

Penilaian sumber makanan *Heterotrigona itama* di Malaysia

(Assessment of *Heterotrigona itama* food source in Malaysia)

Fahimee Jaapar, Aqilah Sakinah Badrulisham, Zulidzham Mohd Sani, Nurul Farisa Reward, Muzammil Nizar, Badrul Munir Md Zain dan Salmah Yaakop

Pengenalan

Lebah kelulut dikenali sebagai agen pendebungaan bagi kebanyakan spesies tumbuhan di hutan dan ekosistem pertanian. Sebagai contoh, spesies lebah kelulut merupakan agen pendebungaan bagi manggis (*Garcinia mangostana*), asam pahong (*Bacaurea lanceolata*) dan belimbing (*Averrhoa bilimbi*). Daripada keseluruhan 500 spesies lebah kelulut yang direkodkan di seluruh dunia, kira-kira 45 spesies dijumpai di Malaysia. *Heterotrigona itama* Cockerell, 1918 adalah spesies kebanyakan ekosistem. *H. itama* telah menjadi spesies pilihan domestik dalam industri meliponikultur tempatan dan juga di negara-negara jiran. Sehingga kini, 50,000 koloni daripada *H. itama* telah dipelihara untuk pengeluaran madu di Malaysia dan meningkat setiap tahun. *H. itama* mampu meneruskan pengeluaran madu kerana adanya interaksi eksklusif dan koevolusi antara lebah kelulut dan spesies angiosperma pokok berbunga. Dalam industri meliponikultur, penternak lebih berminat untuk menilai kualiti madu yang kebiasaannya ditentukan oleh sumber nektar tumbuhan atau debunga yang dimakan oleh lebah kelulut. Dalam hal ini, spesies tumbuhan berbunga yang bagus digunakan sebagai sumber makanan utama lebah kelulut bagi pembiakan in situ dan juga untuk pemuliharaan ex situ.

Kajian terdahulu mendapati *H. itama* biasanya mengumpulkan debunga, nektar dan resin ketika mencari makanan. Walau bagaimanapun, dalam beberapa kes, spesies lebah juga mengumpulkan dan mendapatkan nutrien atau garam daripada bangkai haiwan. Oleh itu, untuk memanfaatkan spesies ini dalam sistem struktur berjaring, sumber makanan yang menjadi keperluan kepada *H. itama* perlu difikirkan. Selain menjadi agen pendebunga, secara tidak langsung koloni *H. itama* dapat berkoloni dalam masa yang lama serta menghasilkan madu.

Penerapan barkoding DNA telah menjadi pendekatan terkini dalam bioteknologi yang menunjukkan manfaat untuk kesihatan manusia dan kelestarian marin. Penerapan molekul DNA juga telah menyelesaikan masalah yang berkaitan dengan industri meliponikultur di seluruh dunia seperti mengakses sebatian madu dalam beberapa variasi madu, pengenalan lebah kelulut melalui DNA metabar dan identifikasi spesies tumbuhan sebagai sumber makanan untuk lebah kelulut.

Maklumat mengenai spesies tumbuhan yang ditenak atau dijadikan makanan untuk *H. itama* tidak pernah dikaji secara meluas walaupun penternakan *H. itama* dalam industri meliponikultur khususnya dalam pengeluaran madu. Walau bagaimanapun, terdapat banyak maklumat mengenai koleksi debunga *H. itama*, namun terdapat persoalan yang masih belum dapat dijelaskan iaitu sama ada lebah memakan debunga atau hanya menyimpannya di dalam *pollen pot*. Dalam hal ini, analisis pengkodan metabar dengan menggunakan penanda trnL dalam diet *H. itama* sangat penting dan merupakan objektif utama kajian ini. Adalah penting bahawa tumbuhan berbunga di habitat semula jadi atau habitat liar yang dimakan oleh *H. itama* berserta koloni dipelihara di ladang atau di kebun untuk pembiakan berterusan. Ini juga akan memastikan kualiti pengeluaran madu yang terbaik.

Kaedah kajian

Pensampelan lebah kelulut

Sejumlah 36 individu *Heterotrigona itama* dikumpulkan daripada 12 lokasi meliponikultur di seluruh Malaysia (*Jadual 1* dan *Rajah 1*) dengan tiga individu dikumpulkan daripada tiga koloni dari setiap kawasan.

Pengekstrakan DNA

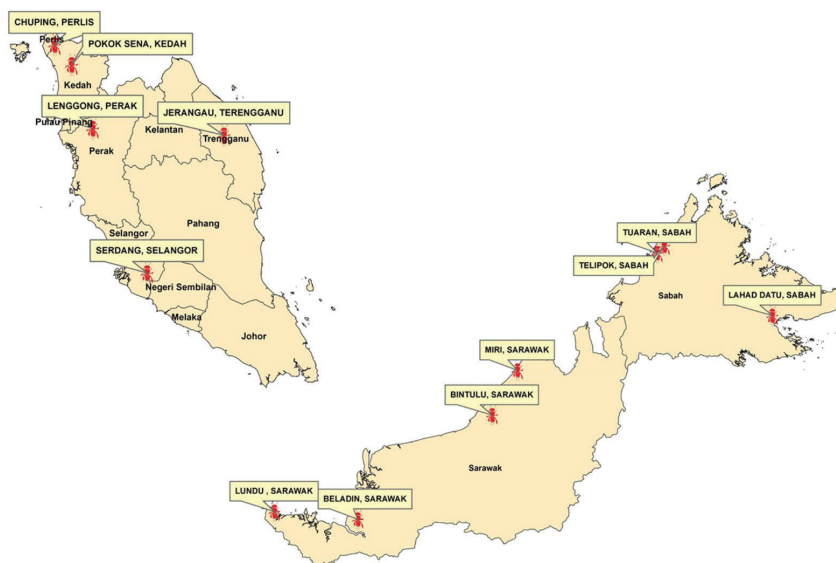
Pengekstrakan DNA merujuk kepada kaedah yang digunakan oleh Fahimee et al. (2021).

Analisis data

Bacaan 'Paired-end' pertama kali mempunyai penyesuai penjujukan dan bacaan berkualiti rendah dikeluarkan menggunakan *BBDuk* daripada pakej *BBTools*. Selepas ini, jujukan hadapan dan terbalik digabungkan menggunakan *USEARCH v11.0.667*. Semua penjujukan yang lebih pendek daripada 150 bp atau lebih panjang daripada 600 bp dikeluarkan daripada pemprosesan hiliran. Bacaan kemudian diselaraskan dengan urutan trnL berdasarkan pangkalan data NCBI. Setelah langkah penilaian kualiti ini, bacaan dikelompokkan de novo menjadi unit taksonomi operasi (OTU) pada 97% kesamaan menggunakan *UPARSE v11.0.667*; OTU yang jarang berlaku dengan bacaan kurang daripada 2 (*doubleton*), kemudian telah dihapuskan daripada pemprosesan hiliran. Satu jujukan daripada setiap OTU dipilih secara rawak dan *Pynast* digunakan untuk membina filogenetik untuk dibandingkan dengan pangkalan data NCBI. Kemudian, penerapan taksonomi OTU dicapai dengan menggunakan *QIIME V1.9.1* Dendrogram filogenetik pada peringkat spesies menggunakan jarak Bray-Curtis dengan 1000 butstrap untuk menentukan hubungan antara lokaliti *H. itama* menggunakan Perisian Statistik Paleontologi (PAST 3). Analisis statistik lain dilakukan dalam R V3.6.1.

Jadual 1. Senarai sampel yang digunakan untuk analisis pengkodan metabar

Kod	Lokasi	Grid	Ekosistem
Sabah TE	Borneo. Sabah: Lahad Datu	5.01248, 118.0970218	Ladang tanaman bersebelahan dengan hutan sekunder
Terengganu	Semenanjung Malaysia. Terengganu: Jerangau	5.0655177, 102.8652274	Ladang tanaman bersebelahan dengan hutan sekunder
Sabah Telipok	Borneo. Sabah: Telipok	6.1732126, 116.2984958	Ladang tanaman bersebelahan dengan hutan bukit
Perak	Semenanjung Malaysia. Perak: Lenggong	5.1662481, 100.8801384	Ladang tanaman
Kedah	Semenanjung Malaysia. Kedah: Pokok Sena	6.126510, 100.559629	Ladang tanaman
Sarawak Kuching	Borneo. Sarawak: Lundu	1.758078, 109.806310	Ladang tanaman bersebelahan dengan kawasan pesisir
Pool Sarawak Bintulu	Borneo. Sarawak: MARDI Bintulu	3.358613, 113.430816	Kawasan ladang berdekatan dengan ladang kelapa sawit
Perlis	Semenanjung Malaysia. Perlis: Chuping	6.427755, 100.304074	Ladang tanaman
Sarawak Beladin	Borneo. Sarawak: Beladin	1.6273364, 111.1958089	Ladang tanaman
	Semenanjung Malaysia. Selangor: MARDI Serdang	2.990892, 101.702434	Ladang tanaman
Tuaran Sabah	Borneo. Sabah: Tuaran	6.0523621, 116.1788793	Kawasan ladang berdekatan dengan sungai
Sarawak Miri	Borneo. Sarawak: Miri	4.102966, 113.853467	Kawasan ladang berdekatan dengan kawasan pesisir



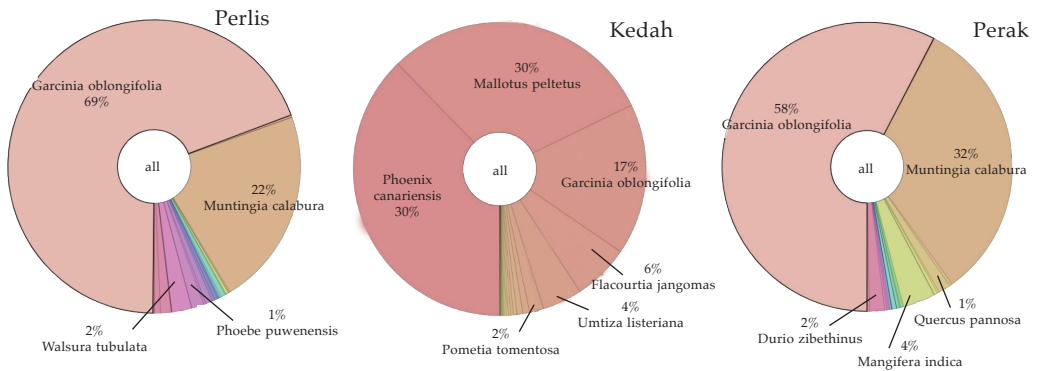
Rajah 1. Lokaliti pensampelan daripada *Heterotriona itama* di seluruh Malaysia

Spesies tumbuhan sebagai diet *H. itama*

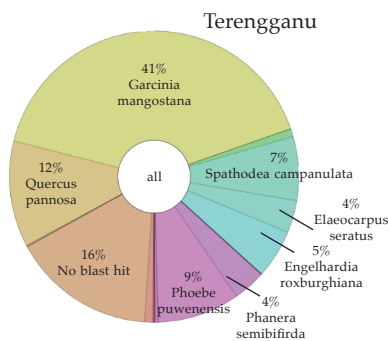
Spesies tumbuhan yang merekodkan peratusan tertinggi bagi kawasan negeri Perlis ialah *Garcinia oblongifolia* (69%), *Muntingia calabura* (22%) dan paling rendah ialah *Walsura tubulata* (2%), *Durio zibethinus* (1%) dan *Phoebe puwenensis* (1%). Negeri Kedah pula merekodkan *Phoenix canariensis* (38%) yang tertinggi diikuti *Mallotus peltatus* (30%) dan *Garcinia oblongifolia* (17%). Spesies paling rendah yang direkodkan ialah *Flacourtia jangomas* (6%), *Umtiza listeriana* (4%) dan *Pometia tomentosa* (2%). Seterusnya, *Garcinia oblongifolia* (58%) dan *Muntingia calabura* (32%) ialah spesies yang tertinggi bagi kawasan negeri Perak dan tiga spesies lagi mencatatkan peratusan terendah iaitu *Mangifera indica* (4%), *Durio zibethinus* (2%) dan *Quercus pannosa* (1%) (Rajah 2).

Seterusnya, kawasan timur Malaysia iaitu Terengganu mencatatkan spesies tertinggi iaitu *Garcinia mangostana* (41%) diikuti *Quercus pannosa* (12%) manakala spesies tumbuhan yang terendah dicatatkan ialah *Phoebe puwenensis* (9%), *Spathodea campanulata* (7%), *Engelhardia roxburghiana* (5%) dan 1% bagi spesies *Phanera semibifida* dan *Elaeocarpus serratus* (Rajah 3). Wilayah selatan iaitu negeri Selangor telah merekodkan spesies tumbuhan paling tinggi iaitu *Phoenix canariensis* (87%) dan tiga spesies dengan peratusan paling rendah iaitu 3% bagi *Phoebe puwenensis* (3%), *Garcinia mangostana* (3%) dan *Brassica oleracea* (2%) (Rajah 4).

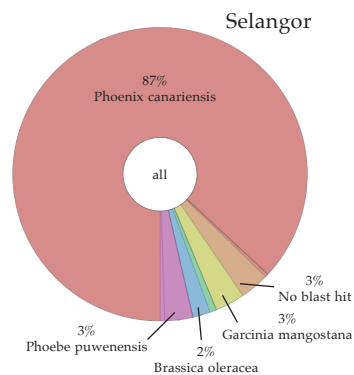
Bagi kawasan kajian Borneo pula iaitu Sarawak (Rajah 5) sebanyak 80% tidak dapat diketahui bagi kawasan Bintulu dan spesies lain yang direkodkan terendah ialah *Annona reticulata* (7%), *Pinus squamata* (4%), 2% masing-masing bagi spesies *Macaranga tanarius*, *Quercus pannosa* dan *Engelhardia roxburghiana*



Rajah 2. Peratusan spesies tumbuhan di Semenanjung Utara Malaysia



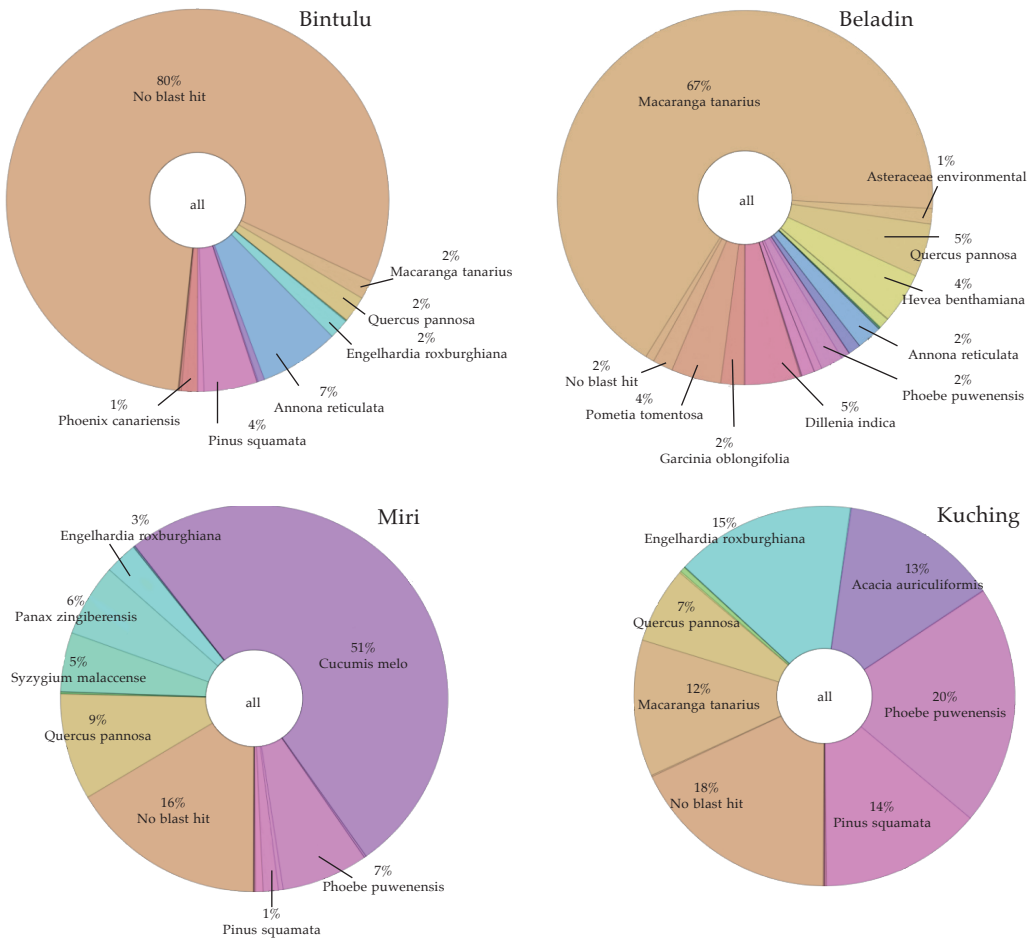
Rajah 3. Peratusan spesies tumbuhan di wilayah timur Semenanjung Malaysia



Rajah 4. Peratusan spesies tumbuhan di wilayah selatan Semenanjung Malaysia

dan akhir sekali *Phoenix canariensis* (1%). Manakala bagi kawasan Beladin, spesies *Macaranga tanarius* mencatatkan yang tertinggi iaitu sebanyak 67% dan spesies lain terendah seperti 5% spesies *Dillenia indica* dan *Quercus pannosa*, 4% spesies *Hevea benthamiana* dan *Pometia tomentosa*, 2% iaitu spesies *Annona reticulata*, *Phoebe puwenensis* dan *Garcinia oblongifolia* serta 1% bagi *Asteraceae environmental*. Daerah Miri merekodkan peratusan spesies tertinggi sebanyak 51% bagi *Cucumis melo* dan spesies terendah ialah *Quercus pannosa* (9%), *Phoebe puwenensis* (7%), *Panax zingiberensis* (6%), *Syzygium malaccense* (5%), *Engelhardia roxburghiana* (3%) dan *Pinus squamata* (1%). Seterusnya daerah Kuching mencatatkan spesies tertinggi iaitu *Phoebe puwenensis* (20%) diikuti *Engelhardia roxburghiana* (15%), *Pinus squamata* (14%), *Acacia auriculiformis* (13%) dan *Macaranga tanarius* (12%). Spesies *Quercus pannosa* pula adalah yang terendah dicatatkan iaitu sebanyak 7%.

Kajian selanjutnya di negeri Sabah mendapati spesies tertinggi ialah *Phoebe puwenensis* (25%). Spesies berikutnya ialah *Actinidia valvata* (8%), diikuti 7% bagi spesies *Annona reticulata*, *Quercus pannosa* dan *Muntingia calabura*. Seterusnya 6% spesies *Engelhardia roxburghiana*, *Durio zibethinus* dan *Asteraceae environmental* diikuti oleh *Macaranga tanarius* (5%) dan *Pinus squamata* (5%).



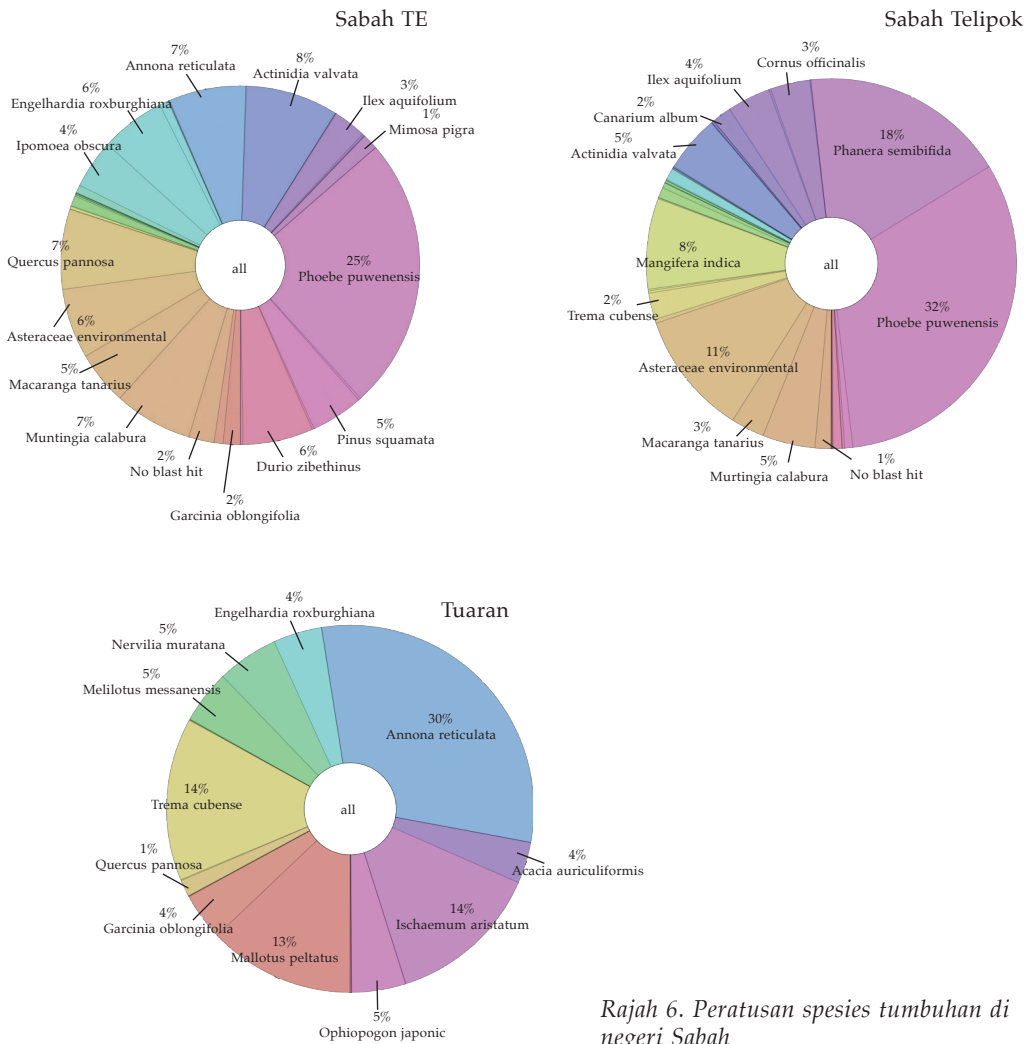
Rajah 5. Peratusan spesies tumbuhan di negeri Sarawak

Spesies yang mencatatkan peratus yang paling rendah ialah *Ipomoea obscura* (4%), *Ilex aquaifolium* (3%), *Garcinia oblongifolia* (2%) dan 1% bagi *Mimosa pigra*. Tambahan pula, Sabah Telipok mencatatkan spesies *Phoebe puwenensis* yang tertinggi iaitu 32% diikuti oleh *Phanera semibifida* (18%), *Asteraceae environmental* (11%), pokok mangga (*Mangifera indica*, 8%), *Actinidia valvata* (5%) dan *Muntingia calabura* (5%). Spesies lain pula merekodkan peratusan yang paling rendah iaitu *Ilex aquaifolium* (4%), *Macaranga tanarius* (3%), *Cornus officinalis* (3%), *Canarium album* (2%) dan *Trema cubense* (2%). Seterusnya wilayah tengah Sabah iaitu Tuaran yang merekodkan peratusan tertinggi iaitu *Annona reticulata* (30%) diikuti oleh *Ischaemum aristatum* (14%), *Trema cubense* (14%), dan *Mallotus pettatus* (13%). Kemudian catatan terendah pokok makanan yang terdapat dalam DNA lebah kelulut ialah 5% bagi spesies *Nervilia muratana*, *Melllatus messanensis* dan *Ophiopogon japonica*, diikuti oleh 4% spesies *Engelhardia roxburghiana*, *Garcinia oblongifolia* dan *Acacia auriculiformis* serta 1% spesies *Quercus pannosa*.

Perbincangan

Maklumat pemakanan lebah kelulut iaitu spesies pokok yang menjadi sumber utama diet lebah kelulut telah dapat disimpulkan melalui kajian ini menggunakan kaedah analisis pengkodan metabar. Melalui pengkodan metabar ini, hasil kajian menunjukkan bahawa kaedah ini lebih baik daripada kaedah melissopalinalogi ataupun kaedah asetolisis yang mana hasil yang diperolehi lebih tinggi. Kloroplas dan nukleus kod bar boleh diaplikasi daripada debunga. Oleh yang demikian pengkodan metabar akan memberi hasil yang lebih baik dan cepat untuk mengenal pasti sumber makanan *H. itama* daripada spesies tumbuhan. Kajian pada tahun 2015 juga telah menemui 59 spesies tumbuhan di kawasan ekosistem pulau di Tasik Kenyir dengan kebanyakannya ialah buahan nadir menggunakan asetolisis dan 140 spesies tumbuhan tidak dapat dikenal pasti. Situasi ini memberikan gambaran bahawa kaedah asetolisis mempunyai kekurangan berbanding dengan pengkodan metabar. Hasil kajian ini, memberikan 262 spesies tumbuhan daripada 70 famili dan boleh disimpulkan bahawa kelakuan foraj *H. itama* mempunyai kepelbagaian yang luas. Selain itu, hasil kajian ini juga menunjukkan bahawa kehadiran spesies tumbuhan yang tinggi berbanding dengan kaedah asetolisis. Lebih menarik, famili tumbuhan melata seperti Vitaceae dan famili tumbuhan kanopi atas seperti Bombaceae telah direkodkan sebagai salah satu sumber diet bagi *H. itama* menggunakan kaedah pengkodan metabar. Lebih menarik lagi, spesies yang jarang dijumpai di kawasan hutan sekunder iaitu *Pterisanthes stonei* turut menjadi salah satu diet bagi *H. itama*.

Bagi mendapatkan hasil diet yang holistik, pensampelan *H. itama* telah disampel dan dikumpulkan dari pelbagai lokasi di seluruh Malaysia (Semenanjung Malaysia dan Borneo). Tambahan lagi, kawasan pensampelan yang dipilih adalah kawasan penternakan *H. itama* yang berbeza ekosistem. Usaha ini adalah untuk memastikan data yang diperolehi lebih jitu oleh kerana kelakuan foraj *H. itama* yang terhad. Selain itu, kelakuan foraj yang aktif juga bergantung kepada masa dan tempoh tertentu sahaja. Dalam satu terbangun keluar mencari makanan, kebiasaannya *H. itama* akan mengumpul nektar bersama debunga ataupun nektar bersama resin. Debunga dan resin yang dikumpulkan akan dipindahkan ke kaki belakang sebelum dibawa balik ke sarang. Tidak dapat dipastikan bahawa debunga yang diambil oleh *H. itama* itu dimakan oleh lebah pekerja atau hanya dibawa balik sahaja. Oleh yang demikian, kaedah pengkodan metabar menggunakan primer trnL menjawab persoalan dengan memberikan spesies tumbuhan yang sebenarnya diambil oleh *H. itama* sebagai sumber tenaga. Hasil yang diterjemahkan ini menjadi satu panduan dalam pengurusan bagi proses domestikasi *H. itama* dalam struktur berjaring bagi proses pendebungaan. Tambahan lagi, data ini boleh diaplikasi dalam meliponikultur bagi meningkatkan hasil dan kualiti madu.



Rajah 6. Peratusan spesies tumbuhan di negeri Sabah

Kesimpulan

Maklumat taksonomi (filum, famili, genus dan spesies,) mengenai spesies tumbuhan yang dimakan oleh *H. itama* dibincangkan dalam kajian ini melalui analisis pengkodan metabar yang diperoleh daripada DNA *H. itama*. Spesies tumbuhan yang cepat tumbuh bawah filum Spermatophyta dan Magnoliophyta seperti *Momordica charantia*, *Melastoma* sp. dan *Cucumis sativa* yang menghasilkan bunga dan nektar yang banyak disarankan untuk ditanam dalam sistem penanaman monokultur untuk domestikasi di dalam struktur berjaring. Oleh itu, spesies tumbuhan sebagai sumber makanan yang diperoleh daripada analisis pengkodan metabar dalam kajian ini dianggap sebagai spesies utama dalam proses melestarikan spesies *H. itama* untuk pengeluaran madu yang berkualiti dalam industri meliponikultur.

Bibliografi

- Absy, M.L., Rech, A.R. dan Ferreira, M.G. (2018). Pollen collected by stingless bees: A contribution to understanding Amazonian bio-diversity. Dalam: *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*, (Vit, P., Pedro, S. dan Roubik, D., ed.), m.s. 29 – 46. Springer: Berlin/ Heidelberg, Germany
- Afik, O., Delaplane, K.S., Shafir, S., Moo-Valle, H., Javier, J. dan Quezada-Euán, J.J. (2014). Nectar minerals as regulators of flower visitation in stingless bees and nectar hoarding wasps. *J. Chem. Ecol.* 40: 476 – 483
- Badrulhisham, N.S.R., Ab Hamid, S.N.P., Ismail, M.A.H., Yong, Y.K., Muhamad Zakuan, N., Harith, H.H., Saidi, H.I. dan Nurdin, A. (2020). Harvested locations influence the total phenolic content, antioxidant levels, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of stingless bee honey. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 23: 950 – 956. Diperoleh dari doi:<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.07.015>
- Boongird, S. dan Michener, C.D. (2010). Pollen and propolis collecting by male stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 83: 47 – 50
- Fahimee, J., Badrulisham, A.S., Zulidzham, M.S., Reward, N.F., Muzammil, N., Jajuli, R., Md-Zain, B.M. dan Yaakop, S. (2021) Metabarcoding in diet assessment of *Heterotrigona itama* based on trnL marker towards domestication program. *Insects*. Diperoleh dari <https://dx.doi.org/10.3390/insects12030205>
- Ghazi, R., Zulqurnain, N. dan Azmi, W. (2018). *Melittopalynological studies of stingless bees from the East Coast of Peninsular Malaysia*. m.s. 77 – 88
- Hawkins, J., de Vere, N., Griffith, A., Ford, C.R., Allainguillaume, J., Hegarty, M.J., Baillie, L. dan Adams-Groom, B. (2015). Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. Diperoleh dari *PloS one* 10: e0134735. doi:10.1371/journal.pone.0134735
- Jaapar, M.F., Halim, M., Mispan, M.R., Jajuli, R., Saranum, M.M., Zainuddin, M.Y., Ghazi, R. dan Abd Ghani, I. (2016). The diversity and abundance of stingless bee (Hymenoptera: Meliponini) in Peninsular Malaysia. *Adv. Environ. Biol.* 10(9): 1 – 8
- Jaapar, M.F., Nasarodin, N.S., Reward, N.F., Jajuli, R. dan Abd Ghani, I. (2019). Notes on resin collected by stingless bees in Taman Tropika Tasik Kenyir, Terengganu, Malaysia. *Serangga* 24: 81 – 89
- Leonhardt, S.D., Dworschak, K., Eltz, T. dan Blüthgen, N. (2007). Foraging loads of stingless bees and utilisation of stored nectar for pollen harvesting. *Apidologie* 38: 125 – 135. Diperoleh dari doi:10.1051/apido:2006059

- Tanaka, K., Nozaki, A., Nakadai, H., Shiwa, Y. dan Shimizu-Kadota, M. (2020). Using pollen DNA metabarcoding to profile nectar sources of urban beekeeping in Kōtō-ku, Tokyo. *BMC Research Notes* 13: 515. Diperoleh dari doi:10.1186/s13104-020-05361-2
- Vit, P., Pedro, S.R. dan Roubik, D. (ed.) (2013). *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees.*; Springer Science and Business Media: New York

Ringkasan

Heterotrigona itama adalah spesies lebah kelulut yang paling banyak dijumpai dalam ekosistem dan dijinakkan untuk industri meliponikultur. Dalam penyelidikan ini, kualiti madu adalah kriteria utama yang akan dinilai dan dihubungkan dengan spesies tumbuhan yang dimakan oleh lebah kelulut sebagai makanan utama mereka. Objektif kajian ini adalah untuk mengkaji diet *H. itama* dari 12 tempat di Malaysia (Borneo dan Semenanjung Malaysia). Hasilnya, lima filum tumbuhan dan 70 famili tumbuhan dengan 260 spesies diperoleh, di mana empat spesies adalah spesies yang banyak dimakan oleh *H. itama*. Penemuan ini sangat berguna untuk pengurusan *H. itama* dalam meliponikultur dan proses domestikasi dalam sistem penanaman mono dan dalam sistem struktur berjaring.

Summary

Heterotrigona itama was abundance in Malaysia and has been domesticated in meliponiculture industry. In this study, the quality of honey was the main criteria evaluated to relate it with plants taken by stingless bees as their primary food source. The main objective of this study was to investigate *H. itama* diet from 12 locations in Malaysia (East and West Malaysia). The result showed that 260 species of plant has been taken by *H. itama*. This species of plant was come from 70 famili and 5 phyla of plant. This finding is very useful for the management of *H. itama* in meliponiculture industry and its domestication in the monoculture and netted structure systems.

Pengarang

Mohd Fahimee Jaapar

Pusat Agrobiodiversiti dan Persekitaran, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: miesre@mardi.gov.my

Aqilah Sakinah Badrulisham

Pusat Sistematik Serangga, Universiti Kebangsaan Malaysia

43600 Bangi, Selangor

Zulidzam Mohd Sani

Pusat Agrobiodiversiti dan Persekitaran, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Nurul Farisa Reward

Pusat Agrobiodiversiti dan Persekitaran, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Muhammad Muzammil Mohamad Nizar

Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Salmah Yaakop (Prof. Madya Dr.)

Pusat Sistematik Serangga, Universiti Kebangsaan Malaysia

43600 Bangi, Selangor