

PENELUSURAN ASAL WILAYAH LEBAH MADU *A. mellifera* DI INDONESIA MENGGUNAKAN DAERAH INTERGENIK *cox1/cox2* DNA MITOKONDRIA

(Search Region of Origin Honey Bee *A. mellifera* in Indonesia Region Using Mitochondrial DNA intergenic *cox1/cox2*)

M. Rusdi Hidayat

Baristand Industri Pontianak, Jl. Budi Utomo No. 41 Pontianak

Email : m_rusdi_h@yahoo.com

ABSTRACT. *Apis mellifera* is a favourite honey bee for the beekeepers throughout many countries. This species comprise of 24 subspecies. Based on phylogeography and morphometric evidences, these subspecies have been grouped into four lineage; namely the African (A), Western and Northern Europe (M), Southeastern Europe (C), and Near Eastern (O). *Apis mellifera* have been imported to Indonesia since 1972, and mostly from Australia. However, until recently there are no data about the *A. mellifera* subspecies and the origin. Therefore the objective of this research is to determine the lineage of *A. mellifera* in Indonesia based on mtDNA intergenic region between *cox1/cox2* genes. In this region there are two DNA fragments, P and Q fragrant, that can be used to determine the *A. mellifera* lineage. The methodology used consist of samples collection, DNA isolation, DNA amplification, DNA restriction using *DraI* enzyme, DNA sequencing, and DNA alignment using Clustal X and MEGA spftwares. DNA fragment amplified by using E2 and H1 primer revealed a 863 bp. Digestion of the region with the *DraI* restriction enzyme revealed one haplotype, which consist of five DNA fragments. Based on DNA sequences and DNA alignment, *A. mellifera* in Indonesia was homologue with the C lineage. Its subspecies is *A. m. ligustica* that lived natively in Italy, they were imported to Indonesia from Australia

Keywords: *A. mellifera*, intergenic region *cox1/cox2*, mtDNA

1. PENDAHULUAN

Apis mellifera merupakan jenis lebah madu utama yang dibudidayakan di banyak negara, termasuk Indonesia. Para peternak memilih lebah ini karena daya adaptasinya yang tinggi terhadap berbagai keadaan iklim, menghasilkan banyak madu, dan tidak terlalu agresif (Gojmerac, 1983). *Apis mellifera* termasuk ke dalam Ordo *Hymenoptera*, Famili *Apidae* dan Sub Famili *Apinae* (Borror *et al.*, 1982).

Persebaran alami *A. mellifera* adalah di daerah Timur Tengah, Afrika, dan Eropa. Wilayah persebarannya yang sangat luas meliputi berbagai kondisi iklim dan

habitat menyebabkan lebah ini telah berevolusi menjadi 24 subspecies (Ruttner, 1988). Berdasarkan analisis multivariat dari morfometrik bagian-bagian tubuh lebah ini, Ruttner (1988) membagi ke-24 subspecies ini menjadi empat kelompok garis keturunan (*lineage*) yaitu A, meliputi Afrika; M, meliputi Eropa Utara dan Barat; C, meliputi Eropa Selatan; dan O, meliputi Timur Tengah. Pengelompokan yang sama juga dihasilkan oleh Arias dan Sheppard (1996) berdasarkan DNA mitokondria.

DNA mitokondria (DNAm) banyak digunakan untuk mempelajari biogeografi dan filogenetik lebah madu (Koulianos

dan Crozier, 1997), seperti yang dilakukan oleh Garnery *et al.* (1995) di Maroko dan Spanyol, Franck *et al.* (2000b) di Italia, Zaitoun S *et al.* (2008) di Yordania, dan Ozdil F *et al.* (2009) di Turki. DNAm banyak digunakan untuk studi filogenetik karena pola pewarisannya yang diturunkan secara maternal, ukurannya yang relatif kecil (sekitar 16 kb), banyak terdapat di dalam sel, mengandung sedikit intron, dan tidak ada atau sedikit terjadi rekombinasi gen (Smith, 1991).

Daerah intergenik diantara gen *cytochrome oksidase I* dan *cytochrome oksidase II (cox1/cox2)* pada genom mitokondria *A. mellifera* memiliki panjang urutan basa yang bervariasi. Berdasarkan Cornuet *et al.* (1991) di daerah ini terdapat dua tipe fragmen DNA yang diberi nama P/Po dan Q. Tipe P berukuran 54-56 pb, Po berukuran 62-69 pb, dan Q berukuran 192-193 pb. Setiap kelompok subspecies *A. mellifera* mempunyai kombinasi tipe fragmen DNA yang berbeda pada daerah ini. Pada kelompok A terdapat fragmen Po dan Q; pada kelompok M terdapat fragmen P dan Q; sedangkan pada kelompok C hanya terdapat fragmen Q. Kelompok O mempunyai pola yang mirip dengan kelompok A (Po dan Q). Berdasarkan Franck *et al.* (2000a) perbedaan kelompok A dengan O terdapat pada fragmen Po, yaitu terjadi 1-2 insersi/delesi pada kelompok O yang menyebabkan terdapat tambahan situs restriksi bila dipotong dengan enzim restriksi *DraI*. Variasi pada daerah intergenik *cox1/cox2* mtDNA *A. mellifera* ini telah digunakan oleh Clarke *et al.* (2001) untuk mengetahui daerah asal *A. mellifera* yang telah diintroduksi ke Meksiko sejak awal abad ke-20.

Pengembangan *A. mellifera* di Indonesia banyak dilakukan oleh para peternak lebah madu di Jawa Tengah dan Jawa Timur. Pengembangan *A. mellifera* di luar pulau Jawa hingga saat ini belum dapat dilakukan dikarenakan terkendala berbagai macam hal, seperti masalah ketersediaan pakan dan pemasaran. Hingga saat ini data keberadaan *A. mellifera* pada tingkat peternak di Indonesia, yang mencakup subspecies dan asal daerahnya belum tersedia. Penelitian

ini merupakan tahap awal untuk mengidentifikasi dan untuk mengetahui keberadaan subspecies-subspecies *A. mellifera* yang ada di Indonesia dengan teknik molekuler menggunakan DNA mitokondria. Sehingga tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui asal wilayah dan subspecies *A. mellifera* yang ada di Indonesia berdasarkan analisis daerah intergenik *cox1/cox2* genom mitokondria.

2. METODE PENELITIAN

Sampel lebah madu *A. mellifera* berasal dari berbagai peternakan lebah madu di pulau Jawa, Indonesia. Lebah disimpan dan diawetkan dalam etanol absolut. Sumber DNA lebah yang digunakan adalah bagian toraks lebah pekerja.

Koleksi Lebah

Pengkoleksian lebah madu dilakukan di Kabupaten Pati, Jawa Tengah sebagai daerah pusat pengembalaan *A. mellifera* setiap bulan April-Juli. Pada saat itulah para peternak lebah madu dari berbagai penjuru pulau Jawa menggembalakan lebahnya. Dari setiap peternak lebah diambil 10-15 lebah pekerja tiap koloni secara acak. Lebah kemudian disimpan dalam tabung berisi etanol absolut.

Ekstraksi dan Isolasi DNA

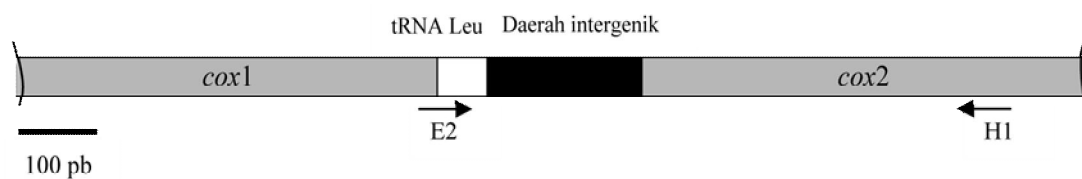
Ekstraksi DNA menggunakan metode ekstraksi CTAB dan presipitasi alkohol (Sambrook *et al.*, 1989). Sebelum ekstraksi, lebah dimasukkan ke dalam TE (10 mM Tris-HCl EDTA pH 8; 1 mM EDTA) untuk menghilangkan etanol dari jaringan. Jaringan sumber DNA adalah bagian toraks lebah. Setelah dipotong dengan skalpel steril, toraks tersebut dimasukkan dalam tabung 1,5 ml. Toraks di dalam tabung kemudian digerus hingga jaringannya hancur dengan bantuan nitrogen cair. Dua ratus µl bufer CTAB (10 ml 1M Tris-HCl pH 8; 4 ml 0,5 M NaEDTA pH 8; 8,18 gr NaCl; 2 gr CTAB; dan air hingga 100 ml) dimasukkan ke dalam tabung yang berisi hancuran jaringan toraks. Setelah itu ditambahkan proteinase K (5 mg/ml) sebanyak 14 µl

lalu diinkubasi pada suhu 55°C (2 jam). Setelah inkubasi campuran disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang berisi DNA dipindahkan ke dalam tabung baru. Setelah itu ditambahkan 500 µl PCI (fenol : kloroform : isoamilalkohol = 25 : 24 : 1), dikocok pelan lalu disentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan kemudian dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 400 µl CIAA (kloroform : isoamilalkohol = 24 : 1), dikocok lalu disentrifugasi 10.000 rpm selama 3 menit. Supernatan kemudian dipindahkan ke tabung baru, DNA yang terlarut dalam supernatan dipresipitasi dengan menggunakan 600 µl isopropanol selama semalam pada suhu -4°C. Campuran DNA dan isopropanol disentrifugasi 10.000 rpm selama 30 menit. Setelah isopropanol dibuang, 500 µl etanol 70% ditambahkan pada pelet DNA. Campuran tersebut lalu disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Etanol dibuang dan pelet

DNA dikeringkan dengan cara divakum selama 30 menit. DNA hasil ekstraksi kemudian dilarutkan dalam TE 0,5 mM dan disimpan pada suhu -4°C.

Amplifikasi DNA

DNA lebah yang telah diekstraksi kemudian diamplifikasi dengan menggunakan mesin PCR TaKaRa *Thermal Cycler*. Daerah genom mitokondria yang diamplifikasi secara *in vitro* menggunakan PCR adalah daerah intergenik antara gen *cox1/cox2* (Gambar 1). Pereaksi PCR terdiri atas dd H₂O; 2,5 µM dNTP; Mg²⁺ free buffer; 25 µM MgCl₂; 10 µM primer forward E2; 10 µM primer reverse H1 (Tabel 1); Taq polimerase; dan DNA hasil ekstraksi. Amplifikasi DNA dilakukan selama 30 siklus dengan suhu *denaturasi* (pemisahan DNA utas ganda) 94°C selama 1 menit, *annealing* (penempelan primer) 58,5°C selama 1 menit, dan *elongasi* (pemanjangan) 72°C selama 2 menit.



Gambar 1. Nama dan posisi *primer* yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah intergenik *cox1/cox2* genom mitokondria *A. mellifera*.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk untuk mengamplifikasi daerah intergenik *cox1/cox2* genom mitokondria *A. mellifera* (Cornuet *et al.*, 1991)

No	Primer	Sekuen primer (5' – 3')	Posisi DNA mitokondria pada <i>A. mellifera</i> (Crozier dan Crozier 1993)
1	E2	ggC AgA ATA AgT gCA TTg	3363-3380
2	H1	gTT CAT gAA TgA ATT ACA TCT g	4082-4103

Elektroforesis dan Visualisasi DNA

DNA hasil amplifikasi dipisahkan dengan poliakrilamid gel elektroforesis (PAGE) 6% menggunakan bufer 1 x TBE (Tris 0,5 M, asam borat 0,65 M, EDTA 0,02 M). Arus listrik yang digunakan sebesar 170 V selama 100 menit.

Visualisasi DNA dalam gel poliakrilamid dilakukan dengan pewarnaan perak (*silver staining*) menggunakan metode Tegelstrom (1986). Proses pewarnaan perak dilakukan di dalam *shaking bath*. Gel hasil elektroforesis dicuci dengan larutan CTAB (0,2 gr/200 ml aquades)

selama 8 menit. Kemudian gel dicuci dengan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit. Setelah itu gel direndam dalam larutan NH_4OH (2 ml/200 ml aquades) selama 6 menit. Selanjutnya gel direndam dalam campuran larutan 0,32 AgNO_3 ; 0,8 ml NH_4OH ; 80 μl NaOH ; dan aquades 200 ml selama 10 menit. Kemudian gel dicuci lagi menggunakan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit. Setelah itu gel direndam dalam campuran larutan 4 gr Na_2CO_3 ; 100 μl formaldehida; dan 200 ml aquades hingga muncul pita DNA. Terakhir gel direndam larutan 1% asam asetat dalam 200 ml aquades untuk pengawetan.

Pengukuran Pita DNA

Pita DNA pada gel akrilamida hasil amplifikasi dan pemotongan dengan enzim restriksi diukur menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada pita penanda DNA dan pita DNA target. Penentuan ukuran pita DNA target berdasarkan regresi menggunakan program R (*The R Development Core Team Version 1.6.0*) (Venables and Ripley, 1999).

Pemotongan dengan Enzim Restriksi

Produk PCR juga dipotong menggunakan enzim restriksi *DraI*. Enzim restriksi *DraI* merupakan enzim pemotong 6 basa. Situs pemotongannya adalah TTT/AAA. Komposisi pereaksi terdiri atas PCR produk 2 μl ; 10x bufer enzim 0.4 μl ; enzim *DraI* 0,5 μl (10 U/ μl); dan air destilata steril 1,1 μl . Campuran kemudian disentrifugasi 4.500 rpm selama 1 menit. Campuran lalu di inkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Hasil pemotongan dimigrasikan pada gel poliakrilamid 6% dengan arus 170 V selama 100 menit. Visualisasi DNA dalam gel poliakrilamid dilakukan dengan pewarnaan perak (Tegelstrom, 1986).

Pengurutan DNA

Pengurutan DNA dilakukan untuk mengetahui urutan basa pada daerah intergenik *cox1/cox2*. Hasil pemotongan dengan *DraI* yang menghasilkan frekuensi tertinggi dan yang khas akan dilakukan pengurutan DNA. Proses pengurutan hasil

amplifikasi DNA menggunakan jasa Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta. Mesin yang digunakan adalah ABI 377 A *Applied Biosystem*. Pengurutan DNA dilakukan dari ujung 5' menggunakan primer E2. Data hasil urutan DNA dimasukkan ke dalam program *Genetyx* (*Genetyx Win versi 4.0*).

Penjajaran DNA

Hasil pengurutan DNA kemudian dilakukan penjajaran menggunakan program Clustal X (Thompson, 1997) dan MEGA (Kumar, 2001). Urutan DNA *A. mellifera* yang didapatkan dibandingkan dengan urutan DNA *A. m. ligustica* (Crozier dan Crozier 1993) *Acc. Number* L06178 pada GenBank untuk kelompok garis keturunan C dan Franck *et al.* (2000b) untuk kelompok garis keturunan A, M, dan O.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengkoleksian Lebah Madu

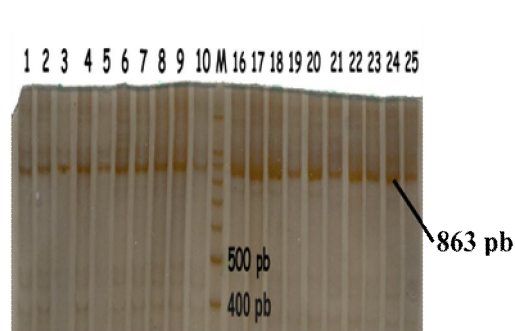
Lebah madu yang berhasil dikoleksi dari Pati, Jawa Tengah berjumlah 20 koloni dari 14 peternak lebah madu se-Jawa (Tabel 2). Dua puluh koloni lebah yang berhasil dikoleksi; dari Jawa Barat, Jawa Tengah, Yogya, dan Jawa Timur berturut-turut adalah dua, dua belas, empat, dan dua koloni.

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan tiga lebah pekerja yang diambil secara acak dari setiap koloni. DNA lebah yang telah diekstraksi kemudian diamplifikasi menggunakan primer E2 dan H1. Ukuran pita DNA hasil amplifikasi daerah intergenik *cox1/cox2* mtDNA adalah sekitar 863 pb (Gambar 2). Berdasarkan Marlina (2004) dan Syamsi (2004) hasil amplifikasi daerah intergenik antara gen *cox1/cox2* *A. mellifera* dengan menggunakan primer E2 dan H1 adalah 825 pb. Perbedaan tersebut disebabkan adanya perubahan konformasi pada pergerakan pita DNA (*gel shifting*) pada media akrilamida.

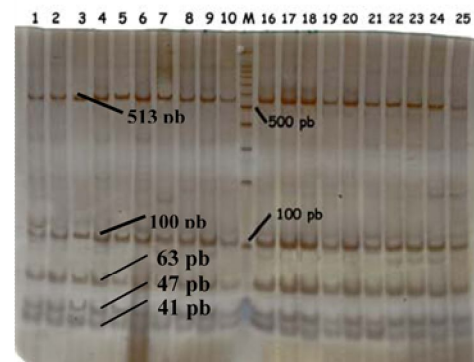
Tabel 2. Daftar nama dan alamat peternak hasil pengkoleksian *A. mellifera* di Pati, Jawa Tengah

No	Peternak	Nama Sampel	No. Koloni	Alamat
1	Pusbahnas	Am1	1	Parung Panjang, Bogor, Jawa Barat
		Am2	2	
2	Asri Puspa	Am3	3	Gringsing, Batang, Jawa Tengah
3	Muria Agung	Am4	4	Kudus, Jawa Tengah
4	Ramli	Am5	5	Sragen, Jawa Tengah
5	Rifai	Am6	6	Pati, Jawa Tengah
6	Harno	Am7	7	Tlogowungu, Pati, Jawa Tengah
7	Mashudi	Am8	8	Tlogowungu, Pati, Jawa Tengah
		Am9	9	
		Am10	10	
8	Bambang Suseno	Am16	11	Gabus, Pati, Jawa Tengah
9	KUD Batu	Am17	12	Batu, Malang, Jawa Timur
10	Harwi	Am18	13	Kudus, Jawa Tengah
11	Serangga Mas	Am19	14	Yogyakarta
		Am20	15	
		Am21	16	
		Am22	17	
12	Sudar	Am23	18	Pati, Jawa Tengah
13	Apiari Madu	Am24	19	Bangil, Pasuruan, Jawa Timur
14	Herman	Am25	20	Solo, Jawa Tengah

Gambar 2. Hasil amplifikasi daerah intergenik *cox1/cox2* *A. mellifera* menggunakan primer E2 dan H1. (1-10, 16-25 adalah no. sampel lebah. M adalah penanda DNA 100 pb)

Pemotongan DNA Hasil Amplifikasi dengan Enzim Restriksi

DNA hasil amplifikasi yang dipotong dengan enzim restriksi *DraI* menghasilkan pola pemotongan yang sama (monomorfik) (Gambar 3). Hasil restriksi *DraI* menghasilkan 5 pita DNA. Dua pita teratas berukuran 513 pb dan 100 pb. Tiga pita yang lebih kecil dari 100 pb tidak dapat ditentukan ukurannya karena penanda DNA yang digunakan paling kecil berukuran 100 pb.

Gambar 3. Hasil pemotongan daerah intergenik *cox1/cox2* *A. mellifera* dengan menggunakan enzim restriksi *DraI*. (1-10, 16-25 adalah no. sampel lebah. M adalah penanda DNA 100 pb)

Pengurutan DNA

Tiga sampel (dari tiga peternak) dipilih untuk dilakukan pengurutan DNA. Ketiga sampel tersebut diberi nama Am17, Am19, dan Am22. Proses pengurutan DNA menggunakan *primer forward* E2. Pengurutan DNA menggunakan *primer reverse* H1 juga dilakukan pada sampel Am17 dan Am22. Sampel Am17 digunakan untuk pengurutan DNA karena sampel tersebut merupakan lebah milik

peternak yang juga menjadi penyuplai ratu (*queen rearing*) bagi para peternak lain. Pemilihan Am19, dan Am22 didasarkan pada perbedaan warna lebah, Am17 berwarna kuning sedangkan Am22 berwarna kehitaman. Pemilihan berdasarkan warna ini dikarenakan kuning merupakan warna khas dari *A. m. ligustica*. Sedangkan hitam merupakan warna khas *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, dan *A. m. caucasia*. Hasil pengurutan DNA berupa kromatogram yang telah disunting secara manual kemudian dimasukkan ke dalam program *Genetyx* (*Genetyx Win versi 4.0*) untuk analisis lebih lanjut. Hasil pengurutan DNA menunjukkan bahwa daerah yang diamplifikasi pada *A.*

mellifera mempunyai persentase AT yang tinggi (Tabel 3). Hasil pengurutan DNA pada sampel Am17 menggunakan *primer forward* E2 dan *primer reverse* H1 (Gambar 4) didapatkan 630 pb yang meliputi tiga daerah; yakni tRNA_{Leu} (11 pb), daerah intergenik *cox1/cox2* (194 pb), dan *cox2* (425 pb). Hasil pengurutan DNA ini tidak diperoleh urutan DNA *primer* E2 dan H1, sehingga panjang urutan DNA yang didapatkan lebih rendah dibandingkan dengan hasil amplifikasi DNA. Selain itu, hasil pengurutan DNA yang lebih kecil dibandingkan dengan hasil amplifikasi DNA juga karena peristiwa *gel shifting* pada media akrilamid.

Tabel 3. Jumlah pasang basa serta persentase AT dan GC hasil amplifikasi daerah intergenik *cox1/cox2* *A. mellifera* menggunakan *primer* E2

Sampel	Jumlah Pasang Basa (pb)	AT (%)	GC (%)
Am17	429	89,55	10,45
Am19	309	90,13	9,87
Am22	331	89,94	10,06

```

ttttattaaaaTTTCCCCTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAATTAATAACAATTTT [ 60 ]
TAATAAAATATTTAATTAATTTTATTTTTATATTGAATTTTAAATTC AATCTTAAAGATT [ 120 ]
TAATCTTTTTTATTTAAAATTAATAAATTAATATAAAAATAAAACAAAATATAACAGAATATA [ 180 ]
TTTATTTAAAAATTTAATTTATTTAAAATTTCCACATGATTTATATTTATATTTCAAGAATCA [ 240 ]
AATTCATATTATGCTGATAAATTTAATTTTCATTTTCATAATATAGTTATAATAAATTATTATT [ 300 ]
ATAATTTCAACATTAAC TGTATATATTTATTTTAGATTTATTTATAAACAAATTC TCAAAAT [ 360 ]
TTATTTTATTTAAAAAATCATAATATTTGAAATTTATTTGAACAATTTATTTCCAATTTATTATT [ 420 ]
CTATTAATTTATTTGTTTCCATCATTTAAAAATTTTATATTTAATTTGATGAAATTTGTAAT [ 480 ]
CCTTTTTTTCAATTAATCAATTTGGTCATCAATGATATTGATCATATGAATATCCAGAA [ 540 ]
TTTAATAATATTGAATTTGATTCATATATATACTAAATTTATAATAAATTTAAACCAATTTTCGT [ 600 ]
TTACTAGAAACTGATAATCGAATAGTAATT [ 630 ]

```

Gambar 4. Hasil pengurutan DNA *A. mellifera* menggunakan primer E2 dan H1.

(Nukleotida yang dicetak dalam huruf kecil adalah bagian dari tRNA_{Leu}. Nukleotida yang digaris bawah adalah daerah intergenik *cox1/cox2*. Nukleotida yang dicetak tebal adalah bagian dari *cox2*)

Penjajaran DNA

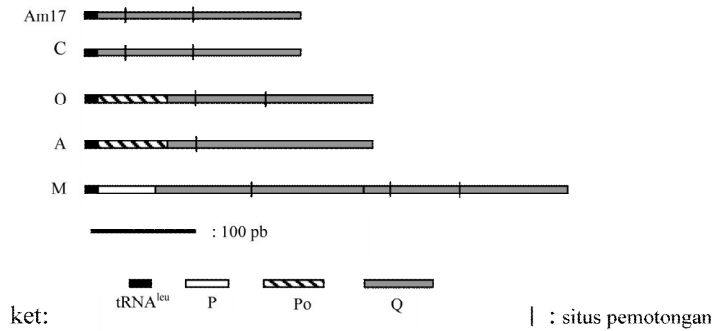
Proses penjajaran dilakukan untuk mengetahui homologi nukleotida antara ketiga sampel dengan sampel lebah dari berbagai garis keturunan yang telah diteliti sebelumnya oleh Crozier dan Crozier (1993) dan Franck *et al.* (2000b). Proses penjajaran menggunakan program Clustal X (Thompson, 1997) dan MEGA (Kumar, 2001). Hasil penjajaran menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan urutan basa antara ketiga sampel hasil penelitian ini (Am17, Am19, dan Am22) dengan lebah

A. m. ligustica dari kelompok C (Crozier dan Crozier, 1993) (Gambar 6).

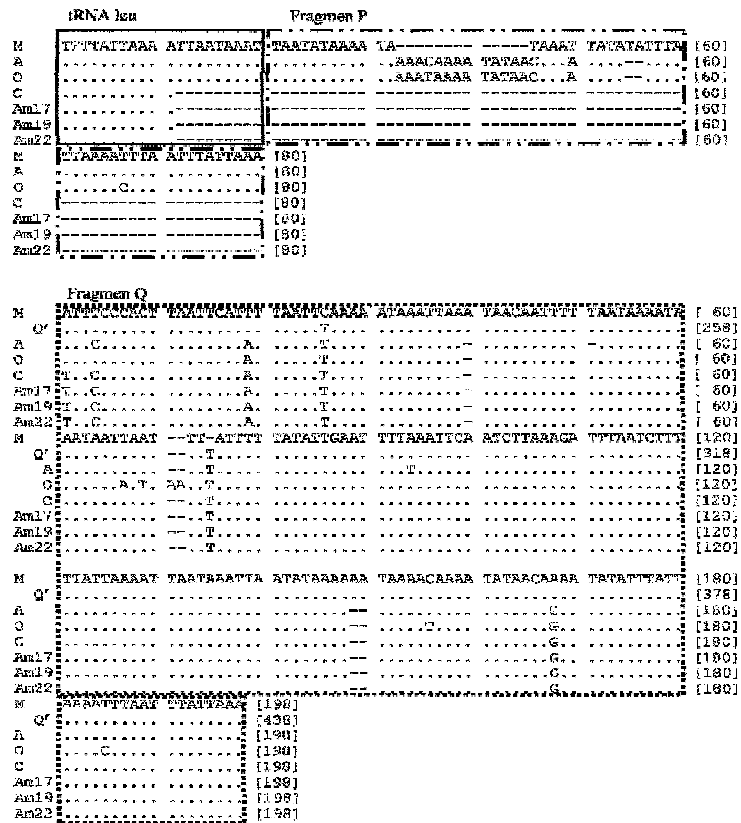
Berdasarkan hasil pengurutan dan penjajaran DNA, dibuat peta restriksi hasil pemotongan daerah intergenik *cox1/cox2* oleh enzim restriksi *DraI* (Gambar 5). Setelah dibandingkan, ternyata peta restriksi sampel pada penelitian ini juga sama dengan peta restriksi lebah *A. m. ligustica* hasil penelitian Crozier dan Crozier (1993) *Acc. Number*: L06178. Dengan diketahuinya subspecies yang diteliti adalah *A. m. ligustica*, maka *Acc.*

Number: L06178 untuk intergenik *cox1/cox2* (Crozier dan Crozier, 1993) digunakan untuk menentukan ukuran lima fragmen DNA hasil pemotongan dengan *DraI* (Gambar 3). Kelima fragmen DNA tersebut adalah 486, 102, 63, 47, dan 41 pb

(Gambar 3). Pada Gambar 3 fragmen terbesar berukuran 513 pb, sedangkan berdasarkan urutan DNA adalah 486 pb (Crozier dan Crozier, 1993). Perbedaan tersebut terjadi juga karena *gel shifting* pada media akrilamid.



Gambar 5. Peta restriksi hasil pemotongan daerah intergenik *cox1/cox2* *A. mellifera* dengan enzim restriksi *DraI* berdasarkan hasil pengurutan DNA. (Am17 adalah haplotipe yang didapatkan pada penelitian ini; C merupakan haplotipe *A. m. ligustica* yang didapatkan Crozier dan Crozier (1993) *Acc. Number*: L06178 ; O, A, dan M merupakan beberapa haplotipe yang didapatkan oleh Franck *et al.* (2000b))



Gambar 6. Penjajaran urutan DNA daerah intergenik *cox1/cox2* *A. mellifera* (M, A, dan O merupakan hasil penelitian Franck *et al.* (2000b); C merupakan *A. m. ligustica* hasil penelitian Crozier dan Crozier (1993) *Acc. Number*: L06178; Am17, Am19, dan Am22 adalah hasil penelitian ini; nukleotida dalam [] merupakan bagian dari tRNA Leusin; nukleotida dalam [] merupakan fragmen P/P₀; nukleotida dalam [] merupakan fragmen Q, Q' merupakan ulangan fragmen Q; tanda • menunjukkan kesamaan (homologi) nukleotida; tanda - menunjukkan adanya delesi nukleotida)

Pembahasan

Apis mellifera merupakan lebah madu yang paling banyak dibudidayakan untuk kepentingan komersial, terutama untuk memproduksi madu. Manusia telah membawa lebah madu ini ke daerah yang bukan habitat alaminya, seperti ke benua Amerika, Australia, dan sebagian Asia (Gojmerac, 1983). Persebarannya saat ini sudah menyebar hampir ke seluruh dunia, termasuk Indonesia.

Apis mellifera mulai dikenal di Indonesia sejak tahun 1972. Saat itu Apiari Pramuka, salah satu peternak lebah madu besar di Indonesia, mendapat bantuan dari Australia berupa 25 stup (kotak) lebah *A. mellifera* (Suwanda, 1986). Beberapa subspecies *A. mellifera*; seperti *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, dan *A. m. caucasia* mempunyai sifat-sifat yang sangat disukai oleh para peternak lebah madu. Hal tersebut membuat Apiari Pramuka maupun para peternak besar lain yang ada di Indonesia sejak tahun 1974-1985 sering melakukan impor *A. mellifera* (Sukartiko, 1986). Bahkan ada beberapa peternak besar yang melakukan impor ratu *A. mellifera* secara pribadi langsung dari berbagai negara seperti Australia, Cina, Amerika Serikat (Hawaii), Ukraina, dan Belanda (Susanto, 18 Juni 2005, komunikasi pribadi). Para peternak kecil kemudian mendapatkan lebah *A. mellifera* dari para peternak besar tersebut.

Keberadaan dan persebaran berbagai subspecies *A. mellifera* di Indonesia terutama di pulau Jawa saat ini belum diketahui secara pasti. Untuk mengidentifikasi subspecies *A. mellifera* berdasarkan ciri-ciri morfologi sangatlah sulit dilakukan, bahkan oleh seorang ahli sekalipun. Oleh karena itulah saat ini untuk menentukan subspecies *A. mellifera* digunakan analisis molekuler. Salah satu gen penanda yang sering dipakai untuk mengidentifikasi subspecies dari *A. mellifera* adalah daerah intergenik *cox1/cox2* mtDNA.

Pada penelitian ini, berdasarkan hasil pengurutan DNA daerah intergenik *cox1/cox2* mtDNA ditemukan fragmen Q pada seluruh sampel. Berdasarkan Cornuet *et al.* (1991) *A. mellifera* yang memiliki

fragmen Q pada daerah intergenik *cox1/cox2* mtDNA termasuk ke dalam kelompok garis keturunan C yang persebaran alaminya adalah di Eropa Selatan. Berdasarkan hasil peninjauan juga diketahui bahwa sampel *A. mellifera* pada penelitian ini mempunyai urutan DNA (daerah intergenik *cox1/cox2* mtDNA) yang sama dengan *A. m. ligustica* hasil penelitian Crozier dan Crozier (1993) *Acc. Number: L06178*. Sampel Am22 yang semula diduga *A. m. mellifera*, *A. m. caucasia* atau *A. m. carnica* (karena memiliki warna tubuh kehitaman) ternyata berdasarkan mtDNA daerah intergenik *cox1/cox2* adalah *A. m. ligustica*.

Hasil pemotongan DNA hasil amplifikasi dengan enzim restriksi *DraI* hanya mendapatkan satu haplotipe. Hal ini terjadi karena pada *A. mellifera* yang termasuk ke dalam kelompok garis keturunan C mempunyai sedikit variasi haplotipe. Berdasarkan Franck *et al.* (2000a) variasi haplotipe *A. mellifera* banyak ditemukan pada kelompok garis keturunan A dan M, lebih dari 50 haplotipe telah ditemukan.

Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa subspecies *A. mellifera* yang ada di Indonesia adalah *A. m. ligustica*. Keberadaan subspecies *A. mellifera* yang lain di Indonesia tampaknya sudah sangat sedikit atau mungkin sudah tidak ada sama sekali. Karena berdasarkan pengamatan dan wawancara di lapang saat pengambilan sampel diketahui banyak peternak yang langsung membunuh ratu lebah jika ratu tersebut sudah tidak produktif lagi. Ditambah lagi dengan tidak adanya peternak atau lembaga yang mengembangkan ratu lebah atau membudidayakan subspecies-subspecies *A. mellifera* yang lain di Indonesia. Berdasarkan Herman (30 September 2005, komunikasi pribadi). Sejak krisis melanda Indonesia pada tahun 1997 para peternak besar tidak mengimpor ratu lebah lagi, sejak saat itu para peternak membeli ratu lebah dari KUD Batu, Malang. Berdasarkan Bashori (21 September 2005, komunikasi pribadi) tempat beternak ratu lebah (*queen rearing*) di Indonesia saat ini hanya dilakukan oleh KUD Batu, Malang.

Subspesies *A. mellifera* yang ada disana adalah *A. m. ligustica*.

Apis mellifera yang ada di Indonesia saat ini nampaknya merupakan keturunan *A. m. ligustica* yang dahulu sering di impor dari Australia. Berdasarkan Koulianos dan Crozier (1997) di Australia lebah madu yang paling banyak di budidayakan oleh para peternak disana adalah *A. m. ligustica* (*Italian yellow bees*), *A. m. mellifera* (*English black bees*), dan *A. m. caucasia*.

Ditemukannya satu subspesies dan satu haplotipe *A. mellifera* di Indonesia menyiratkan kekhawatiran lain akan rendahnya keragaman genetik lebah madu *A. mellifera* di Indonesia. Rendahnya keragaman genetik ini diduga disebabkan karena sering terjadinya *inbreeding* diantara *A. mellifera* karena memang telah lama tidak ada sumber ratu lebah baru. Berdasarkan hasil wawancara dengan para peternak lebah madu di lapangan diketahui bahwa umumnya tiap tahun pertumbuhan koloni menjadi semakin lambat; daerah jelajah lebah pekerja yang semakin sempit, sehingga mengakibatkan produktivitas menurun; selain itu koloni juga lebih mudah terserang penyakit, yang dapat mengakibatkan kematian seluruh koloni. Menurut Moritz RFA (1983) *inbreeding* pada *A. mellifera* mengakibatkan aktivitas enzim *Malate dehydrogenase* (MDH) dan *Icitate dehydrogenase* (ICDH), yang berperan dalam siklus krebs, pada mitokondria yang ada di dalam otot terbang larva lebah dan lebah pekerja mengalami penurunan aktivitas yang signifikan. Selain itu berdasarkan hasil penelitian Mattila HR *et al.* (2007) menyebutkan bahwa kawanan lebah (genus *Apis*) yang berasal dari koloni-koloni yang memiliki keragaman genetik tinggi mengalami pertumbuhan/pecah koloni yang lebih cepat, daerah jelajah yang lebih luas, penyimpanan makanan, pertumbuhan populasi, serta tingkat *fitness* yang jauh lebih baik dibandingkan kawanan lebah yang berasal dari koloni-koloni dengan keragaman genetik yang rendah.

Rendahnya keragaman genetik *A. mellifera* di Indonesia dapat mengakibatkan lebah ini rentan terhadap penyakit serta stress. Salah satu masalah

penting yang dihadapi *A. mellifera* di dunia saat ini yang diakibatkan oleh penyakit dan stress lingkungan adalah *Colony Collapse Disorder* (CCD). CCD adalah peristiwa dimana lebah pekerja dari suatu koloni lebah madu *A. mellifera* secara tiba-tiba menghilang secara drastis (lebih dari 50%). Peristiwa CCD ini terjadi di Amerika Serikat, Kanada dan banyak Negara Eropa seperti Jerman, Italia, Polandia, Turki, dan Swiss sejak akhir 2006. Penyebab utama CCD sampai saat ini masih belum diketahui secara pasti. Runckel *et al.* (2011) menyatakan bahwa pada *A. mellifera* yang yang koloninya terserang CCD banyak ditemukan berbagai jenis tungau (*Varroa*, *Tropiaelaps*, *Acarapis*, dll), fungi/protista (*Nosema*, *Crithidia*, *Metarhizium*, dll) virus (*Dicistrovirus*, *Iflavirus*, *Ascovirus*, *Baculovirus*, dll), Bakteri (*Achromobacter*, *Paenibacillus*, *Melissococcus*, dll). Selain itu ditemukan juga empat strain virus baru dari kelompok *Dicistroviridae* dan *Nodaviridae*. Sedangkan menurut Engelsdorp VD *et al.* (2009) peristiwa CCD merupakan akumulasi dari melibatkan berbagai pathogen dan berbagai macam faktor stress. Hal-hal yang dapat menyebabkan CCD ini dapat menular antar lebah sehingga CCD adalah akumulasi dari berbagai faktor tersebut.

Keragaman genetik pada *A. mellifera* di Indonesia dapat ditingkatkan dengan cara mengintroduksi *A. mellifera* dari negara lain, terutama ratu lebahnya. Selanjutnya diharapkan terjadi perkawinan dengan *A. mellifera* yang telah ada di Indonesia. Dengan cara itu diharapkan keragaman genetik *A. mellifera* dapat meningkat sehingga *fitness* *A. mellifera* tersebut membaik, pada akhirnya produktivitas lebah tersebut juga dapat meningkat.

4. KESIMPULAN

Amplifikasi daerah intergenik *cox1/cox2* genom mitokondria *Apis mellifera* dengan menggunakan primer E2 dan H1 menghasilkan produk sebesar 863 pb. Pemotongan DNA hasil amplifikasi dengan enzim restriksi *DraI* menghasilkan

pola yang seragam (monomorfik). Hasil pengurutan dan penjajaran daerah intergenik *cox1/cox2* genom mitokondria menunjukkan bahwa lebah madu impor *A. mellifera* yang ada di Indonesia termasuk ke dalam garis keturunan C. Subspesies lebah tersebut adalah *A. m. ligustica* dengan persebaran alamnya di Italia yang diimpor ke Indonesia dari Australia.

DAFTAR PUSTAKA

- Arias MC, Sheppard C.A., 1996, Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phylogenet and Evol.* 5:557-566.
- Borror DJ, Triplehorn CA, Johnson N.F., 1982, *An Introduction to the Study of Insects*. Ohio: Saunders College Publ.
- Clarke KE, Oldroyd BP, Javier J, Quezada-Euan G, Rinderer TE., 2001, Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 10:1347-1355.
- Crozier RH & Crozier YC., 1993, The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133: 97-117.
- Cornuet JM, Garnery L, Solignac M., 1991, Putative origin and function of the intergenic region between *cox1* and *cox2* of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics* 1128: 393-403.
- Engelsdorp VD., 2009, *Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study*. PLoS ONE Vol. 4, 8.
- Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM., 2000a, Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees in the Near East. *Apidologie* 31(2):167-180.
- Frank P *et al.*, 2000b, Hybrid origin of honeybee from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Mol. Ecol.* 9: 907-921.
- Garnery L, Mosshine EH, Oldroyd BP, Cornuet JM., 1995, Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honeybee population. *Mol. Ecol.* 4: 465-471.
- Gojmerac WL., 1983, *Bees, Beekeeping, Honey and Pollination*. Connecticut: AVI Publishing.
- Kumar S, Tamura K and Nei M., 2004, MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.
- Koulianos S & Crozier RH., 1997, Mitochondrial sequence of Australian commercial and feral honeybee strains, *A. mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), in the context of species worldwide. *Aus. J. Entomol.* 36: 359-364.
- Marlina I., 2004, Karakterisasi intron 2 gen *inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (itpr)* lebah *Apis mellifera* [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Mattila HR *et al.*, 2007, *Genetic Diversity in Honey Bee Colonies Enhances Productivity and Fitness*. *Science* 317, 362
- Moritz RFA., 1983, Inbreeding Effects in Flight Muscle Mitochondria of *Apis mellifera* L. *Brazil. J. Genet.* VI, 1, 59-70.
- Özdil F, Yildiz MA, dan Hall HG., 2009, Molecular characterization of Turkish honey bee populations (*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results. *Apidologie* 40: 570-576.
- Ruttner F., 1988, *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Berlin: Springer.
- Sambrooks J, Fritsch EF, Maniatis T., 1989, *Molecular Cloning a*

Laboratory Manual. Ed ke-2. New York: Cold Spring Harbor Pr.

Sukartiko B., 1986, *Evaluasi budidaya lebah madu di Indonesia*. Prosiding Lokakarya Pembudidayaan Lebah Madu untuk Peningkatan Kesejahteraan Masyarakat; Sukabumi, 20-22 Mei 1986, Jakarta, hlm 97-111.