

Qualitative Analysis of Partial 16S rRNA Amplicon of Mitochondrial Gene of Stingless Bees in Pesawaran

Priyambodo^{1,2}, Elly Lestari Rustiati^{1,3}, Dian Neli Pratiwi³, Alvin Wiwiet Susanto⁴, Aulia Imtitsal¹, Aditya Fahrezi¹, Muhammad Febriansyah¹, Andriyani Wijaya Kusuma¹, Eko Agus Srihanto⁵, Enny Saswiyanti⁵, Mahfud Sidik¹, Lousanja Dira Sa'uddah⁶, Indah Ayu Lestari¹, Ani Andri Yani¹, Viki Ramadhan¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia;

²Rumah Biologi Indonesia, Bandar Lampung, Indonesia;

³Yayasan Akar Lestari Indonesia, Bandar Lampung, Indonesia;

⁴Master programme in Biology, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden;

⁵Balai Veteriner Lampung, Bandar Lampung, Indonesia;

⁶Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia

Article History

Received : November 02th, 2023

Revised : November 29th, 2023

Accepted : Desember 22th, 2023

*Corresponding Author:

Priyambodo, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia;

Email:

priyambodo@fmipa.unila.ac.id

Abstract: Pesawaran is one of the areas that has the potential to cultivate stingless bees as producers of honey and propolis. This study was aimed at qualitatively analysing partial amplicons of the 16S rRNA gene from individuals found at the research site. The research was performed from April to September 2023 in an explorative approach. Based on the exploration that has been done in Harapan Jaya Village, Way Ratai District, Pesawaran Regency, individual stingless bees were obtained from 5 different colonies. Individual samples of stingless bees were further extracted and amplified by commercial kits. Each individual from 5 different colonies has successfully obtained its DNA amplicons. Based on qualitative analysis using 1% agarose gel, the size of the partial gene ranged from 400bp to 500bp. This result is in accordance with the data contained in the genbank, where the 16S rRNA gene size is more than 500bp. Therefore, it has been concluded that the size of the partial amplicons of the 16S rRNA gene of individual stingless bees from the 5 colonies that were obtained is actually in range of the size of the 16S rRNA gene of stingless bees that have been recorded in the genbank.

Keywords: 16S rRNA, partial amplicon, stingless bee.

Pendahuluan

Lebah tanpa sengat merupakan jenis terkecil dari anggota kelompok lebah yang termasuk dalam *family* Apidae dan *subfamily* Meliponinae (Herwina *et al.*, 2021). Hewan ini bersifat eusosial dan terdistribusi luas baik di wilayah beriklim tropis dan subtropis (Michener, 2007). Di Indonesia, telah tercatat terdapat 37 jenis lebah tanpa sengat yang telah dibudidayakan untuk diambil madunya (Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Hasil Hutan Bukan Kayu, 2018). Di alam, baik secara liar maupun pada lingkungan budidaya, lebah tanpa sengat mempunyai peran sebagai

polinator yang efektif (Slaa *et al.*, 2006).

Jenis lebah tanpa sengat menjadi sumber kekayaan hayati yang sedang dioptimalisasi untuk menghasilkan propolis dan madu sebagai sarana peningkatan kesejahteraan masyarakat (Herwina *et al.*, 2022). Upaya budidaya ini terkait dengan jumlah propolis yang dihasilkan oleh lebah tanpa sengat genus *Trigona* lebih banyak jika dibandingkan dengan *Apis* spp. (Fatoni, 2008). Selain itu, madu yang dihasilkan oleh lebah tanpa sengat mempunyai kandungan flavonoid dan polifenol yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan lebah madu pada umumnya (Arias *et al.*, 2006), sehingga mempunyai efek antioksidan yang lebih besar

(Kelly *et al.*, 2014).

Peningkatan minat budidaya lebah tanpa sengat di masyarakat terus meningkat, termasuk di Lampung. Dalam data yang telah terpublikasikan, budidaya lebah tanpa sengat di Lampung tersebar di Bandar Lampung (Prasetyo dan Aryono, 2020), Kabupaten Lampung Timur (Juli, 2021), dan Kabupaten Pesawaran (Sidik *et al.*, 2022b). Hal ini menyebabkan banyak pelatihan budidaya lebah tanpa sengat di Lampung (Permatasari *et al.*, 2023). Namun, hal ini tidak diikuti peningkatan penelitian tentangnya. Tercatat Suhandy *et al.* (2022) telah melakukan penelitian tentang uji autentifikasi madu yang dihasilkan oleh lebah madu dan lebah tanpa sengat di beberapa lokasi di Lampung. Selibhnya, Sidik *et al.* (2022a) meneliti tentang karakterisasi *beebread* dari jenis lebah tanpa sengat berdasarkan *pollen* yang dikumpulkannya.

Saat ini, di Lampung belum ada penelitian tentang keanekaragaman lebah tanpa sengat, baik pada populasi liar maupun pada populasi budidaya. Padahal produksi madu juga bergantung pada jenis lebah yang menghasilkannya (Sidik *et al.*, 2022b). Oleh karena itu, diperlukan penelitian yang dapat memberikan data terkait dengan keragaman lebah tanpa sengat, sehingga dapat menjadi rujukan dalam budidaya lebah tanpa sengat yang dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji secara kualitatif keberadaan ampikon sumber genetik lebah tanpa sengat yang berasal dari Pesawaran, Lampung, khususnya ampikon parsial gen 16S rRNA, sehingga dapat menjadi dasar dalam penyusunan peta kekerabatan dan keanekaragaman hayati lebah tanpa sengat di Lampung dan menambah informasi komprehensif tentang data keanekaragaman hayati di Indonesia.

Bahan dan Metode

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan secara eksploratif untuk mencari sampel lebah tanpa sengat di Desa Harapan Jaya, Kecamatan Way Ratai, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung. Hasil individu yang didapatkan selanjutnya dianalisis dengan prosedur ilmiah di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung, Bandar Lampung.

Penelitian dilaksanakan pada rentang Bulan April sampai dengan September tahun 2023.

Alat dan bahan penelitian

Bahan penelitian meliputi larutan *phosphate-buffer saline* (PBS), satu set reagen QIAmp® *Fast DNA Tissue and Blood Kit*, bubuk agarosa, larutan *buffer Tris-Asetat-EDTA* (TAE), *loading dye*, *SYBR safe*, *marker* 100bp, set reagen amplifikasi *MyTaq TMHS Red Mix* (Bioline), *Nuclease-free water*, dan pasangan primer gen mitokondria pengkode 16S rRNA dengan urutan *forward primer*: 5'-TGG CTG CAG TAT AAC TGA CTG TAC AAA GG-3' dan *reverse primer* 5'-GAA ACC AAT CTG ACT TAC GTC GAT TTG A-3' (Thummajitsakul *et al.*, 2013 dalam Trianto dan Purwanto, 2020b). Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi botol vial, *ice box*, lemari pendingin, mikropipet, mikrotip, *waterbath*, *vortex mixer*, *biosafety cabinet*, *thermal cycler*, set alat elektroforesis, dan set alat ultraviolet (UV) *transilluminator*.

Prosedur penelitian

Pengumpulan sampel penelitian

Sarang koloni lebah tanpa sengat didapatkan dengan melakukan jelajah berdasarkan metode Bookhout (Lamerlabel *et al.*, 2021). Individu sampel lebah tanpa sengat didapatkan dengan memasang perangkap berupa botol vial pada mulut sarang lebah. Sampel individu lebah tanpa sengat selanjutnya difiksasi dengan larutan PBS (Hage *et al.*, 2014).

Pengangkutan dan penyimpanan sampel

Koleksi sampel individu lebah tanpa sengat yang telah ditempatkan pada botol vial dengan larutan PBS diletakkan pada *ice box* selama pengangkutan ke Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung. Sampel selanjutnya disimpan pada lemari pendingin pada suhu -4°C.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA sampel individu lebah tanpa sengat dilaksanakan berdasarkan protokol QIAmp® *Fast DNA Tissue and Blood Kit* tanpa modifikasi. Pelaksanaan ekstraksi DNA atas sampel individu lebah tanpa sengat yang telah didapatkan dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung.

Keberhasilan ekstraksi DNA dilihat secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilaksanakan dengan reagen *MyTaq TMHS Red Mix (Bioline)* berdasarkan modifikasi metode Trianto dan Purwanto (2020a). Kondisi amplifikasi diatur dalam 35 siklus melalui tahap *pre-denaturation* 94°C selama 5 menit, *denaturation* 94°C selama 1 menit, *annealing* 60°C selama 1 menit, *extention* 72°C selama 2 menit, dan diakhiri dengan *post-extention* 72°C selama 7 menit.

Uji Kualitatif Amplikon DNA

Keberhasilan proses amplifikasi DNA individu dari 5 koloni lebah tanpa sengat diuji secara kualitatif dengan metode visualisasi hasil elektroforesis gel agarosa 1% di bawah sinar UV (Rustiati *et al.*, 2019; Priyambodo *et al.*, 2023).

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengambilan sampel

Pelaksanaan pengambilan sampel individu lebah tanpa sengat di Desa Harapan Jaya, Kecamatan Way Ratai, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung berhasil mendapatkan sampel dari 5 (lima) koloni yang berbeda. Sampel lebah tanpa sengat diambil 2 sampai dengan 3 individu dari masing-masing koloni dan dimasukkan ke dalam botol vial serta ditambahkan larutan PBS (Gambar 1).

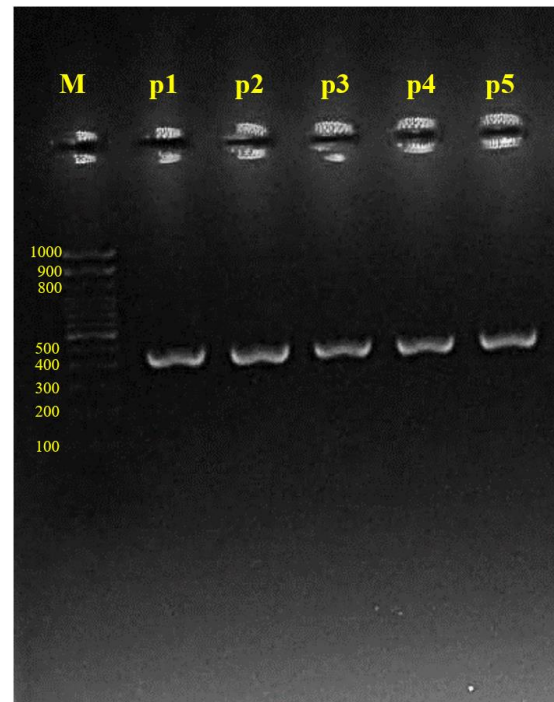


Gambar 1. Sampel individu lebah tanpa sengat.

Hasil visualisasi amplikon DNA

Sampel selanjutnya diekstraksi DNA-nya dan dilanjutkan dengan proses amplifikasi

menggunakan sepasang primer di Laboratorium Bioteknologi, Balai Veteriner Lampung. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa amplikon DNA dari masing-masing individu sampel lebah tanpa sengat berukuran antara 400bp sampai dengan 500bp (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil amplifikasi sampel individu lebah tanpa sengat (M: marker 100bp, p1: sampel individu dari koloni 1, p2: sampel individu dari koloni 2, p3: sampel individu dari koloni 3, p4: sampel individu dari koloni 4, p5: sampel individu dari koloni 5).

Pembahasan

Pengambilan sampel

Sampel individu lebah tanpa sengat yang diperoleh dari 5 koloni disimpan dalam larutan PBS dalam lemari pendingin sebelum dilanjutkan ke analisis selanjutnya. Penggunaan larutan PBS sebagai larutan fiksatif sampel berfungsi untuk mempertahankan penyusunan sel-sel dan menjaga agar kondisi sitologi tetap dalam kondisi baik dan representatif untuk pengamatan histologis (Perry *et al.*, 2016). Oleh karena itu, penggunaan larutan PBS juga telah banyak digunakan sebagai larutan fiksatif dalam penelitian, termasuk dalam pembuatan gambaran histologis organ hepar, pankreas, dan ginjal pada tikus (Sari, 2015), pengembangan protokol pembuatan preparat histologis ikan pada tahap perkembangan telur, embrio, dan larva

(Wijayanti *et al.*, 2017), serta pada penginkubasian lensa mata manusia dari pendonor (Augusteyn *et al.*, 2008).

Penggunaan PBS dalam penyimpanan sampel individu lebah tanpa sengat dari 5 koloni dilakukan sebagai modifikasi dari penelitian lain pada lebah tanpa sengat. Sadam *et al.* (2016) tidak menggunakan PBS sebagai larutan fiksatif, namun menggunakan larutan alkohol 70%. Dalam penelitian lain, Trianto dan Purwanto (2020a) juga tidak menggunakan PBS, namun menggunakan ethanol 90%. Hal ini tidak memberikan dampak signifikan dalam hasil visualisasi yang ditunjukkan oleh amplikon DNA sampel. Oleh karena itu, penggunaan PBS tidak mengurangi keberhasilan dalam tahap ekstraksi dan amplifikasi DNA.

Ekstraksi DNA

Keberhasilan ekstraksi dan amplifikasi DNA dapat diuji secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif hasil ekstraksi dan amplifikasi dapat dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi tertentu (Pesaresi *et al.*, 2003; Harahap, 2017). Elektroforesis gel agarosa merupakan metode yang paling efektif untuk memisahkan segmen-segmen DNA pada berbagai ukuran yang berkisar antara 100bp sampai dengan 25kb (Sambrook dan Russel, 2001). Munculnya pita DNA setelah proses separasi menandakan molekul DNA berhasil diekstraksi (Lee *et al.*, 2012). Hal ini sesuai dengan hasil elektroforesis yang telah dilaksanakan, di mana rentang ukuran fragmen DNA yang didapatkan dari amplikon parsial dari gen 16S rRNA individu lebah tanpa sengat dari 5 koloni di Kabupaten Pesawaran berkisar antara 400bp sampai dengan 500bp.

Penggunaan elektroforesis gel agarosa sebagai metode uji kualitatif telah banyak dilakukan. Sarma *et al.*, (2014) menggunakan metode ini sebagai analisis kualitatif untuk melihat keberhasilan keberadaan DNA genom dan DNA hasil purifikasi dari *Nitella mirabilis* dengan menggunakan *marker* RAPD. Selain itu, metode ini juga dilakukan sebagai sarana uji kualitatif untuk melihat keberhasilan analisis protein dan peptida pada produk susu (Strickland *et al.*, 2001). Oleh karena itu, metode ini terus dikembangkan hingga tercipta modifikasi metode berupa elektroforesis berbasis *microfluidic paper analytic device* (μ PAD) di

Jerman (Heinsohn *et al.*, 2022).

Amplifikasi DNA

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel individu lebah tanpa sengat dari 5 koloni yang berbeda (p1, p2, p3, p4, dan p5) mempunyai ukuran gen parsial 16S rRNA sebesar 400bp sampai dengan 500bp (Gambar 2). Apabila dirujuk dari laman genbank (*National Center for Biotechnology Information/NCBI*), ukuran gen 16S rRNA jenis lebah tanpa sengat berkisar antara 445bp sampai dengan 534bp (Tabel 1).

Tabel 1. Ukuran gen 16S rRNA jenis lebah tanpa sengat pada laman NCBI

No	Jenis lebah tanpa sengat	Ukuran gen 16S rRNA	Alesi
1	<i>Heterotrigona itama</i>	529	KU57176.1
2	<i>Heterotrigona erythrogaster</i>	528	DQ790395.1
3	<i>Sundatrigona moorei</i>	527	DQ790402.1
4	<i>Platydotrigona hobbyi</i>	527	DQ790401.1
5	<i>Lepidotrigona ventralis</i>	530	DQ790400.1
6	<i>Lepidotrigona terminata</i>	456	MG543810.1
7	<i>Geniotrigona thoracica</i>	504	KX113625.1
8	<i>Geniotrigona incisa</i>	530	DQ790392.1
9	<i>Tetragonula drescheri</i>	445	MH453963.1
10	<i>Tetragonula minangkabau</i>	446	MH453962.1
11	<i>Tetragonula laeviceps</i>	528	KU571748.1
12	<i>Tetragonula sapiens</i>	528	DQ790427.1
13	<i>Tetragonula sirindhornae</i>	528	DQ790431.1
14	<i>Tetragonula geissieri</i>	528	DQ790426.1
15	<i>Tetragonula carnonaria</i>	525	MN659458.1
16	<i>Tetragonula melanocephala</i>	528	DQ790434.1

Penggunaan gen parsial 16S rRNA dalam analisis keanekaragaman hayati pada lebah tanpa sengat telah digunakan secara luas. Wang *et al.*

(2021) menggunakannya dalam analisis keanekaragaman *Lepidotrigona flavibasis* di Lincang, Yunnan, China. Selain itu, Thummajitsakul *et al.* (2013) mempublikasikan hasil urutan beberapa gen mitokondria pada jenis *Tetragonula pagdeni*, termasuk di dalamnya gen ATPase, COI, COII, COIII, Cytb, dan 16S rRNA. Penelitian keanekaragaman lebah tanpa sengat dengan menggunakan gen 16S rRNA juga telah dilaksanakan di Indonesia, yaitu pada Taman Nasional Halimun Salak, Jawa Barat (Pratama *et al.*, 2023), Taman Nasional Baluran, Jawa Timur (Rachmawati *et al.*, 2022), Kabupaten Ciamis, Jawa Barat (Purwanto dan Trianto, 2021), Yogyakarta (Trianto dan Purwanto, 2020a), dan Kota Sawahlunto, Sumatera Barat (Herwina *et al.*, 2022).

Penelitian ini menjadi data tambahan akan data analisis molekuler pada lebah tanpa sengat di Indonesia. Data yang komprehensif ini akan saling melengkapi untuk menganalisis keragaman lebah tanpa sengat. Selain itu, data ini dapat memutakhirkan data catatan jumlah jenis lebah tanpa sengat yang saat ini tercatat ada 52 jenis di Indonesia, yang terdiri dari 27 jenis di Sumatera, 13 jenis di Jawa, 1 jenis di Nusa Tenggara, 34 jenis di Kalimantan, 8 jenis di Sulawesi, 1 jenis di Bali, 4 jenis di Maluku, dan 12 jenis di Papua (Trianto *et al.*, 2023).

Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah 5 sampel individu lebah tanpa sengat yang didapatkan dari eksplorasi di Pesawaran memiliki ukuran gen parsial 16S rRNA sebesar 400bp sampai dengan 500bp yang sesuai dengan data perbandingan yang terdapat pada *genbank*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Lampung (Unila) atas hibah penelitian dengan Kontrak Nomor 724/UN26.21/PN/2023. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Balai Veteriner Lampung, khususnya Laboratorium Bioteknologi.

Referensi

- Arias, M.C., Brito, R.M., Francisco, F.O., Moretto, G., de Oliveira, F.F., Silvestre, D., Sheppard, W.S. (2006). Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie* 37(2) 259 – 274. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2006021>
- Augusteyn, R.C., Vrensen, G., Willekens, B. (2008). The effect of paraformaldehyde fixation and PBS storage on the water content of the human lens. *Molecular Vision: Biology and Genetics in Vision Research*, 14: 90 – 94.
- Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Hasil Hutan Bukan Kayu. (2018). *Panduan Singkat Budidaya dan Breeding Lebah Trigona spp.* Lombok: Litbang Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan.
- Fatoni, A. 2008. *Pengaruh Propolis Trigona spp. Asal Bukittinggi terhadap Beberapa Bakteri Usus Halus Sapi dan Penelusuran Komponen Aktifnya.* [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Galtier, N., Nabholz B., Glémin S., and Hurst G. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 18: 4541 – 4550. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x)
- Gissi, C., Iannelli F., and Pesole G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity (Edinb)*. 101: 301 – 320. DOI: [10.1038/hdy.2008.62](https://doi.org/10.1038/hdy.2008.62)
- Hage, G.M., Selan, Y.N., Amalo, F. (2014). Studi Anatomi Lampung Kelelawar Buah (*Pteropus vampyrus*) dengan Pewarnaan Histokimia *Periodic Acid Schiff* (PAS). *Jurnal Kajian Veteriner*, 2(2): 193 – 201. DOI: <https://doi.org/10.35508/jkv.v2i2.1004>
- Harahap, A.S. (2017). Ujia Kualitas dan Kuantitas DNA Beberapa Populasi Pohon Kapur Sumatera. *Journal of Animal Science and Agronomi Panca Budi* 2(2): 1 – 6.
- Heinsohn, N.K., Niedl, R.R., Anielski, A., Lisdat, F., Beta, C. (2022). Elektrophoretic μ PAD for Purification and Analysis of

- DNA Samples. *Biosensors*, 12(2): 62. DOI: <https://doi.org/10.3390/bios12020062>
- Herwina, H., Salmah, S., Jasmi, Yaherwandi, Mairawita, Janra, M.N., Rusdimansyah, Christy, B.Y., Sari, D.A., Putri, G. (2021). West Sumatran *Stingless Bees* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): What can be told from its Local Distribution. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 757 (2021) 01208. DOI: [10.1088/1755-1315/757/1/012084](https://doi.org/10.1088/1755-1315/757/1/012084).
- Herwina, H., Janra, M.N., Salmah, S., Mairawita, Jasmi. (2022). Analisis Cepat terhadap Budidaya Galo-Galo (Apidae: Meliponini) di Desa Suntur, Kecamatan Barangin, Kota Sawahlunto. *Aksiologi: Jurnal Pengabdian kepada Masyarakat*, 6(3): 388 – 399. DOI: <https://doi.org/10.30651/aks.v6i3.5168>.
- Juli. (2021). Budi Daya Madu Trigona di Lampung Timur: Primadona dalam Masa Pandemi COVID-19.
- Kelly, N., Farisya, M.S.N., Kumara, T.K., Marcela, P. (2014). Species diversity and external nest characteristics of stingless bees in meliponiculture. *Per. J. Trop. Agric. Sc.* 37(3): 293 – 298.
- Lamerkabel, J.S.A., Siahaya, V.G., Saepuloh, W., Lsatriyanto, A., Junus, M., Erwan, Batoro, J., Jaya, F., Masyithoh, D. (2021). Karakteristik Morfologi dan Morfometrik Lebah Madu Tak Bersengat (Apidae; Melliponinae) pada Koloni di Daerah Pesisir Pulau Ambon. *Jurnal Budidaya Pertanian*, 17(1): 28 – 35. DOI: [10.30598/jbdp.2021.17.1.28](https://doi.org/10.30598/jbdp.2021.17.1.28)
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C., Kim, Y.H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiment*. DOI: [10.3791/3923](https://doi.org/10.3791/3923)
- Permatasari, N., Priyambodo, Sari, R.P.K., Fauziah, L.K. (2023). Pelatihan Penambahan Tanaman Sumber Nektar pada Masyarakat Pembudidaya Lebah Tanpa Sengat di Desa Harapan Jaya, Kecamatan Way Ratai, Kabupaten Pesawaran. *Jurnal Pengabdian Dharma Wacana*, 3(4): 379 – 385. DOI: <https://doi.org/10.37295/jpdw.v3i4.379>
- Perry, C., Chung, J.Y., Ylaya, K., Choi, C.H., Simpson, A., Matsumoto, K.T., Smith, W.A., Hewitt, S.M. (2016). A Buffered Alcohol-Based Fixative for Histomorphologic and Molecular Applications. *Journal of Histochemistry*, 64(7): 425 – 440. DOI: [10.1369/0022155416649579](https://doi.org/10.1369/0022155416649579)
- Pesaresi, M., Buscemi, L., Alessandrini, F., Cecati, M., Tagliabracchi, A. (2003). Qualitative and quantitative analysis of DNA recovered from fingerprints. *International Congress Series* 1239: 947 – 951.
- Prasetyo dan Aryono. (2020). Berkunjung ke *Suhita Bee Farm* di Bandar Lampung.
- Pratama, M.N., Agus, A., Umami, N., Agussalim, Purwanto, H. (2023). Morphometric and molecular identification, domestication, and potentials of stingless bees (Apidae: Meliponini) in Mount Halimun Salak National Park, West Java, Indonesia. *Biodiversitas* 24(11): 6107 – 6118. DOI: [10.13057/biodiv/d241132](https://doi.org/10.13057/biodiv/d241132)
- Priyambodo, Putri, C.R.P., Rustiati, E.L., Kurniawati, Y., Zulkarnain, D., Pratiwi, D.N., Arsan, Z., Giyono, G., Mustikawati, G., Pertiwi, B.R., Sukartmoko, S., Srihanto, E.A., Saswiyanti, E. (2023). Amplification of The GAPDH Gene from The Urine eDNA of Sumatran Rhino in Sumatran Rhino Sanctuary, Way Kambas National Park. *Jurnal Biologi Tropis*, 23(3): 110 – 114. DOI: [10.29303/jbt.v23i3.4989](https://doi.org/10.29303/jbt.v23i3.4989)
- Purwanto, H., dan Trianto, M. Species Description, Morphometric Measurement, and Molecular Identification of Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in Meliponiculture Industry in West Java Province, Indonesia. *Serangga* 2021, 26(1): 13-33.
- Rachmawati, R.D., Agus, A., Umami, N., Agussalim, Purwanto, H. (2022). Diversity, distribution, and nest characteristics of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) in Baluran National Park, East Java, Indonesia. *Biodiversitas* 23 (8): 3890 – 3901. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210633>
- Rustiati, E.L., Priyambodo, Novianasari, T.,

- Pratiwi, D.N., Srihanto, E.A., Angeliya, L. (2019). Comparative Study on DNA Extraction's Qualitative Anaysis of Captive Sumatran Elephant in Elephant Training Center, Way Kambas National Park. *Journal of Physics: Conference Series* 1338 012029. DOI: [10.1088/1742-6596/1338/1/012029](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1338/1/012029)
- Sambrook, J., dan Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. New. York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sari, P.J. (2015). Studi Awal: Histoteknik Perfusi PBS-Formalin dan Gambaran Histologi Organ Hepar, Pankreas, dan Ginjal Tikus Strain Sprague Dawley. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Sarma, B., Rout, J., Bhatnagar, K. (2014). *Nitella mirabilis* from Assam: Morphology and Molecular Characterization using RAPD markers. *VEGETOS* 27(1): 97 – 102.
- Sidik, M., Lestari, I.A., Sa'uddah, L.D., Yani, A.A., Priyambodo (a). 2022. Karakterisasi Beebread dari Tujuh Spesies Lebah Tanpa Sengat (*Stingless Bee*) Berdasarkan Keanekaragaman Pollen yang Dikumpulkannya. *Bio Sains: Jurnal Ilmiah Biologi*, 2 (1): 30 – 38. DOI: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.23564679>
- Sidik, M., Lestari, I.A., Sa'uddah, L.D., Yani, A.A., Priyambodo (b). 2022. Pelatihan Budidaya Lebah Tanpa Sengat di Desa Harapan Jaya Kecamatan Way Ratai Kabupaten Pesawaran. *MITRAWARGA: Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 1(1): 11 – 16. DOI: <https://doi.org/10.23960/jmw.v1i1.9>
- Slaa, E.J., Chaves, L.A.S., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37(2): 293 – 315. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2006022>.
- Stricland, M., Johnson, M.E., Broandbent, J.R. (2001). Qualitative and quantitative analysis of proteins and peptides in milk products by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 22(8). DOI: [10.1002/1522-2683\(200105\)22:8<1510::AID-ELPS1510>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200105)22:8<1510::AID-ELPS1510>3.0.CO;2-4).
- Suhandy, D., Yulia, M., Kusumiyati. 2022. Rapid authentication of stingless bees (*Heterotrigona itama*) honey by UV spectroscopy and hierarchical cluster analysis. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 1024 (2022) 012064. DOI: [10.1088/1755-1315/1024/1/012064](https://doi.org/10.1088/1755-1315/1024/1/012064).
- Thummajitsakul, S., Silprasit, K., Klinbunga, S., Sittipraneed, S. (2013). The partial mitochondrial sequence of the Old World stingless bee, *Tetragonula pagdeni*. *J. Genet.* 92, 299–303.
- Trianto, M., dan Purwanto, H. (2020a). Morphological characteristics and morphometrics of Stingless Bess (Hymenoptera: Meliponini) in Yogyakarta, Indonesia. *Biodiversitas*, 21(6): 2619 – 2628. DOI: [10.13057/biodiv/d210633](https://doi.org/10.13057/biodiv/d210633).
- Trianto, M., dan Purwanto, H. (2020b). Molecular Phylogeny of Stingless Bees in the Special Region of Yogyakarta Revealed Using Partial 16S rRNA Mitochondrial Gene. *Buletin Peternakan* 44(4): 186 – 193. DOI: [10.21059/buletinpeternak.v44i4.55539](https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v44i4.55539).
- Trianto, M., Arisuryanti, T., Purwanto, H., Ubaidillah, R. (2023). Updated Species Check-list of the Indonesian Stingless Bees (Hymenoptera, Apidae, Apinae, Meliponini). *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 8(2): 1 – 24. DOI: [10.22146/jtbb.77160](https://doi.org/10.22146/jtbb.77160)
- Wang, C., Zhao, M., Wang, S., Xu, H., Yang, Y., Liu, L., Feng, Y. (2021). The Complete Mitochondrial Genome of *Lepidotrigona flavibasis* (Hymenoptera: Meliponini) and High Gene Rearrangement in *Lepidotrigona* Mitogenomes. *Journal of Insect Science* 21(3): 10 DOI: [10.1093/jisesa/ieab038](https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab038)
- Wijayanti, G.E., Setyawan, P., Kurniawati, D.I. (2017). A simple paraffin embedded protocol for fish egg, embryo, and larvae. *Scripta Biologica*, 4(2): 85 – 89. DOI: <https://doi.org/10.20884/1.SB.2017.4.2.420>.