jarak genetik antar keduanya yaitu 4% (Tabel 6). Rendahnya nilai bootstrap dan tingginya nilai jarak genetik mengindikasikan bahwa kedua spesies tersebut berasal dari populasi yang terpisah (Tabel 6).

Berdasarkan hasil analisis di atas diketahui bahwa analisis morfologi, morfometri dan molekuler menghasilkan identifikasi yang sama. Analisis kekerabatan dalam penelitian ini menggunakan gen mitokondria 16S rRNA dan CO1. Hal ini dilakukan karena gen mitokondria 16S rRNA dan CO1 memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan gen lain dalam proses analisisnya, terutama pada ordo Hymenoptera. Hal ini didukung oleh pernyataan Whitfield dan Cameron (1998) bahwa gen mitokondria 16S rRNA dan CO1 merupakan gen yang paling informatif untuk analisis filogenetik antara spesies atau populasi yang berkerabat dekat, antar suku, subfamili dan famili. Lebih lanjut, penggunaan gen 16S rRNA dan CO1 juga dapat memberikan solusi terhadap permasalahan morfologi yang muncul seperti *cryptic species* dan *sibling species*. Selain itu, pemilihan gen mitokondria 16S rRNA dan CO1 pada penelitian ini didasarkan pada jumlah database lebah *Apis* yang tersedia di website NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pada data NCBI sekuens spesies lebah *Apis* sebagian besar menggunakan gen 16S rRNA dan CO1 dibandingkan dengan gen lain, sehingga dapat digunakan sebagai sumber data untuk analisis atau perbandingan sekuens pada penelitian ini.

Kesimpulan

Secara morfologi karakter pembeda antara spesies *A. cerana* dan *A. nigrocincta* adalah pada bagian Clypeus serta femur kaki belakang yaitu pada *A. cerana* berwarna hitam sedangkan *A. nigrocincta* berwarna kuning. *A. cerana* dan *A. nigrocincta*, juga memiliki kemiripan morfologi dengan spesimen sejenis dari daerah lain, sedangkan morfometri kedua spesies tersebut memiliki variasi ukuran dibandingkan dengan spesies yang sama yang telah dilaporkan di wilayah lain. Sedangkan karakter molekuler antara dua spesies ini dapat dilihat pada filogenetik dan jarak genetik yang terbentuk.

Ucapan terima kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Bapak Darwin dan rekan kami Manap Trianto, S.Pd., M.Sc yang telah membantu dalam proses pengambilan sampel, serta staf dari Laboratorium Entomologi, Fakultas Biologi, dan Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia yang telah memberikan fasilitas di Laboratorium selama penelitian.

Referensi

- Amin E., Rebecca T. K., Edward L. B., Stefan F., Bernd G. & James D. E. (2017). The complete mitochondrial genome and phylogenetic placement of *Apis nigrocincta* Smith (Insecta: Hymenoptera: Apidae), an Asian, cavity-nesting honey bee. *Mitochondrial DNA Part B*. 2 (1) : 249-250. DOI: 10.1080/23802359.2017.1318683
- Christian A. L., Max T., Jimmy P. & Trina E. T. (2020). Bacterial Composition, Community Structure, and Diversity in *Apis nigrocincta* Gut. *International Journal of Microbiology*. 2 (1) : 3-4. Doi : <https://doi.org/10.1155/2020/6906921>
- Damus M. S. & Otis G. W. (1997). A morphometric analysis of *A. cerana* F and *A. nigrocincta* Smith populations from Southeast Asia. *Apidologie* 28: 309- 323. DOI : 10.1051/apido:19970507
- Engel M. S. (2012). The Honey Bees of Indonesia (Hymenoptera: Apidae).

- Treubia*39: 41-49. DOI: 10.14203/treubia.v39i0.22
- Fakrudin, B., Babu, K. O., & Yerimani. (2013). A Genetic Diversity and Phylogeography of *Apis cerana* Fabricius. Biotechnology, Ministry of Science and Technology Govt of India. 1(2): 5-13.
- Hadisoesilo S. (2001). Keanekaragaman spesies lebah madu asli Indonesia. *Biodiversitas* 2: 123-128.
<https://docplayer.info/35346988-Review-keanekaragaman-spesies-lebah-madu-asli-indonesia.html>
- Hadisoesilo S. & Otis G. W. (1996). Drone flight times confirm the species status of *Apis nigrocincta* Smith, 1861 to be a species distinct from *Apis cerana* F. in Sulawesi, Indonesia. *Apidologie* 27: 361-369. DOI : 10.1051/apido:19960504
- Hadisoesilo S. & Otis G. W. (1998). Differences in drone cappings of *Apis cerana* and *Apis nigrocincta*. *J. Apic. Res.* 37: 11-15. DOI : 10.1080/00218839.1998.11100948
- Hadisoesilo S., Otis G. W. & Meixner M. (1995). Two distinct populations of cavity-nesting honey bees (Hymenoptera: Apidae) in South Sulawesi, Indonesia. *J. Kansas Entomol. Soc.* 68: 399-407. <https://www.jstor.org/stable/25085613?seq=1>
- Hadisoesilo S., Meixner M. & Rutter F. (1999). Geographic variation within *Apis koschevnikovi* Buttel-Reepen, 1906 in Borneo. *Treubia* 31: 305-311. DOI : 10.14203/treubia.v31i3.612
- Hall R. (2013). The palaeography of Sundaland and Wallacea since the late Jurassic. *Journal of Limnology* 72: 1-7. <http://doi/Org/10.4081/jlimnol.2013.s2.el>
- Hidayat T. & Pancoro A. (2008). Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik. *Jurnal Agro Biogen* 4: 35-40. <https://media.neliti.com/media/publication/73243-ID-ulasan-kajian-filogenetika-molekuler-dan.pdf>
- Jasmi S., Salmah D. & Syamsuardi. (2012). Studi morfologi *Apis* spp (Hymenoptera: Apidae) yang bersarang dalam rongga di Sumatera Barat dengan Program Komputer. Seminar. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas. Padang.
- Jolliffe L. T. (2002). Principal Component Analysis, Second Edition. New York: Springer-Verlag.
- Ken T., Natapot W. & Deborah S. (2009). Mitochondrial DNA diversity of Chinese *Apis cerana*. *Apidologie*. 38 (2) : 238-246. DOI: 10.1051/apido:2007008
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Vol.* 35(6): 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Maa T. C. (1953). An inquiry into the systematics of the tribus Apidini or honeybees (Hymenoptera). *Treubia* 21: 525-640. <https://doi/full/10.1080/23802359.2018.1450672>
- Mahendran B., Ghosh S. K. & Kundu S. C. (2006). Molecular phylogeny of silkproducing insects based on 16S ribosomal RNA and cytochrome oxidase subunit I genes. *J. Genetic* 85: 31-38. DOI: [10.1007/BF02728967](https://doi.org/10.1007/BF02728967)
- Maria C. A. & Walter S. S. (2012). Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37 (5) : 25–35. doi:10.1016/j.ympev.2005.02.017
- Michener C. D. (2007). *The Bees of The World*. Second Edition. The Johns Hopkins Univ. Pr, Baltimore, USA.
- Na-nokorn U. K., Sripairoj S., Sukmanomon S., Poompuang & Kamonrat W. (2006). Polymorphic microsatellite from DNA of the endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* (Chevey), and crossspecies amplification in three species of *Pangasius*. *Mol Ecol* 6: 1174-1176. DOI: [10.1111/j.1471-8286.2006.01481.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01481.x)
- Novita R. S. & Sutriyono. (2013). Analisis morfometrik lebah madu pekerja *Apis cerana* budidaya pada dua ketinggian tempat yang berbeda. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia* 8: 41-

- 56.<https://doi.org/10.31186/jspi.id.8.1.41-56>
- Otis G. W. (1996). Distributions of recently recognized species of honey bees (*Apis* spp.) in Asia. *J Kansas Entomology Soc Supp* 69: 311-333.<https://www.jstor.org/stable/25085727>
- Raffiudin R., Sosromarsono, Ratna E. S. & Solihin DD. (1999). Keragaman morfologi lebah *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) di Jawa Barat. *Journal HPT IPB Bogor* 20-25.<https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/29232>
- Roubik D. W. (1989). Stingless bee nesting biology. *Apidologie* 37: 124-143.DOI: 10.1051/apido:2006026
- Ruttner, F. (1992). *Naturgeschichte der Honigbienen*. Ehrenwirth Verlag, Munich.
- Saadudin A. M., Himat A. & Prasetyo L. B. (2012). Pemetaan kesesuaian habitat *Rafflesia rochussenii* di Resort Tapos Tman Nasional Gunung Gede Pengrango. *Media Konservasi* 17: 35-41. <http://doi.org/10.29244/medkon.17.3.%p>.
- Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Siok P. K., Nyuk L. C., Sheau W. T., Yus A. Y., Lee S. C. (2016). Molecular identification of honey entomological origin based on bee mitochondrial 16S rRNA and COI gene sequences. *Food Control*. 5 (1) : 24-28. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.02.025
- Ydney A. Cameron, & Patrick M. (2001). Multiple Molecular Data Sets Suggest Independent Origins of Highly Eusocial Behavior in Bees (Hymenoptera: Apinae). *Syst Biol*. 50 (2): 194 –214
- Takahashi J., Hadisoesilo S., Okuyama H. & Hepburn H. R. (2017). Analysis of the complete mitochondrial genome of *Apis nigrocincta* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) on Sangihe Island in Indonesia. *Conservation Genetics Resources*. 10(4): 22-32.
- Tanaka H., D. W. Roubik., M. K., Liew, & Gunsalam. (2001). Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Insectes soc.* 48 (1) : 44 – 51
- Thummajitsakul S., Silprasit K., Klinbunga S. & Sittipraneed S. (2013). The partial mitochondrial sequence of the Old World stingless bee, *Tetragonula pagdeni*. *J Genetic* 92: 1-5. DOI: 10.1007/s12041-013-0243-1
- Tingek S., Koeniger G. & Koeniger N. (1996). Description of a new cavity dwelling species of *Apis* (*Apis nuluensis*) from Sabah. Borneo with note on its occurrence and reproductive biology (Hymenoptera: Apoidea, Apini). *Senckenbergiana Biologica* 76: 115-119.
- Whitfield J. B. & Cameron S. A. (1998). Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S Rrna gene among Hymenoptera. *Mol Biol Evol* 15: 1728-1743.<https://academic.oup.com/mbe/article/15/12/1728/963108>
- Whitmore T. C. (1975). *Tropical Rain Forest of The Far East*. Clarendon Press, Oxford.
- Zemlak T. S., Ward R. D., Connel A. D., Holmes B. H. & Hebert P. D. N. (2009). DNA barcoding reveals overlooked marine fisher. *Mol Ecol Resour* 9: 237-24.<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1755-0998.2009.02649.x>

Tabel 5. Jarak genetik lebah madu *Apis cerana* dan *Apis nigrocincta* berdasarkan gen mitokondria 16S rRNA

Apis nigrocincta Sulawesi Tengah															
AF181581.1 Apis nigrocincta Sulawesi Utara	0,00														
Apis cerana Sulawesi Tengah	0,02	0,02													
KU752358.1 Apis cerana Kalimantan Selatan	0,02	0,02	0,00												
AF153088.1 Apis nuluensis Kalimantan Barat	0,03	0,03	0,04	0,04											
AF153087.1 Apis nuluensis Kalimantan Timur	0,03	0,03	0,04	0,04	0,00										
L22895.1 Apis koschevnikovi Kalimantan Selatan	0,09	0,09	0,09	0,09	0,06	0,06									
AF153097.1 Apis koschevnikovi Kalimantan Selatan	0,08	0,08	0,08	0,08	0,06	0,06	0,01								
L22894.1 Apis florea Sumatera Barat	0,15	0,15	0,15	0,15	0,12	0,11	0,10	0,11							
KU752357.1 Apis florea Sumatera Utara	0,14	0,14	0,13	0,13	0,11	0,11	0,10	0,10	0,01						
KU212301.1 Apis andreniformis Kalimantan Timur	0,12	0,12	0,12	0,12	0,11	0,11	0,10	0,10	0,06	0,06					
JQ317322.1 Apis andreniformis Kalimantan Timur	0,14	0,14	0,13	0,13	0,11	0,11	0,09	0,09	0,05	0,05	0,00				
L22893.1 Apis dorsata Kalimantan Barat	0,14	0,14	0,13	0,13	0,10	0,10	0,11	0,10	0,11	0,11	0,12	0,11			
KU752359.1 Apis dorsata Kalimantan Timur	0,14	0,14	0,13	0,13	0,12	0,12	0,11	0,11	0,12	0,12	0,13	0,12	0,04		
DQ790438.1 Tetragonula laeviceps Malaysia	0,29	0,29	0,27	0,27	0,28	0,28	0,26	0,26	0,26	0,23	0,32	0,28	0,26	0,24	
DQ790423.1 Tetragonula iridipennis India	0,29	0,29	0,27	0,27	0,28	0,29	0,26	0,25	0,28	0,25	0,34	0,29	0,27	0,25	0,1

Tabel 6. Jarak genetik lebah madu *Apis cerana* dan *Apis nigrocincta* berdasarkan gen mitokondria COI

Apis nigrocincta Sulawesi Tengah																			
MK880239.1 Apis nigrocincta Sulawesi Utara	0,01																		
DQ020233.1 Apis nigrocincta Sulawesi Utara	0,02	0,00																	
Apis cerana Sulawesi Tengah	0,07	0,08	0,09																
KY769051.1 Apis cerana Kalimantan Selatan	0,10	0,09	0,07	0,04															
KY769042.1 Apis cerana Kalimantan Barat	0,10	0,09	0,07	0,05	0,00														
MH138078.1 Apis andrniformis Kalimantan Barat	0,14	0,13	0,12	0,12	0,10	0,10													
EU163123.1 Apis andreniformis Kalimantan Timur	0,13	0,12	0,11	0,11	0,10	0,10	0,01												
DQ016082.1 Apis andreniformis Kalimantan Timur	0,13	0,12	0,11	0,11	0,10	0,10	0,01	0,00											
DQ016083.1 Apis florea Sumatera Utara	0,14	0,14	0,11	0,11	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08										
MK491178.1 Apis florea Sumatera Barat	0,16	0,16	0,17	0,15	0,15	0,14	0,14	0,15	0,14	0,07									
DQ016104.1 Apis koschevnikovi Kalimantan Selatan	0,13	0,12	0,11	0,09	0,08	0,08	0,11	0,10	0,10	0,09	0,18								
AY754732.1 Apis koschevnikovi Kalimantan Selatan	0,12	0,12	0,11	0,09	0,08	0,08	0,11	0,10	0,09	0,09	0,18	0,00							
EU163107.1 Apis dorsata Kalimantan Timur	0,12	0,11	0,09	0,09	0,08	0,08	0,10	0,09	0,09	0,09	0,22	0,09	0,09						
AY012727.1 Apis dorsata Kalimantan Barat	0,12	0,12	0,09	0,09	0,08	0,08	0,10	0,09	0,09	0,09	0,21	0,09	0,09	0,00					
DQ790438.1 Tetragonula leviceps Malaysia	1,05	1,04	1,05	1,00	1,00	1,00	1,11	0,11	0,10	1,08	1,18	1,08	1,07	1,04	1,04				
DQ790423.1 Tetragonula ridipennis India	1,02	1,06	1,04	1,00	0,99	0,99	1,09	1,10	1,08	1,05	1,13	1,07	1,07	1,03	1,03	0,11			