

Karakteristik Gen Sitokrom C Oksidase Sub Unit I (COI) Lebah Liar *Apis cerena* (Hymenoptera: apidae) Asal Pulau Hoga Sulawesi Tenggara

(CHARACTERISTICS OF GEN CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT I (COI)
WILD BEES *Apis cerena* (Hymenoptera: Apidae)
FROM THE HOGA ISLAND OF SOUTH EAST SULAWESI)

Suriana^{1*}, Jamili¹, Parakkasi²

¹ Jurusan Biologi, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo,

² Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan Ilmu Pendidikan, UHO.

Kampus Hijau Bumi Tri Darma, Anduonohu, Kendari, Sulawesi Tenggara

Telp. (0401)391929, Fax. (0401)390496,

Email: suriana0568@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik gen cytochrome oxidase subunit I (COI) dan mendeteksi situs *barcode* gen tersebut pada lebah liar *Apis cerena*. Total 15 ekor *A. cerena* ditangkap dari pulau Hoga, Sulawesi Tenggara. DNA genom diekstraksi dari toraks lebah, selanjutnya gen COI-nya diamplifikasi dengan metode PCR, kemudian disekuensing. Hasil sekuensing dikarakterisasi runutan nukleotida dan asam aminonya. Hasil penelitian adalah ujung '5' sekuen nukleotida COI lebah liar sepanjang 595 pasang basa. Sekuen tersebut bersifat kekal pada kebanyakan situs. Nukleotida didominasi oleh basa timin dan adenine ($\pm 70\%$). Terdapat 25 situs *barcode* untuk lebah liar dan 2 diantaranya unik bagi lebah liar asal pulau Hoga Sultra. Nukleotida sepanjang 595 tersebut, diprediksi mengkode 198 asam amino. Setelah disejajarkan dengan asam amino data genbank, asam amino tersebut menunjukkan variasi antar spesies sebesar 11%. Asam amino ke 91 (treonin) dan asam amino ke 103 (asparagin) merupakan asam amino penciri/diagnostik bagi *A. cerena* asal pulau Hoga Sulawesi Tenggara. Filogeni molekuler yang direkonstruksi berdasarkan runutan nukleotida maupun asam amino, menunjukkan bahwa *A. cerena* dari Pulau Hoga berkerabat dekat dengan *A. cerena* sumber Genbank.

Kata-kata kunci: Lebah Liar, *Apis cerena*, situs *barcode*, asam amino diagnostic.

ABSTRACT

The study was conducted to assess the characteristic of cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene on wild honey bee *Apis cerena*, and detection of barcode sites from these gene. A total fifteen individual *A. cerena* were collected from Hoga Island, Southeast Sulawesi. Genomic DNA was extracted from torax, then amplified by PCR method and than sequenced. Sequencing result characterized their nucleotide and amino acid content. The results showed that 595 nucleotides at the 5' end of COI gene of *A. cerena* very conserved at the most of the sites. Nucleotide dominated by thymine and adenine bases ($\pm 70\%$). There are 25 barcoding sites for *A. cerena*. There are two of these sites are diagnostics for *A. cerena* from of the Hoga Island. From of 595 basepairs nucleotide were prediction encode 198 amino acid, and only eleven percent of the these are varied between species. Amino acid 91th (treonine) and 103th (asparagin) were diagnostics amino acid for *A. cerena* from Hoga Island, Southeast Sulawesi. Molecular phylogeny reconstructed based on both nucleotide and amino acid sequence placing *apis cerena* from Hoga Island, Souteast Sulawesi is closely related to *Apis cerena* from Genbank source.

Key word: Wild honey bee, *Apis cerena*, *barcode sites* and *diagnostics amino acid*.

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini, runutan DNA mitokondria (mtDNA) menjadi pilihan untuk mempelajari taksonomi, populasi dan evolusi hewan. Beberapa aspek struktur dan evolusi menyebabkan mtDNA menjadi pilihan, antara lain: memiliki banyak *copy* dalam sel sehingga memudahkan untuk memperoleh sampel yang diinginkan, tidak mengalami rekombinasi sehingga tidak dikacaukan oleh perubahan genetik akibat rekombinasi, memiliki daerah terkonservasi antar taksa sehingga dapat dijadikan sebagai *template* untuk desain primer yang bersifat universal, sekaligus daerah yang bervariasi laju evolusinya, sehingga dapat menunjukkan perbedaan antar taksa (Bernasconi *et al.*, 2001; Caccone *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2001). Dibandingkan dengan gen kromosomal (gen inti), mtDNA memiliki laju evolusi 1-10x lebih cepat (Avisa 1987; Caccone *et al.*, 2004; Lin & Danforth 2004). Terdapat beberapa peta genome mitokondria (mtDNA) yang dapat dijadikan sebagai referensi atau perbandingan antar organisme (Liu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2010; Friedrich & Muqim 2003; Morlais & Severson 2002). Ketepatan pilihan pada sekuen yang akan dijadikan sebagai marka genetik, merupakan hal yang mendasar dalam kajian evolusioner. Karakteristik penting yang harus diperhatikan sebagai marka genetik adalah laju substitusi nukleotida/asam amino pada daerah-daerah tertentu. Gen *cytochrome C oxidase* sub unit I (COI) memiliki karakteristik khusus yang sesuai sebagai alat dalam kajian evolusioner, yaitu (1) sebagai pengkatalisis terakhir dalam rantai respirasi di mitokondria, sehingga COI banyak dikaji pada level biokimia, dan menunjukkan bahwa struktur dan ukuran gen COI terkonservasi pada semua organisme aerobik (Lunt *et al.*, 1996). (2) Runutan asam amino berkorelasi dengan fungsi masing-masing bagian COI, sehingga menunjukkan karakteristik bagi spesies yang memilikinya (Lunt 1996; Roe & Sperling 2007). (3) Dibandingkan dengan gen pengkode protein lain yang terdapat pada mtDNA, COI memiliki ukuran yang relatif besar, sehingga memudahkan untuk memilih daerah yang akan dipergunakan untuk kajian genetik, maupun fungsinya (4). Sekuen 658 *basepair* (bp) pada ujung 5' diusulkan sebagai *barcode* hewan (Heber *et al.*, 2003 a, b). *Barcode* tersebut telah berhasil dibuktikan kemampuannya sebagai pembeda antar spesies

pada Lepidoptera (Hebert *et al.*, 2003a; Hajibabaei *et al.*, 2005), gen ini juga telah dipergunakan untuk membuat *barcode* kupu-kupu *Asterapes fulgerator* (Hebert *et al.*, 2004), kumbang (Funk *et al.*, 1995), beberapa serangga hama (Toda & Murai 2007) ngengat *Hamona mermerodes* (Hulrc 2007), nyamuk (Cywinska *et al.*, 2006). Sekuen COI dipergunakan untuk mengkaji koevolusi serangga herbivore dengan tanaman inangnya (Rivera *et al.*, 2008)

Kajian mengenai lebah madu hasil domestikasi (*Apis mellifera*) telah dilakukan, baik aspek biologi, ekologi maupun aspek genetiknya (Arias, & Sheppard, 1996; Arias, & Sheppard, 2005; Ca'novas, *et al.*, 2007; Corlett, 2011; Neekhra *et al.*, 2012; Bharat *et al.*, 2012). Kajian mengenai lebah madu liar juga telah dilakukan antara lain: Peng *et al.* (1989); Damus & Otis (1997); Zhao *et al.* (2014); Rukhsana *et al.* (2014) dan lain-lain. Sejauh ini belum ada kajian mengenai aspek biologi, ekologi maupun genetic *Apis cerena* asal Sulawesi Tenggara, padahal data base suatu spesies sangat dibutuhkan demi pelestarian spesies tersebut.

Pada tulisan ini, dibahas mengenai karakteristik runutan nukleotida COI *A. cerena*, meliputi jumlah dan jenis substitusi yang ada dan menyebabkan keragaman antar spesies yang dibandingkan, komposisi nukleotida, potensi nukleotida dan asam amino penciri spesies dan menggunakan sekuen tersebut untuk merekonstruksi pohon kekerabatan antar spesies. Semua hasil penelitian dijelaskan berdasarkan latar belakang genetik yang menyertai, sehingga merupakan database molekuler pertama bagi *Apis cerena* asal Sulawesi Tenggara khususnya pulau Hoga.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif. Sampel lebah diperoleh dengan menangkap lebah di area sekitar tegakan magrove yang terdapat pada kawasan Taman Nasional wakatobi, yaitu pulau Hoga. Ekstraksi DNA dan amplifikasi gen sitokrom C oksidase sub unit I dilaksanakan di laboratorium Biologi Sub Forensif FMIPA UHO. Sedangkan sequencing gen dilaksanakan atas jasa perusahaan sekuensing DNA.

Prosedur ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan metode ekstraksi pada penelitian sebelumnya (Suriana & Nasaruddin, 2016), yang

disederhanakan seperti berikut: Sampel dada lebah di gerus kemudian dicampurkan dengan buffer lysis yang mengandung CTAB, β -mercaptoetanol, PVP. Setelah itu diinkubasi pada suhu 55°C selama 2 jam. Selanjutnya sampel disentrifugase pada kecepatan 6500 rpm selama 3 menit. Supernatan diambil kemudian ditambah volume yang sama dengan isopropanol. Supernatan diambil dan dicampur dengan etanol dingin konsentrasi 100%. Selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu -20°C, selama 30 menit, kemudian dicentrifugase dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit. Setelah itu, etanol di buang, pellet dicuci dengan etanol 70%, kemudian dikering anginkan. Pellet diresuspendi dengan TE, dan diinkubasi pada suhu 37°C, selama 15 menit.

Pengecekan hasil ekstraksi dilakukan dengan memigrasikan sampel melalui elektroforesis. Prosedur elektroforesis adalah: Gel agarose dibuat dengan buffer TBE, konsentrasi 1%. Loading buffer berupa TBE 1x, dengan volume disesuaikan untuk merendam gel agarose. Gel agarose dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi TBE 1X. Lima mikrolit sampel di loading dengan *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur agarose. Elektroforesis dihidupkan selama 30 menit. Setelah selesai, gel divisualisasi dengan menggunakan gel illumination. Sampel dengan band yang bagus/tegas selanjutnya di PCR untuk mengamplifikasi gen COI.

Untuk amplifikasi dipergunakan primer khusus untuk DNA barcode, yaitu: LepF1 'ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG' sebagai primer *forward* dan LepR1 TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA sebagai primer *reversed* (Hebert *et. al.*, 2004). Campuran reaksi PCR terdiri atas buffer PCR (PCR kit ready to mix; KAPA HiFi Hot start, KAPABIOSYSTEM) sebanyak 12,5 μ L, primer seperti yang tersebut sebelumnya, yaitu primer *forward* 10 μ M dan *reversed* 10 μ M masing-masing 0,75 μ L, DNA template 1 μ L, dan 10 μ L ddH₂O (rekomendasi KAPABIOSYSTEM). Mesin PCR, TC-PLUS Techne LTC 1038 disetting sesuai rekomendasi KAPABIOSYSTEM produsen PCR kit, dengan denaturasi awal 3 menit pada suhu 95°C, ikuti 35 siklus dari: denaturasi 15", pada 95°C. Anneling 15", pada 55°C. Ekstensi 30", pada 72°C. Diiikuti post ekstensi pada 5', pada 72°C. Hasil amplifikasi divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis. Band yang bersih dan tegas, di kirim ke perusahaan jasa

sekuensing, yaitu PT. Genetika Science Indonesia untuk proses selanjutnya.

Hasil sekuensing diblast (akses langsung dengan: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. untuk meyakinkan bahwa hasil sekuensi adalah DNA target, yaitu gen COI. Setelah itu sekuen dikarakterisasi nukleotida dan asam aminonya. Sekuen COI pembanding yang tersedia pada *Genbank*, yaitu:

1. *Apis mellifera* mitochondrion, partial genome (KT 164631.1).
2. *Apis mellifera* mitochondrion, partial genome (KT164619.1).
3. *Apis cerana* isolate CL24 mitochondrion, partial genome (KM244704.1).
4. *Apis cerana* mitochondrion, complete genome (NC_014295.1).
5. *Apis cerana* haplotype 1 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; (AF153101.1).
6. *Apis cerana* isolate 1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds (KJ755566.1).

Sebagai out group dipakai sekuen COI *Polistes* sp. BOLD:ACO0792.

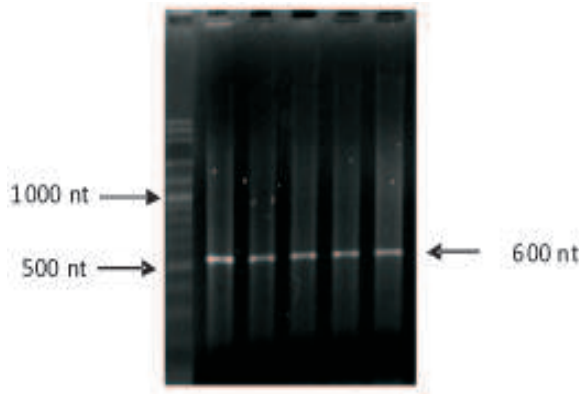
Analisis data dilakukan menggunakan *software* Bioedit dan MEGA versi 7. Sekuen pembanding (*out group*), diperoleh dari data *GenBank*. (<http://nucleotida.ncbi.nlm.nih.gov>). Data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perunutan sekuen DNA hasil amplifikasi dengan metode PCR gen COI DNA mitokondria *Apis cerana* dari populasi asal pulau Hoga Sulawesi Tenggara menghasilkan DNA sepanjang 595-602 nukleotida (nt) (Gambar 1).

Nukleotida tersebut sejajar dengan posisi nukleotida ke 138 – 740 pada sekuen gen COI lebah pembanding dari data *GenBank*. Data sekuen yang dikarakterisasi sepanjang 595 nukleotida (Gambar 1), menyandi 198 asam amino.

Hasil pensejajaran 595 nt (nukleotida) gen COI antar populasi *A. cerana* menunjukkan bahwa gen tersebut sangat *conserved* (bersifat kekal; dipertahankan) pada level spesies, tetapi menunjukkan keragaman dibandingkan dengan spesies lain, baik dari famili yang sama (Apidae), maupun dengan famili yang berbeda (Polistidae). Terdapat 75% (444/595) nukleotida yang bersifat *conserved*, dan 25% (151/595) nukleotida variabel. Nukleotida variabel, terdiri atas 18% (108/595) nukleotida *parsimony informative* dan



Gambar 1. Profil DNA COI *A. cerena* hasil amplifikasi dengan primer RCO1 dan FCOI. Marker 100 nt (1), contoh sampel yang teramplifikasi (2 s/d 6).

7% (43/595) nukleotida *singleton*. Nukleotida parsimoni informatif terdiri atas 80.6% (87/108) terdapat pada kodon ketiga, dan sisanya yaitu 19.4% (21/108) terdapat pada kodon pertama.

Komposisi masing-masing basa N antar spesies yang dibandingkan terdiri atas 38% - 40.7% timin (T), 27.6% - 30.6% adenin (A), 15.8% - 18.5% sitosin (C), dan 13.3% - 14.6% guanin (G). Dominasi basa T dan A pada masing-masing spesies terutama terdapat pada kodon ke tiga. Komposisi nukleotida pada COI *A. cerena* relatif konsisten dengan komposisi nukleotida yang ditemukan pada sekuen COI serangga lainnya, khususnya Hymenoptera. Kecenderungan dominasi basa timin dan adenin disebabkan oleh penggunaan basa tersebut sebagai kodon triplet. Penggunaan kodon triplet berhubungan

dengan ketersediaan tRNA yang bersesuaian dan juga laju ekspresi gen. Selain itu komposisi nukleotida berhubungan dengan laju substitusi. Substitusi transisi lebih besar dibanding dengan substitusi transversi. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini, dan seperti yang ditemukan oleh Toda & Murai (2008), substitusi A!G, lebih besar dari pada C!T, mutasi sinonim > mutasi non sinonim. Oleh karena adanya substitusi maka ditemukan 25 situs diagnostik pada nukleotida COI yang dapat diperukan sebagai penciri bagi *A. cerena*.

Terdapat 25 situs nukleotida COI *A. cerena* yang berbeda dengan spesies lain dan bersifat diagnostic, sehingga beberapa diantaranya dapat dipergunakan sebagai penciri bagi spesies tersebut. Jumlah nukleotida berbeda disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Matriks perbedaan nukleotida COI (595 nt) antara *A. cerena* dengan COI dari data *GenBank*

	1	2	3	4	5	6	7
[1]							
[2]	74						
[3]	79	39					
[4]	73	47	56				
[5]	82	55	46	55			
[6]	72	55	38	46	54		
[7]	69	15	37	44	53	14	

1: *A. cerena* (Sultra), 2 s/d 4: *A. cerena* (GenBank), 5 dan 6: *A. mellifera* (Genbank), 7: *Polistes* sp

Tabel 2. Situs diagnosti antar spesies berdasarkan 595 nukleotida gen COI

Spesies	situs nukleotida ke				
	1111	12222	23333	33333	44555
	30177	92356	92356	77789	48234
<i>A. cerena</i> (Sultra)	GCTAG	TTGCT	CCCCC	CCTCA	TCTCC
<i>A. cerena</i> (Genbank)	TAATA	AAAAA	TTAAT	TTAAT	AAATA
<i>A. cerena</i> (Genbank)	TGATA	AAAAA	TTAAT	TTAAT	AAATT
<i>A. cerena</i> (Genbank)	TAATA	AAATA	TTGAT	TTAAT	AAATA
<i>A. mellifera</i> (Genbank)	TAATA	AAAAA	TTAAT	TTAAT	AAATT
<i>A. mellifera</i> (Genbank)	TGATA	AAAAA	TTAAT	TTAAT	AAATA
<i>Polistes</i> sp	ATACA	AAATA	TAAAT	TTAAC	AAATA

Ket: G: guanine, A: adenin, C: sitosin, T: timin.

Dengan kisaran perbedaan nukleotida antar spesies yaitu 14-84, terdapat 25 situs diagnostik untuk spesies *A. cerena* (Tabel 2).

Terdapat perbedaan kecil jarak genetik antar spesies yang dibandingkan berdasarkan metode Neighbor-Joining, model *p-distance* dan *Kimura 2-parameter*. Meskipun demikian, ada konsistensi dalam hal besarnya jarak yang dihasilkan (Tabel 3).

Berdasarkan jarak genetik pada Tabel 3, maka topologi filogeni antar spesies baik

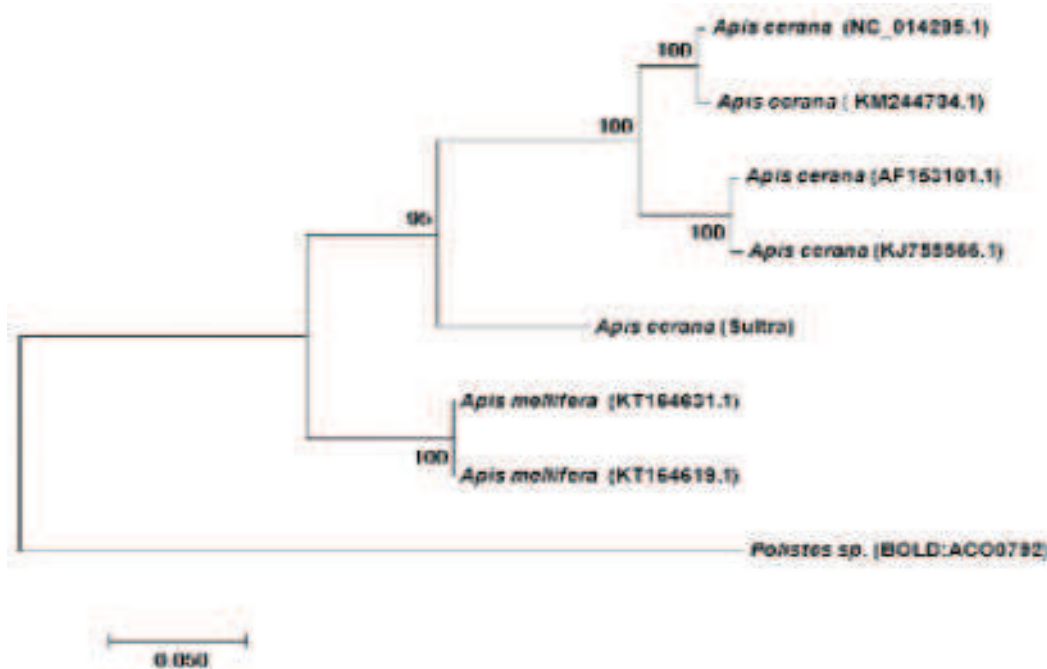
menggunakan model *p-distance* maupun menggunakan model *Kimura 2-parameter*, adalah sama (konsisten) sehingga hanya satu filogeni yang ditampilkan (Gambar 2).

Pada Gambar 2, nampak bahwa *A.cerena* berada pada satu nodus dengan *A. cerena* (*GenBank*) dengan nilai *bootstrap* 95%. Di luar nodus ini, terdapat nodus yang ditempati oleh kelompok Apidae lainnya, yaitu *A. mellifera* dari data *Genbank* dengan nilai *bootstrap* 100%. Pada nodus terluar, terdapat *Polistes* sp. sebagai

Tabel 3. Jarak genetik antara *A. cerena* dengan spesies dari data *Genbank*, berdasarkan runutan 595 nukleotida COI dengan model *p-distance* di bawah diagonal dan *Kimura 2-parameter* di atas diagonal

	1	2	3	4	5	6	7
[1]	-	0.14	0.15	0.13	0.15	0.13	0.13
[2]	0.12	-	0.07	0.08	0.10	0.01	0.03
[3]	0.13	0.07	-	0.10	0.08	0.07	0.07
[4]	0.12	0.08	0.09	-	0.10	0.08	0.08
[5]	0.14	0.09	0.08	0.09	-	0.10	0.10
[6]	0.12	0.01	0.06	0.08	0.09	-	0.02
[7]	0.12	0.03	0.06	0.07	0.09	0.02	-

1: *A. cerena* (Sultra), 2 s/d 4:*A.cerena* (*GenBank*), 5 dan 6: *A. mellifera* (*Genbank*), 7.*Polistes* s



Gambar 2. Filogeni berdasarkan runutan 595 nukleotida COI dengan metode *Neighbor-Joining*, *bootstrapped* 1000x, model *Kimura 2-Parameter*.

outgroup. Hal ini berarti bahwa diantara sesama Apidae, maka *A.cerena* memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan *A.cerena* dari data *Genbak*. Didukung oleh nilai bootstrap >50%, maka filogeni tersebut bersifat *robust*. Filogeni tersebut juga nyata menunjukkan bahwa *Apis* menunjukkan filogeni yang bersifat monofiletik (satu nenek moyang, yang kemudian berkembang menjadi berbeda; *A. cerena* dan *A. mellifera*).

Penelitian ini berhasil mengkarakterisasi runutan nukleotida pada ujung 5' gen COI *A. cerena* sepanjang 595 nukleotida (nt). Nukleotida didominasi oleh basa adenine dan timin, dan bersifat *conserve* pada *A. cerena*. Meskipun demikian, dibandingkan dengan spesies lain, dari sesama famili Apidae dan famili lain (Polistidae) nukleotida tersebut cukup beragam. Hal ini sejalan banyak penelitian yang dilakukan pada serangga, baik pada level genus, famili maupun ordo. Keragaman nukleotida intra spesies berdasarkan gen COI rendah (<1%) juga ditemukan oleh Li *et al.* (2009); Wagener *et al.* (2006); Cywinska *et al.* (2006). Meskipun demikian, pada level genus, COI berhasil memisahkan kumbang genus *Ophraella* dengan sekuen DNA COI sepanjang 446 nt dan menunjukkan keragaman antar spesies sebesar 24% (Funk *et al.*, 1995), kumbang genus *Mesochthistatus* (Nakamine & Takeda 2007), serangga hama tembakau *Thrips tabaci* sebesar 4,8% (Toda & Murai 2007), dan nyamuk (Culicidae) 0.2-17.2% Cywinska *et al.* (2006). Pada level famili Mahendran *et al.* (2006), menyatakan bahwa COI menghasilkan topologi filogeni yang *robust* dibandingkan sekuen rRNA. COI memisahkan dengan tegas famili Saturniidae dengan famili Bombycidae. Pada nyamuk, COI memisahkan 3 sub famili yaitu Anophelinae, Culicinae and Toxorhynchitinae sebesar 17.2 – 26.3% (Cywinska *et al.*, 2006). Bahkan COI dipergunakan untuk memisahkan hewan pada level yang lebih tinggi antara lain Lepidoptera (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Rendahnya keragaman pada COI intra populasi *A.cerena* disebabkan oleh karena mekanisme reproduksi, sinkronisasi waktu kawin, pola sebaran dan pemilihan relung. Induk betina meletakkan telur hanya sekali pada tempat yang sama, dengan demikian peluang bagi generasinya untuk bercampur dengan generasi dari kelompok telur yang lainnya kecil, sehingga tidak ada aliran genetik. Populasi yang berkembang ketika itu hanyalah turunan dari

pasangan imago yang berada pada habitat-relung tersebut. Demikian juga sinkronisasi waktu kawin, pada *A. cerena* tidak selalu bersamaan, sehingga mengurangi kesempatan perkawinan antar imago dari populasi lainnya. Hal demikian juga ditemukan pada populasi mayfly *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera: Baetidae), from the Rocky Mountains, Colorado (Hughes *et al.*, 2003).

Nukleotida COI sepanjang 595 nt, ditranslasi menjadi 198 asam amino. Asam amino tersebut sejajar dengan posisi ke 47 dari asam amino *A. cerena* (complete mitochondria, data *Genbank*) sebagai acuan. Asam amino COI *A. cerena*, terkonservasi pada level spesies. Komposisi asam amino didominasi oleh leusin dan isoleusin (> 25%), sedangkan asam amino lainnya terdapat dalam jumlah yang lebih kecil.

Berbeda halnya dengan nukleotida, hasil pensejajaran asam amino COI *A. cerena* dengan asam amino data *GenBank*, menunjukkan keragaman yang kecil, yaitu hanya 1%. Terdapat 176/198 (88.8%) asam amino yang *conserved*, sisanya yaitu 22/198 (11.1%) asam amino variabel. Situs asam amino berbeda pada spesies yang dibandingkan, disajikan pada Tabel 3, dan jumlah perbedaan asam amino serta jarak genetik antar spesies disajikan pada Tabel 4.

Berdasarkan Tabel 4, maka asam amino yang unik (khas) pada masing-masing spesies adalah: F (asam amino ke 53) dan P (asam amino ke 179) untuk *A.cerena* (NC 014295.1), A (asam amino ke 144), unik bagi *A.cerena* (AF153101.1.), T (asam amino ke 144), unik bagi *A.cerena* (KJ755566.1), S (asam amino ke 70), unik bagi 2 haplotip *A. mellifera*, tetap berbeda pada asam amino ke 157, N (asam amino ke 127), unik bagi *A.cerena* (KM244704.1), T (asam amino ke 91) dan N (asam amino ke 103), unik bagi *A.cerena* asal Sultra. Data tersebut menunjukkan bahwa meskipun banyak nukleotida telah mengalami perubahan, tetapi pada dasarnya asam amino bagi spesies hampir hanya berbeda sedikit. Hal ini disebabkan oleh karena adanya sifat degeneratif kode genetik, yaitu beberapa asam amino dapat dikodekan oleh lebih dari satu kodon, sehingga perubahan basa N ke 3 tidak adakan merubah asam amino yang dikodekan. Fenomena lebih sering disebut sebagai mutasi tidak berarti.

Berdasarkan jarak genetik tersebut pada Tabel 5, filogeni antar spesies berdasarkan runutan asam amino disajikan pada Gambar 3.

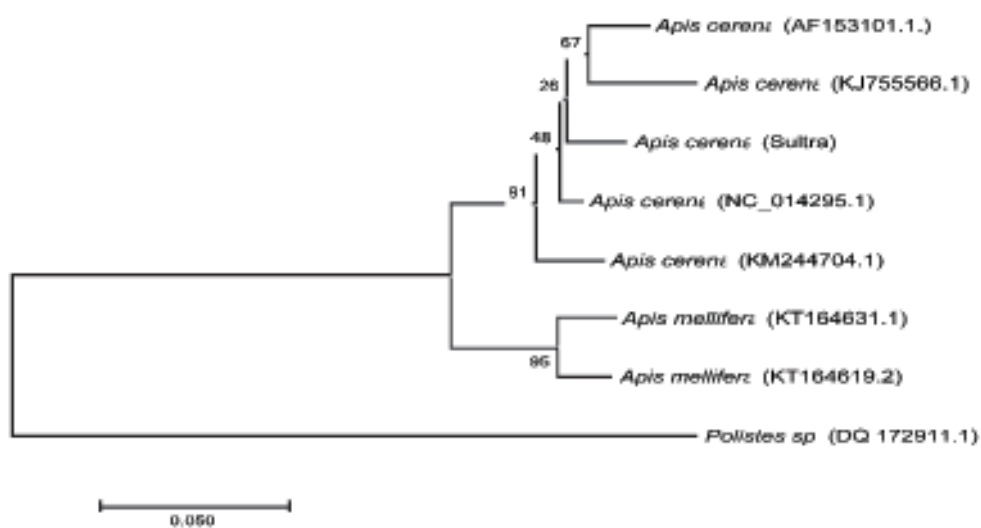
Tabel 4. Situs asam amino berbeda pada gen COI *A. cerena* dan asam amino data *GenBank*

Spesies	Situs asam amino						
	55	6667	8999	1111	11111	111	
	↓	13	0180	8145	3421	70427	469
<i>A. cerena</i> (NC_014295.1)	IF	LFLY	YSND	MSSM	LFIVI	RFP	
<i>A. cerena</i> (AF153101.1.)	.GV.	...N	.AA..	..N	
<i>A. cerena</i> (KJ755566.1)VN	...N	..TA.	Q..	
<i>A. mellifera</i> (KT164631.1)	V.	TLGS	A.V.	D.A.	M.G.N	...	
<i>A. mellifera</i> (KT164619.1)	V.	TLGS	A.V.	D.A.	M.G..	.L.	
<i>A. cerena</i> (KM244704.1)	N....	.L.	
<i>A. cerena</i> (Sultra)T..	N...	
<i>Polistes sp.</i> (DQ_172911.1)	M.	.MLD	G.V.	IAAN	H.LL..	.L.	

F: Fenilalanin, P: prolin, V:valin, T:treonin, G:glisin, S:serin, N:asparagin, Q:glutamine, A: alanin, M:metionin, L:leusin, D:asamaspartat, Y:tirosin, I: isoleusin. Huruf yang dicetak tebal: asam amino khas/diagnostik.

Tabel 5 Jumlah asam amino COI berbeda antar spesies (di bawah diagonal) dan jarak genetik berdasarkan model *p-distance* (di atas diagonal)

	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Apis cerena</i> (NC_014295.1)		0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
2. <i>Apis cerena</i> (AF153101.1.)	0.03		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
3. <i>Apis cerena</i> (KJ755566.1)	0.04	0.04		0.02	0.02	0.02	0.02
4. <i>Apis mellifera</i> (KT164631.1)	0.07	0.09	0.08		0.01	0.02	0.02
5. <i>Apis mellifera</i> (KT164619.2)	0.07	0.09	0.09	0.02		0.02	0.02
6. <i>Apis cerena</i> (KM244704.1)	0.02	0.05	0.05	0.08	0.06		0.02
7. <i>Apis cerena</i> (Sultra)	0.02	0.04	0.04	0.07	0.07	0.04	



Gambar 3. Filogeni berdasarkan runutan 198 runutan asam amino COI dengan metode *Neighbor-Joining*, bootstrapped 1000x, model *p-distance*.

Keberadaan asam amino COI pada mitokondria berhubungan erat dengan 2 fungsi, yaitu sebagai bagian struktural membran dalam mitokondria (protein trans membrane), dan akseptor (penerima) elektron terakhir dalam rantai respirasi sel. Sebagai bagian struktural, COI berupa polipeptida yang berlipat beberapa kali menembus dwilapis lipid membran. Lunt *et al.* (1998) telah mengeksplorasi gen COI dalam hubungannya dengan pola evolusi dan primer konserve untuk kajian filogeni. Ternyata berdasarkan strukturnya, laju evolusi pada setiap bagian dari asam amino bervariasi. Hal ini berhubungan dengan fungsi bagian-bagian tersebut. Olehnya itu, maka penggunaan segmen DNA COI untuk tujuan yang sama, sangat bergantung pada fragmen yang dipergunakan. Untuk barcoding hewan, (Hebert *et al.* 2003a,b) mengusulkan penggunaan 648 bp pada ujung 5' sekuen COI.

Penelitian ini menunjukkan bahwa filogeni berdasarkan runutan nukleotida maupun asam amino COI menempatkan Apidae sebagai family *monophyletic*. Berbeda halnya jika filogeni dibangun berdasarkan runutan nukleotida (Gambar 2); pada Gambar 3, dimana filogeni disusun berdasarkan runutan asam amino, menempatkan *A. cerena* tetap dekat dengan *A. cerana* lainnya, setelah nodus terdalam yang ditempati oleh *A. cerena* AF 153110.1 dan KJ755566.1, dan pada nodus di luarnya ditempati oleh *A. cerena* NC 014296.1. Setelah itu, nodus bagi *A. mellifera*. Hal ini disebabkan oleh karena meskipun nukleotida cukup beragam antar spesies Apidae, tetapi tidak demikian dengan asam aminonya (Tabel 3 dan 4). Penggunaan *outgroup* yang berbeda jauh ketika membangun filogeni terkadang menimbulkan perbedaan topologi pohon kekerabatan (Funk *et al.*, 1995), tetapi hal tersebut tidak terjadi pada *A. cerena*.

Data molekuler dapat dipergunakan untuk melengkapi data morfologi, anatomi maupun perilaku dalam kajian taksonomi hewan. Data yang diperoleh pada penelitian ini merupakan data awal bagi *Apis cerena* khususnya yang berasal dari Sulawesi Tenggara. Oleh karena itu diharapkan data ini dapat bermanfaat sebagai sumber informasi yang berguna untuk penelitian serupa di masa datang.

SIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengkarakterisasi 595 nukleotida pada ujung 5' gen COI *Apis cerena*. Dari nukleotida tersebut ditemukan 25 situs diagnostik yang merupakan penciri bagi spesies *A. cerena*. Nukleotida yang diperoleh menyandi 198 asam amino. Dari jumlah tersebut, diperoleh dua asam amino penciri bagi spesies *A. cerena*, yaitu asam amino ke 91 (treonin) dan asam amino ke 103 (Asparagin). Berdasarkan runutan nukleotida dan asam amino, filogeni menunjukkan bahwa famili Apidae bersifat *monophyletic*.

DAFTAR PUSTAKA

- Arias, M. C., and W. S. Sheppard. 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5:557–566.
- Arias, M. C., and W. S. Sheppard. 2005. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 37:25–35.
- Avisa 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol Ecol* 7: 371- 379.
- Bernasconi MV, Pawlowski J, Valsangiacomo C, Piffaretti JC, Ward PI. 2001. Phylogeny of the genus *Scathophaga* (Diptera: Scathophagidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Can J Zool* 79: 517-524.
- Bharat N, Pandey D, Mishra m, Jain SK. 2012. Molecular Approach in Honey bee: A Review. *Int J Pharm Bio Sci* 3(3): 261 – 271.
- Caccone, A, Gentile, G, Burn CE, Sezzi, E, Bergman, W, Ruelle, M, Saltonstall, K., and Powell, Jr. 2004. Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galapagos tortoises. *Mol Phylogenet Evol* 31:794-798.
- Ca'novas, F, Ru PD, Serrano J, and Galia'n J. 2007. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *J Zool Syst Evol Res* 46:24–30.

- Corlett, R. T. 2011. *Honeybees in natural ecosystems*. in H. R. Hepburn and S. E. Radloff, eds. *Honeybees of Asia*. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 215–225.
- Cywinska AC, Hunter FF, Hebert PDN. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes *Medical and Vet Entomology* 20: 413–424.
- Damus MS, Otis GW. 1997. A morphological analysis of *A.cerana* F. and *A. nigrocincta* Smith populations from Southeast Asia. *Apidologie* 28:309-319.
- Fredict M, Muqim N. 2003. Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Mol Phylogenet and Evol* 56: 502-512.
- Funk DJ, Futuyma DJ, Orti G, Meyer A. 1995. Mitochondrial DNA sequence and multiple data sets: A phylogenetic study of phytophagous beetles (Chrysomelidae: Ophraella). *Mol Biol Evol* 12: 627-640.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. 2005. DNA Barcodes Distinguish Species of Tropical Lepidoptera. *PNAS* 103:968-971.
- Hajibabaei M G, Singer AC, Clare EL and Hebert PDN. 2007. Design and Applicability of DNA Arrays and DNA Barcodes in Biodiversity Bionitoring *BMC Biology* 5:24.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, and deWaard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes *Proc R Soc Lond B* 270:31-321.
- Hebert PDN, Ratnashingham S, deWaard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B* 02PB0653:1-9.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Jansen DH, and Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101(41): 14812–14817
- Hughes JM, Mather PB, Hillyer JM, Cleary C, Peckarsky B. 2003. Genetic structure in a montane mayfly *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera: Baetidae), from the Rocky Mountains, Colorado *Freshwater Biology* 48: 2149–2162.
- Hulcr J, Miller SC, Darrow GPSK, Muller DN, Hebert PDN, Weiblen GD. 2007. DNA barcoding confirms polyphagy in a generalist moth, *Hontona mermerodes* (Lepidoptera: Tortricidae). *Mol Ecol Notes* 7:549-557.
- Kim SR, Kim ML, Hong MY, Kim KY, Kang PD, Hwang JS, Han YS, Jin BY, Kim I. 2009. The complete mitogene sequence of the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae). *Molecular Biology Reproduction* 36: 1971-1880.
- Liao F, Wang L, Wu S, Li YP, Zhao L, Huang GM, Niu CJ, Liu YQ, Li MG. 2010. The complete mitochondrial genome of the fall webworm, *Hypanthria cunea* (Lepidoptera: Articiidae). *Int. J. of Biol. Science* 6: 172-186.
- Li AL, Zhao Q. Shunmingtang. Hang Z. 2009. Molecular phylogeny of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on the sequences of mitochondrial *cytochrome b* genes. *J Genet* 84:137-142.
- Lin CP, Danforth BN 2004. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 686–702.
- Liu1 Y, L Y, Pan M, Dai F, Zhu X, Lu C, and Xiang Z. 2008. The complete mitochondrial genome of the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). *Acta Biochim Biophys* 40:693-703.
- Lunt DH. Zhang DS, Zhimura DM, Dewit GM. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary pattern and conserve primer for phylogenetics studies. *Insect Molecular Biology* 5: 153-163.
- Mahendran B, Padhi BK, Sudip K, Ghosh, Kundu, SC.2006. Genetic Variation in Ecoraces of Tropical Tasar Silkworm, *Antheraea mylitta* Using RFLF Technique. *Current Science* 90:100-103.
- Morlais I, Severson DW. 2002. Complete Mitochondrial DNA Sequence and Amino Acid Analysis of the Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. *DNA Sequence* 13: 123–127.
- Nakamine H, Takeda M. 2007. Molecular phylogenetic relationships of flightless beetles belonging to the genus

- Mesechthistatus* Breuning, (Coleoptera: Cerambycidae) inferred from mitochondrial COI gene sequences. *J. of Insect Science* 8:70-81.
- Neekhara B, Pandey D, Mishra M, Jain SK. 2012. Molecular marker approach in honey bee: A Review. *International Journal of Pharma and Bio Science* 3:261-271.
- Peng YS, Nasr ME, Loske SJ. Geographical races of *A.cerana* Fabricius in China and their distribution. Review of recent Chinese publications and a preliminary statistical analysis. *Apidologie* 1989; 20:9-12.
- Rivera JAJ, Vogler AP, Reid CAM, Petitpierre M, Zurita J. 2009. DNA barcoding insect-host plant associations. *Proc R Soc B* 276: 639-648.
- Roe AD, Sperling FAH 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome C oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding Molecular *Phylogenetics and Evolution* 44: 325–345.
- Rukhsana K, Akhilesh VP, and Sebastian CD. 2014. Deciphering the molecular phylogenetics of the Asian honey bee, *Apis cerana* and inferring the phylogeographical relationships using DNA barcoding. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2014; 2 (4): 218-220.
- Suriana, Nasaruddin. 2016. Karakteristik Partial Gen Sitokrom-C Oksidase Subunit I Katak Pohon Suaka Marga Satwa Tanjung Peropa, Moramo Sulawesi tenggara. *Jurnal Veteriner* 17 (4):517-523.
- Toda S, Murai T. 2007. Phylogenetic analysis based on mitochondrial COI gene sequences in *Thripstabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in relation to reproductive forms and geographic distribution *Appl. Entomol. Zool.* 42: 309–316.
- Weagner B, Reineke A, Lohr B, Zebit PW. 2006. Phylogenetic study of *Diadegma* species (Hymenoptera: Ichneumonidae) inferred from analysis of mitochondrial and nuclear DNA sequence. *Biological Control* 37: 131–140.
- Zhao W, Tan K, Zhou D, Wang M, Cheng C, Yu Z. and Miao. 2014. Phylogeographic analysis of *Apis cerana* populations on Hainan Island and southern mainland China, based on mitochondrial DNA sequences. *Apidologie* 45:21–33.