

Analisis Keragaman Komunitas Bakteri pada Lambung Madu Lebah *Apis mellifera*, *Apis cerana*, dan *Tetragonula laeviceps*

Analysis of Communities Bacterial Diversity on Bees Honey Stomach from *Apis mellifera*, *Apis cerana*, and *Tetragonula laeviceps*

FITRI ROSADELA, IMAN RUSMANA*, RIKA RAFFIUDIN, NURJANAH

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 31 Januari 2025/Diterima dalam Bentuk Revisi 25 Maret 2025/Disetujui 15 April 2025

Bees are one of the pollinators that a honey producing agent as well. Honey derives from nectar that stored and procees in honey stomach. The quality of honey is determined by physical, chemical and microbes in the honey stomach as well. This study was aimed to analyze the diversity of bacterial communities (bacterial metagenome) derived from bee's honey stomach of *A. mellifera*, *A. cerana*, and *T. laeviceps* using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) method. Previous researches of bacterial communities are more focused on the entire digestive tract, which is not specifically in honey stomach of the bees. The diversity of bacterial communities showed differences among three bee's species. The number one of *A. cerana* has the highest number of Operational Taxonomic Units (OTUs), i.e., 15 OTUs compared to the other sample. While the *T. laeviceps* number two show the highest percentage of OTU dominant at 59.4%. The bacterial community in bees honey stomach of *A. mellifera*, *A. cerana*, *T. laeviceps* the similarity of bacteria from phylum Firmicutes, Proteobacteria, Acidobacteria and Fusobacteria. Actinobacteria and Bacteroidetes phyla are found only in *A. cerana* honey stomach.

Key words: 16S rRNA, Bacterial community, DGGE, honey stomach, metagenome

PENDAHULUAN

Lebah merupakan salah satu polinator tanaman sekaligus agen penghasil madu yang memiliki banyak manfaat. Jenis lebah madu yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat adalah jenis *Apis mellifera* dan *A. cerana*. *A. mellifera* memiliki ukuran yang lebih besar jika dibandingkan dengan *A. cerana* (Ruttner 1988). Dibandingkan dengan *Apis*, diversitas stingless bees sangat tinggi hingga mencapai 46 spesies dan berbeda secara biologis (Kahono *et al.* 2018). *Tetragonula laeviceps* tergolong dalam kelompok stingless bees (lebah tanpa sengat) yang penyebarannya banyak di daerah Asia tropis. Komposisi madu *stingless bees* berbeda dari madu kelompok *Apis*. Madu dari lebah *stingless bees* biasanya tidak terasa manis (Bijlsma *et al.* 2006), tetapi memiliki rasa yang asam (Cortopassi-Laurino dan Gelli 1991).

Madu merupakan salah satu pemanis alami yang dihasilkan oleh lebah. Proses pembuatan madu pada lebah di sarangnya adalah kunci utama dari madu yang dihasilkan (Wen *et al.* 2017). Madu tersebut berasal

dari nektar yang disimpan dan diproses di dalam lambung madu lebah (Corby-Harris *et al.* 2014). Kualitas madu yang dihasilkan oleh lebah-lebah tersebut tidak hanya dipengaruhi oleh faktor fisik dan kimia, tetapi dipengaruhi pula oleh mikroba (Wen *et al.* 2017). Salah satu bakteri yang sebelumnya telah ditemukan pada lambung madu lebah *A. mellifera*, *A. cerana* dan *T. laeviceps* adalah bakteri asam laktat (BAL). BAL yang berhasil ditemukan adalah genus *Lactiplantibacillus plantarum* dan *Pediococcus acidilactici* (Fatma *et al.* 2022). Bakteri-bakteri tersebut umumnya dimanfaatkan sebagai probiotik untuk kesehatan manusia melalui metabolisme di lambung dan usus (Asnita dan Meryandini 2023). BAL diketahui memiliki peran dalam produksi madu dan juga menjadi alat pertahanan lebah dari bakteri-bakteri patogen yang dapat mengancam kesehatan lebah (Olofsson *et al.* 2016). Penelitian mengenai bakteri pada lambung madu lebah masih belum banyak dilakukan, termasuk di Indonesia. Hal tersebut menyebabkan belum banyaknya diketahui perbedaan bakteri-bakteri yang ada antar lambung madu lebah. Pengetahuan dari komposisi dan kelimpaa spesies mikroba selama pembuatan madu oleh lebah dapat menyediakan pengetahuan yang tepat dalam

*Penulis Korespondensi:
E-mail: irusmana@apps.ipb.ac.id

proses dihasilkannya madu pada lebah tersebut (Wen *et al.* 2017). Oleh karena itu, diperlukan data DNA bakteri secara keseluruhan (metagenomik) yang terdapat pada lambung madu lebah untuk kemudian dapat dianalisis pengaruhnya pada madu yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman komunitas bakteri dari lambung lebah *Apis mellifera*, *A. cerana*, *Tetragonula laeviceps*. Hasil penelitian diharapkan dapat dilanjutkan untuk mengetahui fisiologi dan fungsinya di dalam saluran pencernaan lebah.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Sampel lebah yang digunakan yaitu *A. mellifera* sebanyak 1 lambung madu (AM1) dan 3 lambung madu (AM2), *A. cerana* sebanyak 5 lambung madu (AC1) dan 1 lambung madu (AC2), *T. laeviceps* sebanyak 10 lambung madu (TL1) dan 8 lambung madu (TL2). Lebah *A. mellifera* koleksi Drs Kuntadi, M Agr yang berasal dari Puslitbang Hutan Bogor. *A. cerana* dari Pusbahnas, Parung Panjang, Bogor dan lebah *stingless bees T. laeviceps* dari Lebak Banten koleksi Dr Ir Rika Raffiudin, M.Si masing-masing di Kebun Leuwikopo Fakultas Pertanian IPB, Dramaga, Bogor dan di *Animal House* Departemen Biologi IPB, Dramaga, Bogor.

Analisis Sampel. Komunitas bakteri dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan metode *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE). Metode ini diawali dengan isolasi asam nukleat sampel (Rosello-Mora *et al.* 1999), yang kemudian digunakan sebagai sampel untuk analisis DGGE (Muyzer *et al.* 1993).

Koleksi Sampel dan Perlakuannya. Lebah yang telah diawetkan dengan etanol 70% setelah dikoleksi dibedah pada bagian abdomennya. Lebah diambil seluruh saluran pencernaannya dan dipotong pada bagian lambung madunya.

Isolasi DNA Bakteri di dalam Lambung Madu. Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan tiga spesies lebah yang dibedakan berdasarkan jumlah lambung madu yang digunakan ketika isolasi DNA. Lambung madu yang digunakan untuk setiap spesies lebah saat isolasi adalah 1 dan 3 lambung madu untuk *A. mellifera* (AM1 dan AM2), 5 dan 1 lambung madu untuk *Apis cerana* (AC1 dan AC2), 10 dan 8 lambung madu untuk *T. laeviceps* (TL1 dan TL2). Enam tube lambung madu lebah kemudian ditempatkan di *PowerBead Tube* yang merupakan perangkat dari DNA kit yang digunakan. Isolasi DNA kemudian dilakukan dengan menggunakan *DNAeasy PowerSoil Kit*.

Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). PCR untuk DGGE dilakukan menggunakan primer

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA (Muyzer *et al.* 1993)

Primer	Sekuen
P338F	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'
P518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'
<i>GCclamp</i> +P338F	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GGG CGG GGG CAC GGG GGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'

(Tabel 1) dengan *GC clamp* (338F-*GC*) dan 518R. Kondisi PCR yang dilakukan sebagai berikut: aktivasi dilakukan pada 94°C (5 menit), diikuti dengan 25 siklus yang terdiri dari: denaturasi pada 94°C (30 detik), *annealing* pada 55°C (30 detik) dan ekstensi selama 72°C (30 detik), diikuti dengan 3 menit final ekstensi pada 72°C, dan pendinginan selama 5 menit pada suhu 4°C (Muyzer *et al.* 1993). Produk PCR kemudian dianalisis dalam 1,5% gel agarosa.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). DGGE dilakukan dengan menggunakan alat *Dcode™ Universal Mutation Detection System BioRad* dengan gel berukuran 16 × 16 cm dan ketebalan 1,0 mm. DGGE dilakukan dalam 7 liter 1× larutan TAE buffer (20 mM *Tris acetate*, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) pada suhu 60°C selama 15 jam pada voltase 60 Volt. Gradien yang digunakan berkisar antara 35-65% denaturan. Gel diwarnai menggunakan Etidium Bromida (0,5 mg/L) selama 30-45 menit dan dibilas dalam 1× TAE buffer selama 15 menit pada 25°C (suhu kamar). Gel poliakrilamid hasil DGGE kemudian divisualisasi menggunakan *Gel-DoC UV Transluminator*.

Analisis Kelimpahan Relatif. Analisis kelimpahan relatif dan nilai dominansi *Operational Taxonomic Unit* (OTU) dari hasil DGGE dilakukan dengan menggunakan *software* PAST 3 (Felsenstein 1985). *Software* Labimage 1D sebelumnya digunakan terlebih dahulu untuk kuantifikasi pita-pita DNA yang terbentuk pada agar poliakrilamid.

Re-PCR. Pita DNA hasil DGGE yang telah dipotong direndam dalam 30 µL *nuclease free water* untuk PCR pada suhu 4°C. Sebanyak 0,5 µL cairan elusi DNA diambil dan digunakan sebagai cetakan dalam PCR untuk sekuensing. Produk PCR kemudian dielektroforesis pada 1,5% gel agarosa.

Analisis Sekuen Nukleotida dan Konstruksi Pohon Filogenetik. Produk PCR dari masing-masing pita DNA potongan gen 16S rRNA bakteri lambung madu lebah hasil DGGE dikirim ke sebuah perusahaan jasa sekuensing untuk ditentukan sekuen nukleotidanya. Data sekuen-sekuen DNA tersebut dianalisis similaritnya dengan sekuen-sekuen yang ada di *database GenBank* dari NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) menggunakan program *BLASTN*). Pohon filogenetik kekerabatan berdasarkan sekuen parsial gen 16S rRNA bakteri lambung madu lebah

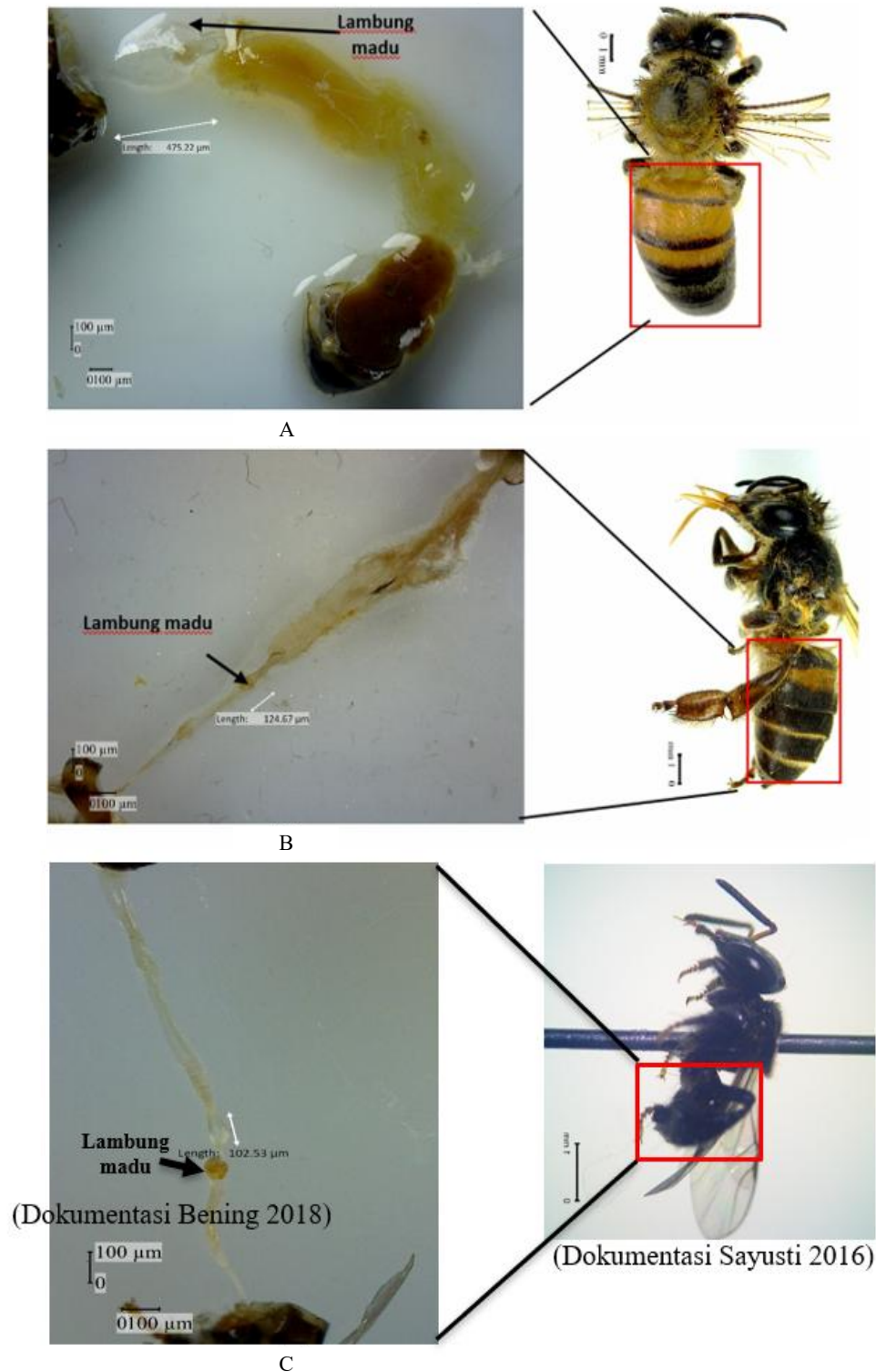
dikontruksi menggunakan program MEGA versi 6 dengan metode *Neighbour Joining* dengan *bootstrap* 1000× (Tamura *et al.* 2011).

HASIL

Hasil Koleksi dan Perlakuannya. Lambung madu di setiap lebah memiliki ukuran yang berbeda-

beda sesuai dengan besar tubuh lebah. Semakin besar ukuran tubuh lebah, maka ukuran lambung madu yang dimilikinya pun semakin besar. Urutan ukuran tubuh dan lambung madu dari yang paling besar ke yang paling kecil berurutan adalah *A. mellifera*, *A. cerana*, dan *T. laeviceps* (Gambar 1).

Keragaman Metagenomik. Konsentrasi asam nukleat yang didapatkan beragam mulai dari 2,1-3,65



Gambar 1. Lambung madu lebah (A) *A. mellifera*, (B) *A. cerana*, (C) *T. laeviceps*

(ng/ μ L) dengan nilai kemurnian A260/A280 berkisar dari 0,82-1,09 dan A260/A230 berkisar antara 0,85-1,69 (Tabel 2). Nilai rasio absorbansi pada asam nukleat yang di dapat menunjukkan nilai kemurnian DNA yang rendah.

Enam sampel yang telah diekstraksi dan diamplifikasi dengan menggunakan gen 16S rRNA menghasilkan pita-pita tunggal dengan panjang sebesar ± 180 pasang basa (Gambar 2). Terdapat perbedaan ketebalan pita antar spesies dapat disebabkan karena perbedaan konsentrasi asam nukleat yang terkandung dalam setiap sampel.

Analisis Keragaman Bakteri 16S rRNA Berdasarkan Metode DGGE. Penelitian ini menggunakan pendekatan non-kultur, sehingga untuk mengetahui keragaman bakteri baik yang kultur atau pun non-kultur menggunakan analisis molekuler DGGE. Pita-pita hasil amplifikasi 16S rRNA kemudian dipisahkan dengan menggunakan metode DGGE dan berhasil mendapatkan total 63 pita untuk 6 sampel. Jumlah pita pada AM1, AM2, AC1, AC2, TL1 dan TL2 berturut-turut adalah 11, 8, 15, 10, 11 dan 8

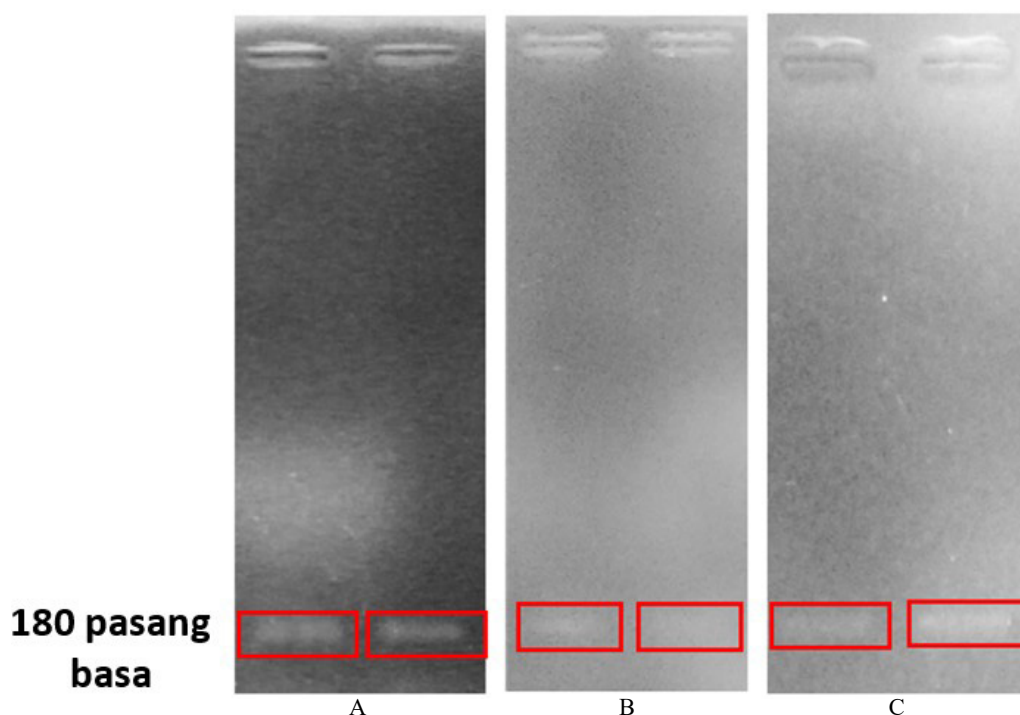
(Gambar 3). Distribusi pita paling banyak terdapat pada AC1, yaitu 15 pita.

Analisis *cluster* digunakan untuk mengetahui pengelompokan yang terbentuk dari persamaan dan perbedaan pita-pita DNA mikroba antar lebah. Analisis *cluster* ini dilakukan dengan menggunakan aplikasi PAST 3 membentuk dua *cluster*. *Cluster* pertama menunjukkan kemiripan antara sampel AM1 dan AM2 di atas 70%. *Cluster* kedua menunjukkan kedekatan antara sampel AC1 dan AC2 dengan TL1 dan TL2. Pada *cluster* kedua terbagi ke dalam dua *cluster* yaitu AC1 dengan AC2 yang memiliki kemiripan di atas 50% dan TL1 dengan TL2 yang memiliki kemiripan di atas 60% (Gambar 4).

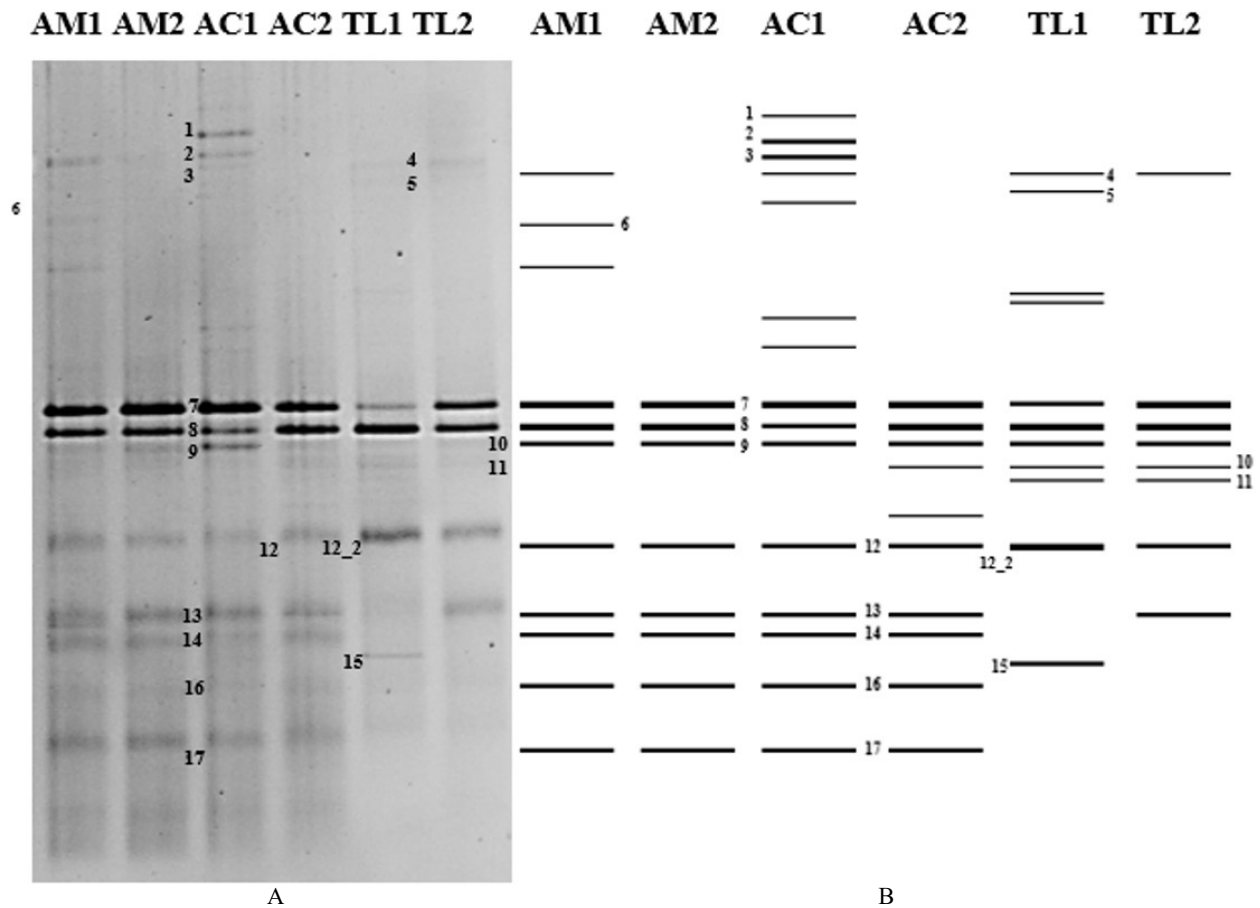
Pita-pita hasil pemotongan gel poliakrilamid dielusi pada suhu 4°C untuk kemudian diamplifikasi kembali dengan primer yang sama namun tanpa *GC-Clamp*. Hasil elusi yang berhasil didapatkan pita DNA setelah diamplifikasi berjumlah 17 pita DNA. Satu pita DNA tidak berhasil terelusi, sehingga pada sumur 16 tidak terdapat DNA yang teramplifikasi (Gambar 5).

Tabel 2. Kuantitas dan kualitas DNA dari lebah *A. mellifera*, *A. cerana*, *T. laeviceps*

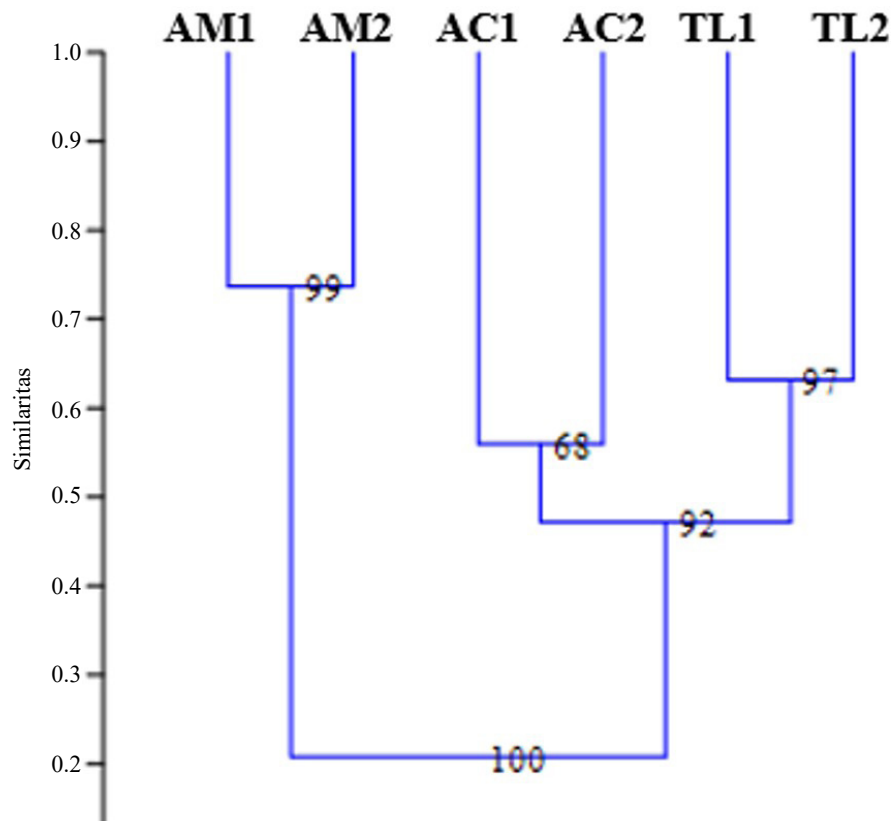
Sampel	Σ Lambung madu	Kode sampel	Konsentrasi asam nukleat (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A280
<i>A. mellifera</i>	1	AM1	3,65	0,97	0,85
<i>A. mellifera</i>	3	AM2	3,45	0,91	1,20
<i>A. cerana</i>	5	AC1	3,35	1,09	1,69
<i>A. cerana</i>	1	AC2	2,40	0,93	0,85
<i>T. laeviceps</i>	10	TL1	2,20	0,82	1,06
<i>T. laeviceps</i>	8	TL2	2,10	0,85	0,89



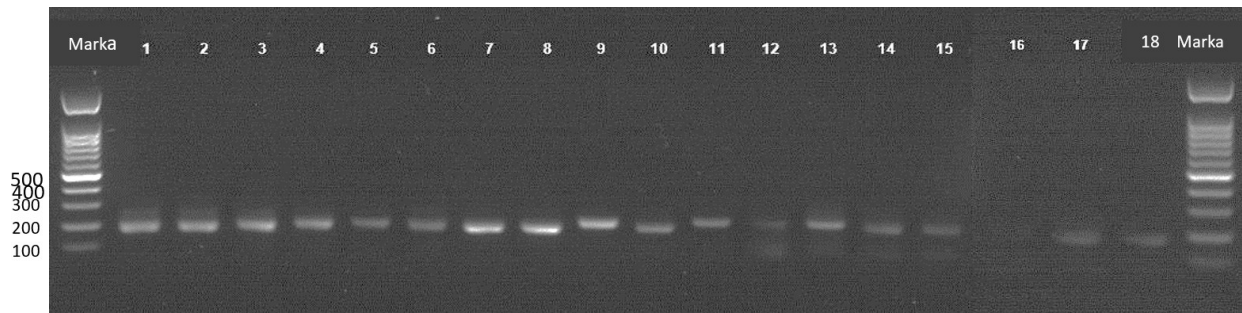
Gambar 2. Amplifikasi PCR gen 16S rRNA pada sampel lebah (A) *A. mellifera*, (B) *A. cerana*, (C) *T. laeviceps*



Gambar 3. Distribusi pita-pita DNA hasil metode DGGE, (A) profil pita DGGE hasil produk PCR gen 16S rRNA dari lambung madu lebah AM (*A. mellifera*), AC (*A. cerana*), TL (*T. laeviceps*), (B) ilustrasi pita DGGE menggunakan software Labimage 1D, 1-17 merupakan pita yang dipotong untuk analisis sekuen DNA



Gambar 4. Analisis pengelompokan kemiripan komunitas bakteri pada sampel lebah *A. mellifera*, *A. cerana*, *T. laeviceps*. AM (*A. mellifera*), AC (*A. cerana*), TL (*T. laeviceps*)



Gambar 5. Hasil amplifikasi ulang (*re-PCR*) pita hasil DGGE dengan primer non-*GC clamp*. Marker 100 pasang basa; Sumur 1-18, pita 1-18

Analisis hasil sekuen dilanjutkan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA 6. Sekuen yang telah dianalisis kemudian dibandingkan dengan database yang telah ada melalui BLAST-N pada *GenBank*. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa sebagian besar bakteri yang teridentifikasi berasal dari kelompok *Proteobacteria* yaitu sebanyak 9 pita DGGE. Selain dari kelompok *Proteobacteria*, juga teridentifikasi 3 kelompok bakteri *Firmicutes*, 2 kelompok bakteri *Actinobacteria*, 1 kelompok bakteri *Bacteroidetes*, 2 kelompok bakteri *Fusobacteria* dan 1 dari kelompok bakteri *Acidobacteria*. Persentase kesamaan yang didapat dari 18 hasil sekuen berkisar antara 75-100% (Tabel 3).

Kelimpahan Relatif OTU Berdasarkan Gen 16S rRNA. Kelimpahan relatif operational taxonomic unit (OTU) dianalisis menggunakan piranti lunak Labimage 1D dan PAST 3. Informasi mengenai keragaman bakteri pada setiap lebah dapat dilihat dengan jumlah, persentase OTU yang mendominasi lambung madu sampel serta dapat diketahui dari penyebaran OTU dari setiap sampel. Bentuk kurva seluruh sampel yang berbeda-beda mempengaruhi perbedaan nilai kelimpahan proporsional dari setiap sampel. Semakin landai kurva kelimpahan yang terbentuk, maka semakin merata sebaran kelimpahan antar OTU. Sebaran kelimpahan OTU yang merata menunjukkan tidak adanya dominansi dari seluruh OTU yang ada. Curamnya garis yang terbentuk pada sampel AM2 dan AC1 menunjukkan adanya OTU yang mendominasi pada lambung madu lebah AM2 dan AC1 (Gambar 6).

Jumlah OTU pada sampel TL2 termasuk rendah, namun persentase OTU dominan berdasarkan gen penyandi 16S rRNA menunjukkan dominansi bakteri pada TL2 adalah yang paling tinggi yaitu 59,4% (Tabel 4). Hasil analisis filogenetik gen pengkode 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan *Neighbour Joining tree* dengan *bootstrap* 1000×. Bakteri yang teramplifikasi merupakan filum *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* dan *Fusobacteria*. *Actinobacteria* dan *Bacteroidetes* hanya dijumpai pada hasil DGGE dari sampel lambung lebah *A. cerana* (Gambar 7-9).

PEMBAHASAN

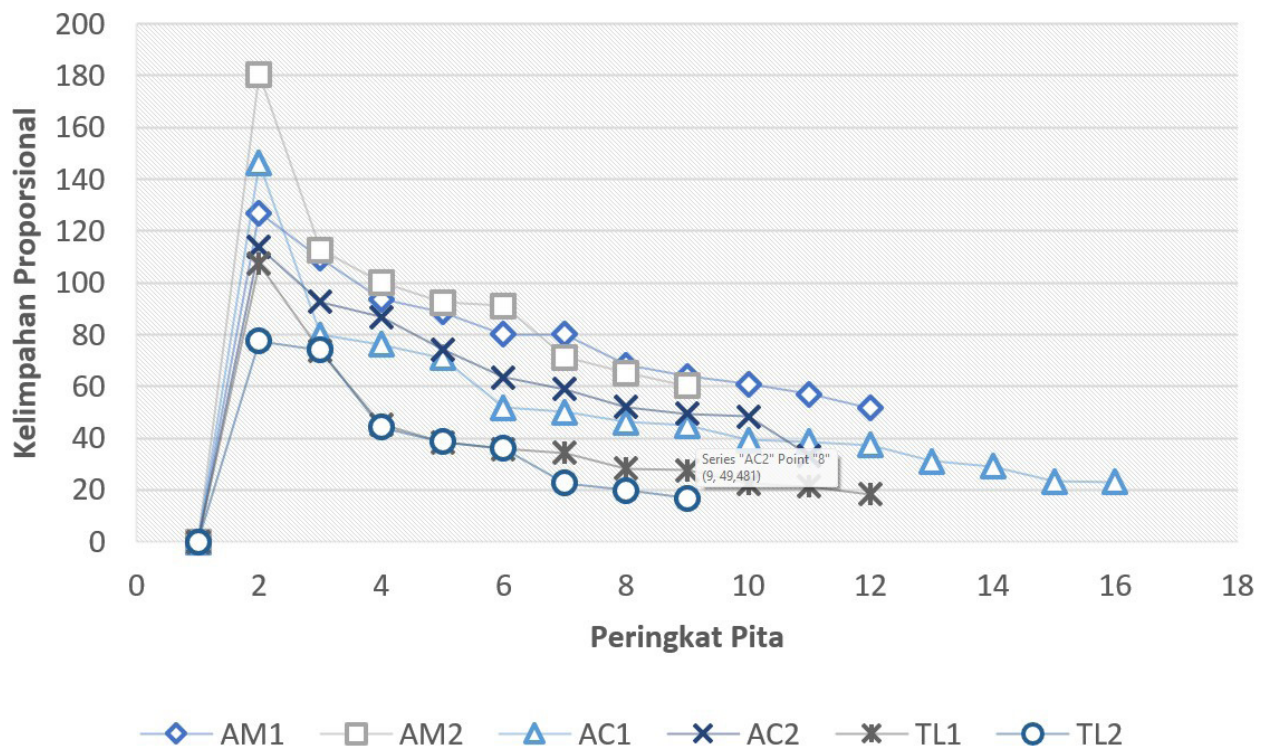
Lebah memiliki anatomi kompleks yang digunakan untuk mengkoleksi nektar dari bunga. Lambung madu sebagai daerah terakhir dari foregut merupakan salah satu bagian dari saluran pencernaan pada lebah. Lambung madu ini terdapat di bagian dalam abdomen berbentuk seperti kantung transparan yang merupakan tempat penyimpanan nektar setelah dikoleksi dari bunga sebelum diletakan pada sarang (Carreck *et al.* 2013). Selama proses ini, nektar dicampur dengan hasil sekresi dari dua kelenjar lebah, yaitu kelenjar saliva dan hipofaringeal. Enzim yang ada pada kelenjar-kelenjar tersebut akan mengubah nektar secara kimiawi menjadi madu (Graham 1992). Perubahan nektar menjadi madu tersebut selain dipengaruhi oleh enzim, juga dipengaruhi oleh keberadaan bakteri yang ada pada lambung lebah. Nektar dan polen yang dikoleksi oleh lebah akan diproses pada sarang dengan berbagai aktivitas lebah yang dipengaruhi oleh mikroba dan enzim-enzim (Lee *et al.* 2014).

Lambung madu yang telah diekstraksi dan diamplifikasi menunjukkan adanya pita-pita DNA yang terbentuk pada 180 pasang basa (Gambar 2). Hal tersebut menunjukkan adanya komunitas bakteri pada keenam sampel lebah. Konsentrasi dan kemurnian asam nukleat yang didapatkan dari setiap sampel berbeda-beda. Sampel TL1 memiliki nilai kemurnian DNA paling rendah (Tabel 2). Hal ini dapat disebabkan oleh jumlah ekstraksi lambung madu yang paling banyak, yaitu 10 unit. Sehingga kemungkinan tertinggalnya banyak pengotor semakin besar. Selain kemurnian asam nukleat yang rendah, konsentrasi asam nukleat yang ada pada sampel TL pun memiliki nilai yang rendah. Kualitas DNA yang baik ditentukan oleh kemurnian dan konsentrasi DNA. Kemurnian DNA berkisar 1,8 hingga 2,0 sedangkan konsentrasi DNA yaitu 20 hingga 50 ng/μL tergantung jenis sampel dan target amplifikasi (Sambrook *et al.* 1989). Salah satu faktor yang dapat menyebabkan hal tersebut adalah jarak terbang *T. laeviceps* yang sempit, sehingga sumber makanan yang dapat dikonsumsi pun tidak begitu luas. Rata-rata panjang lebah *T. laeviceps* mencapai 3,67 mm (Patel dan Pastagia 2016). Menurut

Tabel 3. BLAST-N gen 16S rRNA pita DNA hasil DGGE band dari isolasi DNA mikroba asal lambung madu lebah *A. mellifera*, *A. cerana* dan *T. laeviceps*

DGGE Band	BLAST-n	Query cover (%)	E value	Identity	Acc. Number	Phylum
1R	<i>Lactobacillus kunkeei</i> strain YH-15	52	2.00E-27	75	NR_026404.1	Firmicutes
2R	<i>Actinomyces cardiffensis</i> strain CCUG 44997	4	8.5	100	NR_025521.1	Actinobacteria
3R	<i>Prevotella copri</i> strain CB7	34	1.00E-42	83	NR_040877.1	Bacteroidetes
4R	<i>Lactobacillus lindneri</i> strain KPA	73	2.00E-72	93	NR_029308.2	Firmicutes
5R	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469	94	1.00E-61	100	NR_074902.1	Proteobacteria
6F	<i>Sphingomonas lutea</i> strain JS5	47	2.00E-07	85	NR_153746.1	Proteobacteria
11R	<i>Fusobacterium gastrosuis</i> strain CDW1	35	0.001	100	NR_146837.2	Fusobacteria
12R	<i>Bifidobacterium longum</i> strain KCTC 3128	35	1.00E-04	100	NR_117506.1	Actinobacteria
12_2R	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469	97	1.00E-61	100	NR_074902.1	Proteobacteria
13R	<i>Parasaccharibacter apium</i> strain A29	80	3.00E-25	84	NR_133042.1	Proteobacteria
14R	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469	98	1.00E-61	100	NR_074902.1	Proteobacteria
15R	<i>Enterobacter cloacae</i> strain ATCC 13047	99	2.00E-45	100	NR_102794.2	Proteobacteria
16R	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469	96	1.00E-61	100	NR_074902.1	Proteobacteria
17R	<i>Acinetobacter kookii</i> strain 11-0202	27	0.005	100	NR_135727.1	Proteobacteria
18R	<i>Lactobacillus ixorae</i> strain Ru20-1	16	0.016	100	NR_153713.1	Firmicutes
19R	<i>Citrobacter youngae</i> strain GTC 1314	57	3.00E-44	91	NR_041527.1	Proteobacteria
21R	<i>Acidobacterium ailaui</i> strain PMMR2	29	3.00E-06	92	NR_153719.1	Acidobacteria
22R	<i>Fusobacterium gastrosuis</i> strain CDW1	18	0.005	100	NR_146837.2	Fusobacteria

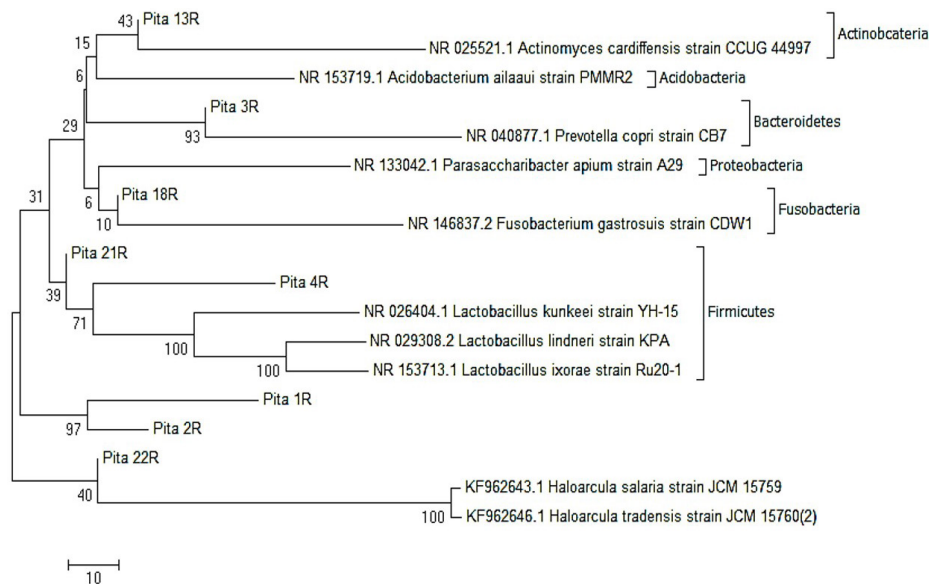
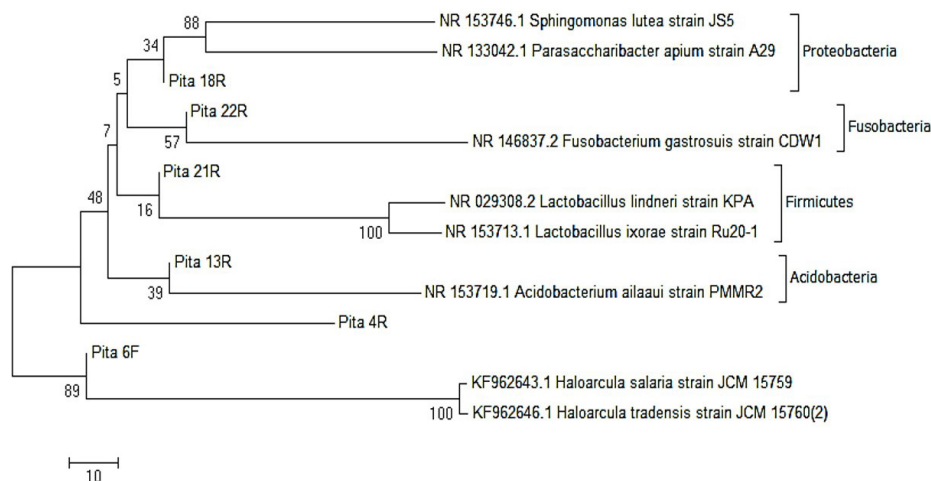
R-Reverse, F-Forward

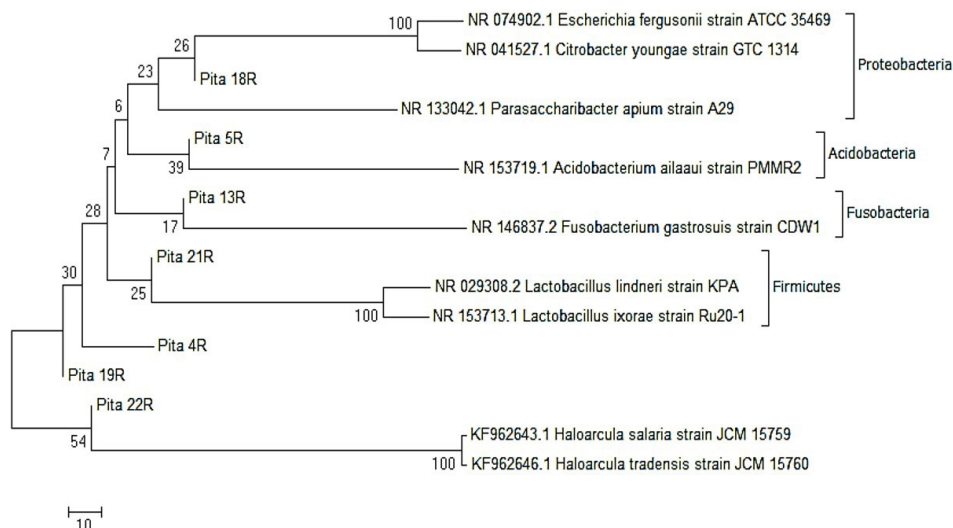
Gambar 6. Peringkat kelimpahan (rank abundance) gen 16S rRNA berdasarkan OTU dari sampel lebah. *A. mellifera* (AM) 1 dan 2, *A. cerana* (AC) 1 dan 2, *T. laeviceps* (TL) 1 dan 2Tabel 4. Peringkat kelimpahan (rank abundance) gen 16S rRNA bakteri asal lambung madu lebah berdasarkan OTU sampel lebah *A. mellifera*, *A. cerana* dan *T. laeviceps*

Sampel	Jumlah OTU (unit)	% OTU dominan	Σ % OTU yang dominan	OTU yang sama di setiap sampel	%OTU khusus
AM1	11	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469 (14.4%), <i>Parasaccharibacter apium</i> strain A29 (12.4%), <i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469 (10.6%)	37.4%	<i>E. fergusonii</i> strain ATCC	<i>Sphingomonas lutea</i> strain JS5 (6.5%), tidak disekeun (5.9%)
AM2	8	<i>Fusobacterium gastrosuis</i> strain CDW1 (23.3%), <i>Acinetobacter kookii</i> strain 11-0202 (14.6%), <i>Lactobacillus ixorae</i> strain Ru20-1 (13.0%)	50.90%	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC	0

Tabel 4. Lanjutan

Sampel	Jumlah OTU (unit)	% OTU dominan	Σ % OTU yang dominan	OTU yang sama di setiap sampel	%OTU khusus
AC1	15	<i>Fusobacterium gastrosuis</i> strain CDW1(19.3%), <i>Fusobacterium gastrosuis</i> strain CDW1(10.1%), <i>Acinetobacter kookii</i> strain 11-0202(10.0%)	39.80%	<i>E. fergusonii</i> strain ATCC	<i>Lactobacillus kunkeei</i> strain YH-15(2.9%), <i>Actinomyces cardiffensis</i> strain CCUG 44997(3.9%), tidak disequen (3.7%, tidak disequen-(4.7%), tidak disequen (5.0%), tidak disequen (4.1%)
AC2	10	<i>Fusobacterium gastrosuis</i> (16.9%), <i>E. fergusonii</i> strain ATCC (13.8%), <i>Fusobacterium gastrosuis</i> strain CDW1(12.9%)	43.60%	<i>E. fergusonii</i> strain ATCC	tidak disequen(4.9%)
TL1	11	<i>E. fergusonii</i> strain ATCC (23.7%), <i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC (16.3%), <i>E. fergusonii</i> strain ATCC (10.0%)	50%	<i>E. fergusonii</i> strain ATCC	<i>E. fergusonii</i> strain ATCC (6.1%)
TL2	8	<i>E. fergusonii</i> strain ATCC (22.5%), <i>Fusobacterium gastrosuis</i> strain CDW1 (23.5%), <i>Acinetobacter kookii</i> strain 11-0202 (13.4%)	59.40%	<i>E. fergusonii</i> strain ATCC	0

Gambar 7. Pohon filogenetik sekuen gen 16S rRNA bakteri yang didapat dari lambung madu lebah *A. cerana*Gambar 8. Pohon filogenetik sekuen gen 16S rRNA bakteri yang didapat dari lambung madu lebah *A. mellifera*



Gambar 9. Pohon filogenetik sekuen gen 16S rRNA bakteri yang didapat dari lambung madu lebah *T. laeviceps*

Kuhn-Neto *et al.* (2009), untuk ukuran stingless bees 3-4 mm memiliki jarak terbang hingga 500 m.

Analisis clustering pada Gambar 4 menunjukkan adanya kemiripan komunitas mikroba pada sampel *A. cerana* dan *T. laeviceps*. Hal ini ditunjukkan dengan posisi *A. cerana* dan *T. laeviceps* yang berada dalam satu cabang cluster. Kemiripan komunitas mikroba pada kedua spesies tersebut dapat disebabkan kedekatan lokasi koleksi antara *A. cerana* yang berlokasi di Leuwikopo IPB dan *T. laeviceps* yang dikoleksi di Animal House IPB. Jarak terbang *A. cerana* untuk mengambil sumber makanan sekitar 300-750 m (Punchihewa 1994). *Apis cerana* menghemat energi yang mereka miliki dengan membangun sarang yang lebih kecil dan memiliki jarak terbang yang lebih kecil daripada *A. mellifera* Carr (2011). Lokasi *A. cerana* yang berdekatan dengan *T. laeviceps* menyebabkan adanya kemungkinan lebah untuk menggunakan sumber makanan yang sama. Makanan merupakan salah satu faktor yang menyebabkan keragaman bakteri dalam lambung lebah. Adapun jarak terbang yang umum pada *A. mellifera* berkisar antara 600-800 m (Beekman dan Ratnieks 2000). Perbedaan *cluster* *A. mellifera* (AM1 dan AM2) dengan *A. cerana* (AC1 dan AC2) dan *T. laeviceps* (T1 dan T2) dapat disebabkan karena lokasi koleksi *A. mellifera* yang berjauhan dari lokasi koleksi lebah *A. cerana* dan *T. laeviceps*. Jarak terbang yang pendek dan lokasi koleksi yang jauh menyebabkan *A. mellifera* tidak dapat menggunakan sumber makanan yang sama dengan *A. cerana* dan *T. laeviceps*. Manila-Fajardo dan Cervancia (2003) menyebutkan bahwa *A. mellifera* sulit beradaptasi sempurna pada kondisi hutan alami di daerah tropis, sehingga tidak semua sumber nektar dapat digunakan sebagai sumber makanan. Hal-hal tersebut menyebabkan keragaman bakteri menjadi berbeda pula antar spesies lebah. Dillon dan Dillon

(2004) melaporkan bahwa komunitas mikroba pada lambung lebah dipengaruhi kuat oleh makanan yang dikonsumsi oleh lebah.

Berdasarkan prinsip DGGE, jarak migrasi yang sama dari pita-pita pada gel menunjukkan kesamaan organisme (Meroth *et al.* 2003), dan ketebalan pita mengindikasikan kelimpahan relatif dari organisme tersebut (Meroth *et al.* 2003). Keberadaan pita DNA digunakan untuk menggambarkan struktur komunitas, keragaman, dan kekerabatan antar sampel (Han *et al.* 2014). Data pada Gambar 3 dan Tabel 3 menunjukkan keragaman antar satu sampel dengan sampel lainnya. Keragaman tersebut dapat disebabkan adanya perbedaan ukuran lambung madu (Gambar 1) dan jumlah lambung madu yang digunakan saat ekstraksi. Semakin besar ukuran lebah madu dan semakin banyak jumlah lebah madu yang digunakan, dapat meningkatkan keragaman komunitas bakteri sampel lebah (Tabel 4). Hal ini seperti yang disebutkan Martinson *et al.* (2012) bahwa komunitas bakteri yang beragam dipengaruhi dari total ukuran, komposisi, lokasi dan fungsinya pada saluran pencernaan lebah. Adapun kestabilan dari komunitas mikroba dipengaruhi oleh nutrisi dan kehidupan sosial dari lebah, lingkungan dan tahapan ontogenetik lebah (Martinson *et al.* 2012).

Terdapatnya keragaman dalam kekayaan (jumlah) dan kelimpahan relatif dari komunitas bakteri pada setiap sampel (Gambar 6) dapat menunjukkan perbedaan kondisi kesehatan dari lebah dan dapat menjadi faktor yang mempengaruhi hasil madu yang dihasilkan oleh lebah. Produksi madu pada lebah dihasilkan dari berbagai sumber makanan dan berbagai komunitas bakteri pada lebah, maka fungsi dan komposisi dari komunitas bakteri dapat mempengaruhi produksi makanan yang dihasilkan lebah dan mempengaruhi kesehatan dari lebah tersebut. Hal ini sesuai dengan Engel *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa kelimpahan

relatif dari komunitas bakteri dan interaksinya satu sama lain dapat mempengaruhi kesehatan lebah. Lebah dapat dikolonisasi oleh berbagai komunitas bakteri yang dipengaruhi oleh keadaan lebah dan lingkungan sekitarnya (Engel *et al.* 2016).

Konstruksi pohon filogenetik menunjukkan hubungan kekerabatan bakteri yang terdapat di dalam lambung madu lebah (Gambar 7-9). Terdapat 6 filum yang didapatkan dari hasil BLAST-N, yaitu filum Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria dan Fusobacteria. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Yun *et al.* (2018) yang menemukan bahwa komunitas bakteri lambung lebah didominasi oleh dua filum bakteri yaitu Firmicutes dan Proteobacteria. Filum lain yang ditemukan di saluran pencernaan lebah yaitu kelompok bakteri dari filum Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria dan Acidobacteria (Yun *et al.* 2018). Actinobacteria dan Proteobacteria berfungsi dalam transportasi asam amino dan karbohidrat serta berperan dalam proses fermentasi (Lee *et al.* 2014). Bakteri dari kelompok Firmicutes seperti *Lactobacillus* menunjukkan potensi besar dalam menghambat *Paenibacillus larvae* yang merupakan bakteri patogen pada lebah (Yoshiyama dan Kimura 2009). Filum Actinobacteria dan Bacteroidetes hanya ditemukan pada lebah *A. cerana*. Alasan Actinobacteria terdapat pada lambung madu lebah *A. cerana* dapat disebabkan oleh perilaku foraging *A. cerana* yang dapat memakan nektar dari banyak sumber tanaman. Selain itu, *A. cerana* memiliki frekuensi foraging yang lebih sering dibandingkan *A. mellifera* (Tatsuno dan Osawa 2016). Hal ini menyebabkan Actinobacteria yang melimpah jumlahnya di lingkungan pun (Van der Meij *et al.* 2017) dapat terdeteksi di dalam lambung madu AC1.

Keragaman komunitas bakteri dari sampel lebah *A. mellifera*, *A. cerana*, dan *T. laeviceps* dalam sampel penelitian ini menunjukkan perbedaan komposisi komunitas bakteri antar sampel lebah. Sampel *A. cerana* nomor satu memiliki kekayaan (jumlah) OTU yang paling banyak dibandingkan sampel lainnya yaitu 15 OTU. Sedangkan sampel *T. laeviceps* nomor dua memiliki jumlah persentase OTU dominan yang nilainya paling tinggi yaitu 59.4%. Komunitas bakteri di lambung madu lebah *A. mellifera*, *A. cerana*, *T. laeviceps* menunjukkan terdapat kesamaan bakteri dari filum Firmicutes, Proteobacteria, Acidobacteria dan Fusobacteria. Filum Actinobacteria dan Bacteroidetes hanya ditemukan pada lambung madu lebah *A. cerana*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University yang telah memfasilitasi selama penelitian hingga selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Asnita D, Meryandini A. 2023. Bakteri asam laktat kandidat probiotik dari susu kuda bima. *Jurnal Sumberdaya HAYATI* 9:49-54. <https://doi.org/10.29244/jsdh.9.2.49-54>
- Beekman M, Ratnieks FLW. 2000. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Funct Ecol* 14:490-496. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00443.x>
- Bijlsma L, Bruijn LLM, Martens EP, Sommeijer MJ. 2006. Water content of stingless bee honeys (Apidae, Meliponini): interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. *Apidologie* 37:480-486. <https://doi.org/10.1051/apido:2006034>
- Carr AJ. 2011. Asian Honeybee: Possible Environmental Impacts. Report for the Department of Sustainability, Environment, Water, Population and Communities. Canberra (AU): Sustineo Pty Ltd Canberra.
- Carreck NL, Andree, Brent CS, Cox-Foster D, Dade HA, Ellis JD, Hatjina F, Englesdorp D. 2013. Standard methods for *A. mellifera* anatomy and dissection. *J Apic Res* 52:1-39. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.03>
- Corby-Harris V, Maes P, Anderson KE. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE* 9:1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095056>
- Cortopassi-Laurino M, Gelli DS. 1991. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de *Meliponinés* du Brésil. *Apidologie* 22:61-73. <https://doi.org/10.1051/apido:19910108>
- Dillon RJ, Dillon VM. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* 49:71-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>
- Engel P, Kwong WK, McFrederick Q, Anderson KE, Barribeau SM, Chandler JA, Cornman RS, Dainat J, Miranda JR, Doublet V, Emery O, Evans JD, Farinelli L, Flenniken ML, Granberg F, Grasis JA, Gauthier L, Hayer J, Koch H, Kocher S, Martinson VG, Moran N, Munoz-Torres M, Newton I, Paxton RJ, Powell E, Sadd BM, Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Song SJ, Schwarz RS, vanEngelsdorp D, Dainat B. 2016. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *Mbio* 7:1-9. <https://doi.org/10.1128/mBio.02164-15>
- Fatma II, Nuraida L, Faridah DN. 2022. Potensi probiotik bakteri asam laktat asal madu dari tiga jenis lebah yang berbeda. *J Teknol dan Industri Pangan* 33:189-199. <https://doi.org/10.6066/jtip.2022.33.2.189>
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Graham JM. 1992. The Hive and the Honeybee. Dadant and Sons (ed). Hamilton (USA): Dadant & Sons Inc.
- Han PP, Shen SG, Jia SR, Wang HY, Zhong C, Tan ZL, Lv HX. 2014. Comparison of bacterial community structures of terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in three different regions of China using PCR-DGGE analysis. *World J Microbiol Biotechnol* 317:1061-1069. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1856-8>
- Kahono S, Chantawannakul P, Engel MS. 2018. Social bees and the current status of beekeeping in Indonesia. In: Chantawannakul P, Williams G, Neumann P. (Eds.). *Asian Beekeeping in the 21st Century*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. p 287-306. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8222-1_13
- Kuhn-Neto B, Contrera FAL, Castro MS, Nieh JC. 2009. Long distance foraging and recruitment by a stingless bee, *Melipona mandacai*. *Apidologie* 40:472-480. <https://doi.org/10.1051/apido/2009007>
- Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, Mattila HR, Newton ILG. 2014. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Appl Environ Microbiol* 17:1-19. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12526>
- Manila-Fajardo AC, Cervancia C. 2003. Performance of honey bees (*Apis mellifera* L.) in three ecosystems in Laguna, Philippines. *Philipp Agric Sci* 86:146-157.
- Martinson VG, Moy J, Moran NA. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microbiol* 78:2830-2840. <https://doi.org/10.1128/AEM.07810-11>

- Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP. 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:475-482. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.475-482.2003>
- Muyzer G, Waal HR, Uiterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Olofsson CT, Butler E, Markowicz P, Lindholm C, Larsson L, Vásquez A. 2016. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees—an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *Int Wound J* 13:668-679. <https://doi.org/10.1111/iwj.12345>
- Patel HK, Pastagia JJ. 2016. Morphometric variation in workers of stingless bees *Tetragonula laeviceps* smith in south gujarat. *Int J Plant Prot* 9:445-449. <https://doi.org/10.15740/HAS/IJPP/9.2/445-449>
- Punchihewa RWK. 1994. Beekeeping for Honey Production in Sri Lanka: Management of Asiatic Hive Honeybee *Apis cerana* in its Natural Tropical Monsoonal Environment. Peradeniya: Sri Lanka Department of Agriculture.
- Rosello-Mora, Thamdrup B, Schafer H, Weller R, Amann R. 1999. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *System Appl Microbiol* 22:237-248. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80071-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80071-X)
- Ruttner F. 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Jerman (UK): Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-72649-1>
- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGAS: molecular evolutionary genetics analyzing using maximum likelihood, evolutionary distances, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 10:2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tatsuno M, Osawa N. 2016. Flower visitation patterns of the coexisting honey bees *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Entomol Sci* 19:255-267. <https://doi.org/10.1111/ens.12206>
- Van der Meij A, Worsley S, Hutchings MI, van Wezel GP. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* 41:392-416. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
- Wen Y, Wang L, Jin Y, Zhang J, Su L, Zhang X, Zhou J, Li Y. 2017. The microbial community dynamics during the vitex honey ripening process in the honeycomb. *Front Microbiol* 8:1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01649>
- Yoshiyama M, Kimura K. 2009. Bacteria in the gut of the Japanese honey bee, *A. cerana japonica*, and their antagonistic effect against *P. larvae*, the causal agent of American foulbrood. *J Invertebr Pathol* 102:91-96. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.005>
- Yun J, Jung M, Kim PS, Bae J. 2018. Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Sci Rep* 8:1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19860-7>