

This file has been cleaned of potential threats.

If you confirm that the file is coming from a trusted source, you can send the following SHA-256 hash value to your admin for the original file.

ad9b30e589cbdc892c9bf99a7d50536efa4bcc9414d05c0798fbece0a2c79935

To view the reconstructed contents, please SCROLL DOWN to next page.

STUDI KERAGAMAN GENETIK *Diospyros rumphii* Bakh DI SULAWESI UTARA BERDASARKAN PENANDA ISOENZIM

*Study on genetic diversity of Diospyros rumphii Bakh
in North Sulawesi based on isoenzym markers*

Julianus Kinho¹, Moh. Na'iem², dan Sapto Indrioko²

¹Balai Penelitian Kehutanan Manado

Jl. Raya Adipura Kima Atas Mapanget, Manado, Indonesia

email: ragilkinho@gmail.com

² Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada

Jl. Agro No. 1, Bulaksumur, Sleman, Yogyakarta, Indonesia

Tanggal diterima: 14 Juni 2016, Tanggal direvisi: 27 Juni 2016, Disetujui terbit: 15 Desember 2016

ABSTRACT

Diospyros rumphii Bakh. is one of tropical commercial wood species grouped in ebony. Ebony is the name of some species of commercial timber from genus of *Diospyros* (Ebenaceae). Seven species of them are commercial wood, which in the trade is known as ebony namely; *D. celebica*, *D. rumphii*, *D. pilosanthera*, *D. lolin*, *D. ebenum*, *D. ferrea* and *D. macrophylla*. Two of seven species ebony have the highest economic values namely; *D. celebica* and *D. rumphii*. Nowadays, the population *D. rumphii* in the nature are decreases due to over harvesting in the past. This study aims to determine genetic diversity of *D. rumphii* within populations, between populations and its relationship. The samples of *D. rumphii* in this study from four populations in North Sulawesi i.e Bitung, Talise, Talaud and Bolaang Mongondow. Genetic diversity was detected by isoenzym markers with seven enzyme i.e Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), Shikimate dehydrogenase (SHD), Esterase (EST), Acid phosphatase (ACP), Diaphorase (DIA), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PG) and Glutamate dehydrogenase (GDH). The results showed that there are three enzyme was detected polymorphisme i.e EST, GOT and GDH. Genetic diversity generated by three enzyme systems who are controlled by 5 loci and 15 alleles. The average percentage of polymorphic loci was 100%. The number of total genetic diversity is 0.64, which are distributed within population 0.59 (91.24%) and between population 0.05 (8.76%). Cluster analysis using Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA) based on Nei standard genetic distance showed three clusters: Bitung and Bolaang Mongondow, Talise, and Talaud.

Keywords: *Diospyros rumphii*, isoenzym, population, genetic diversity

ABSTRAK

Diospyros rumphii Bakh merupakan salah satu jenis kayu komersil tropis yang tergabung dalam kelompok kayu eboni. Kayu eboni adalah sebutan dari beberapa jenis kayu komersil yang berasal dari genus *Diospyros* (Ebenaceae). Tujuh jenis di antaranya merupakan jenis komersil, yang dalam perdagangan dikenal sebagai kayu eboni yaitu *D. celebica*, *D. rumphii*, *D. pilosanthera*, *D. lolin*, *D. ebenum*, *D. ferrea*, dan *D. macrophylla*. Dua jenis yang terpenting di antara tujuh jenis *Diospyros* tersebut adalah *D. celebica* dan *D. rumphii* yang memiliki nilai ekonomi yang lebih tinggi. Pemanenan yang dilakukan secara berlebihan pada masa lalu merupakan salah satu penyebab kelangkaan populasi *D. Rumphii* pada hutan-hutan alam di Sulawesi Utara saat ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik *D. Rumphii* di dalam populasi, antar populasi dan hubungan kekerabatannya. Sampel *D. rumphii* dalam penelitian ini berasal dari empat populasi di Sulawesi Utara yaitu Bitung, Talise, Talaud, dan Bolaang Mongondow. Keragaman genetik dideteksi menggunakan penanda isoenzim dengan tujuh sistem enzim yaitu Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), Shikimate dehydrogenase (SHD), Esterase (EST), Acid phosphatase (ACP), Diaphorase (DIA), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PG) dan Glutamate dehydrogenase (GDH). Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya tiga sistem enzim yang dapat mendeteksi polimorfisme yaitu GOT, EST dan GDH. Keragaman genetik yang dihasilkan oleh ketiga sistem enzim ini dikendalikan oleh 5 lokus dan 15 alel. Rata-rata persentase lokus polimorfis sebesar 100%. Total keragaman genetik (H_T) sebesar 0,64 yang terdistribusi dalam populasi sebesar 0,59 (91,24%) dan antar populasi 0,05 (8,76%). Analisis kluster *Unweighted Pair Group Methode with Arithmetic Mean Analysis* (UPGMA) berdasarkan standar jarak genetik Nei menunjukkan bahwa terbentuk tiga kluster yaitu kluster pertama terdiri dari populasi Bitung dan Bolaang Mongondow, kluster kedua populasi Talise dan kluster ketiga populasi Talaud yang terpisah jauh dari populasi lainnya.

Kata kunci: *Diospyros rumphii*, isoenzim, populasi, keragaman genetik

I. PENDAHULUAN

Kayu eboni merupakan sebutan dari beberapa jenis kayu komersil yang berasal dari genus *Diospyros* yang tergabung dalam famili Ebenaceae. Tujuh jenis *Diospyros* diantaranya merupakan jenis komersil, yang dalam perdagangan kayu dikenal sebagai kayu eboni yaitu: *D. celebica*, *D. rumphii*, *D. pilosanthera*, *D. lolin*, *D. ebenum*, *D. ferrea* dan *D. macrophylla* (Alrasyid, 2002). Dua jenis kayu eboni yang memiliki nilai ekonomis paling tinggi diantara ketujuh jenis tersebut adalah *D. celebica* dan *D. rumphii* karena memiliki ornamen kayu berupa strip dengan motif yang khas dan indah sehingga menambah nilai artistik dari produk yang terbuat dari kedua jenis kayu tersebut yang dipasarkan dunia dikenal dengan nama eboni Makassar, eboni bergaris atau *coromandel* (Alrasyid, 2002), sehingga kedua jenis tersebut dieksploitasi secara besar-besaran pada masa lalu.

Penyebaran alami dua jenis eboni yang memiliki nilai ekonomis paling tinggi (*D. celebica* dan *D. rumphii*) sangat terbatas. Penyebaran alami *D. celebica* meliputi wilayah Sulawesi Utara, Sulawesi Tengah dan Sulawesi Selatan (Whitten et al., 1987; Sunaryo, 2002; Martawijaya, & Kartasujana, 1977), sedangkan penyebaran *D. Rumphii* meliputi: semenanjung utara Pulau Sulawesi (Bolaang Mongondow, Bitung, Talise, Sangihe, Talaud) dan semenanjung utara kepulauan Halmahera di Pulau Morotai (Alrasyid, 2002; Kinho, 2014). Menurut Sunaryo (2002), disebutkan bahwa stok tegakan eboni di Sulawesi Utara (20%), Sulawesi Tengah (65%) dan Sulawesi Selatan (15%).

Populasi kayu eboni di alam saat ini belum diketahui secara pasti karena belum tersedia informasi terbaru. Pemanenan yang dilakukan secara berlebihan pada masa lalu merupakan salah satu penyebab kelangkaan populasi dari jenis *D. rumphii* pada hutan-hutan alam di Sulawesi Utara saat ini, sehingga diperlukan upaya-upaya dalam rangka pelestarian

sumberdaya genetiknya. Upaya pelestarian sumberdaya genetik *D. rumphii* dapat dilakukan melalui kegiatan konservasi *in situ* maupun *ex situ*. Untuk menunjang upaya konservasi *in situ* maupun *ex situ*, perlu diketahui keragaman atau variasi genetiknya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik *D. rumphii* didalam populasi, antar populasi dan hubungan kekerabatannya di Sulawesi Utara.

II. BAHAN DAN METODE

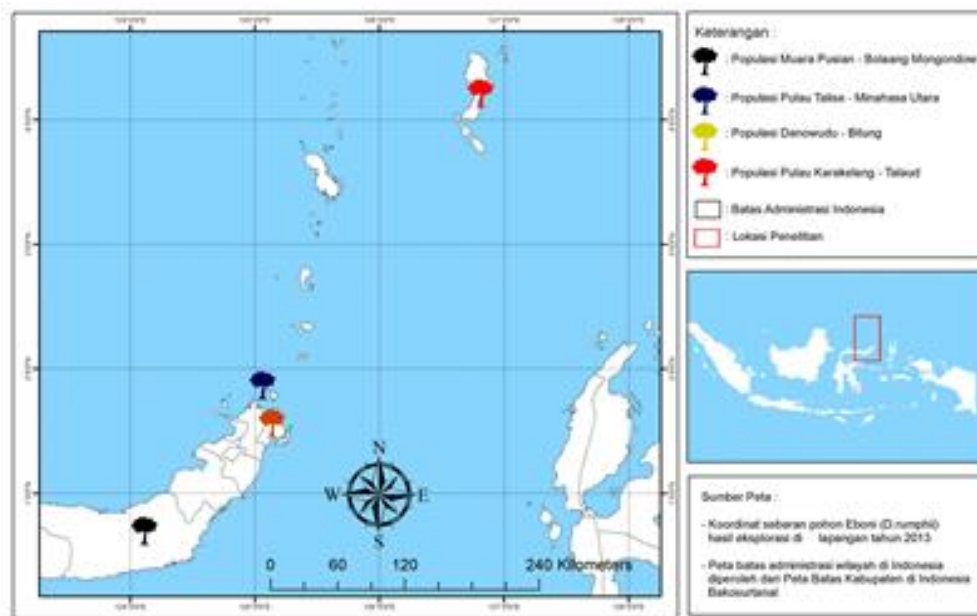
A. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun anakan *D. rumphii* yang berasal dari 4 populasi di Sulawesi Utara meliputi Bitung, Talise, Talaud dan Bolaang Mongondow (Gambar 1). Setiap populasi dipilih minimal 20 pohon induk, dengan jarak antar pohon induk minimal 100 m. Setiap pohon induk diwakili oleh satu anakan. Jumlah pohon induk yang dipilih secara acak dari seluruh populasi sebanyak 119 pohon.

B. Metode

1. Analisis isoenzim

Prosedur kerja dalam penelitian ini mengacu pada (Seido K, 1993). Daun muda dari setiap sampel diambil ± 100 mg, diekstraksi menggunakan 0,1 ml *extract buffer*, kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 0°C, sampai terbentuk dua bagian yang terpisah, yaitu larutan bening yang disebut *supernatant* yang digunakan dalam penelitian ini, sedangkan endapan (*pellet*) tidak digunakan. Gel *polyacrilamide* yang terdiri atas *running gel* (kepekatan 7,5%) dan *spacer gel* (kepekatan 3,75%) disiapkan. *Supernatant* dimasukkan sebanyak 10-20 μ l untuk tiap lubang sampel pada *spacer gel*. Tujuh sistem enzim yang digunakan yaitu *Glutamate oxaloacetate transmirase* (GOT), *Shikimate dehydrogenase* (SHD), *Esterase* (EST), *Acid phoshatase* (ACP), *Diaphorase* (DIA), *6-Phosphogluconate dehydrogenase* (6PG) dan *Glutamate dehydrogenase* (GDH).



Gambar 1. Peta lokasi penelitian

Proses elektroforesis berlangsung pada suhu 4°C selama 180-200 menit dengan arus listrik sebesar 100 mA. Gel diwarnai dengan larutan staining kemudian difiksasi, dikeringkan dan disimpan dengan menambahkan identitas pada masing-masing gel berupa nama sampel, populasi, tanggal elektroforesis, sistem enzim yang digunakan dan nomor sampel. Tahap terakhir adalah observasi gel. Observasi gel dilakukan dengan memberi kode alel untuk setiap lokus pada pita-pita (*band*) yang terdapat pada lembar gel. Posisi *band* ditentukan oleh masing-masing nilai Rf. Nilai Rf merupakan jarak rasio antara permukaan gel dengan posisi *band* dan posisi *bromophenol blue*.

2. Analisis data

Parameter keragaman genetik yang diukur meliputi rata-rata jumlah alel per lokus (A/L), jumlah alel efektif per lokus (Ae), persentase lokus polimorfik (PLP), heterozigositas teramati (Ho), Heterozigositas harapan (He). Semua parameter dihitung dengan program komputer POPGENE 1.32 (Yeh, 2000). Jarak genetik dihitung berdasarkan jarak genetik standar Nei (Nei, 1972) dan koefisien diferensiasi genetik (G_{ST}) dihitung berdasarkan pengukuran Nei (Nei, 1987). Hubungan kekerabatan antar populasi

digambarkan melalui dendrogram dari analisis kluster *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA) berdasarkan jarak genetik standar Nei.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Pewarisan pola pita (*inheritance of banding pattern*)

Analisis pra isoenzim yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan tujuh sistem enzim yaitu *Glutamate oxaloacetate transaminase* (GOT), *Shikimate dehydrogenase* (SHD), *Esterase* (EST), *Acid phosphatase* (ACP), *Diaphorase* (DIA), *6-Phosphogluconate dehydrogenase* (6PG) dan *Glutamate dehydrogenase* (GDH), menunjukkan bahwa hanya tiga sistem enzim yang dapat mendeteksi lokus polimorfik untuk jenis *D. rumpii* yaitu EST, GOT, dan GDH. Keragaman genetik yang dihasilkan oleh ketiga sistem enzim ini dikendalikan oleh 5 lokus dan 15 alel. Jumlah alel dari masing-masing sistem enzim yaitu tiga alel per lokus. Adapun jumlah alel dan nilai Rf masing-masing zona dan lokus dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah alel dan nilai Rf untuk setiap sistem enzim pada *D. rumphii*

Sistem Enzim	Lokus	Jumlah Alel	Rf masing-masing alel		
			a	b	c
EST	<i>Est-1</i>	3	31	39	43
	<i>Est-2</i>	3	49	54	58
	<i>Est-3</i>	3	64	68	72
GOT	<i>Got-1</i>	3	26	28	30
GDH	<i>Gdh-1</i>	3	15	17	19

Keterangan: Rf adalah rasio jarak antara kedudukan alel dan *bromophenol blue* dari dasar gel

Pada sistem enzim EST dapat diamati tiga lokus yaitu *Est-1*, *Est-2* dan *Est-3* yang dikontrol oleh tiga alel dan dijumpai pada semua populasi. Sistem enzim GOT dapat diamati satu lokus yaitu *Got-1* yang dikontrol oleh tiga alel dan dijumpai pada semua populasi. Sistem enzim GDH dapat diamati satu lokus yaitu *Gdh-1* yang dikontrol oleh tiga alel dan dijumpai pada semua populasi yang diamati.

2. Keragaman genetik dalam populasi

Frekuensi alel bervariasi pada masing-masing lokus dari keempat populasi *D. rumphii* seperti ditampilkan pada Tabel 2. Jumlah alel yang teridentifikasi pada 119 individu yang berasal dari empat populasi *D. rumphii* sebanyak 15 alel yang terdistribusi pada 5 lokus polimorfik.

Tabel 2. Frekuensi alel pada lokus polimorfik dari empat populasi *D. rumphii* di Sulawesi Utara.

Lokus	Alel	Populasi			
		Bitung	Talise	Talau	Bolaang Mongondow
<i>Est-1</i>	a	0,73	0,66	0,67	0,58
	b	0,19	0,22	0,23	0,32
	c	0,07 ^{*)}	0,11	0,09 ^{*)}	0,10
<i>Est-2</i>	a	0,52	0,36	0,58	0,45
	b	0,18	0,36	0,21	0,28
	c	0,29	0,26	0,20	0,26
<i>Est-3</i>	a	0,18	0,19	0,40	0,25
	b	0,34	0,38	0,25	0,35
	c	0,46	0,41	0,34	0,39
<i>Got-1</i>	a	0,31	0,50	0,36	0,42
	b	0,34	0,26	0,33	0,36
	c	0,34	0,23	0,29	0,22
<i>Gdh-1</i>	a	0,34	0,25	0,26	0,43
	b	0,61	0,65	0,44	0,52
	c	0,04 ^{*)}	0,10	0,28	0,04 ^{*)}

Keterangan: ^{*)}=Alel langka (frekuensi <0,1)

Parameter keragaman genetik dalam populasi meliputi rata-rata jumlah alel per lokus (A/L), rata-rata jumlah alel efektif per lokus

(Ae), persentase lokus polimorfik (PLP), heterozigositas teramati (Ho), Heterozigositas

harapan (H_e) dan Indeks fiksasi (F_{IS}) ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Ringkasan keragaman genetik empat populasi *D. rumphii* di Sulawesi Utara

Populasi	A/L	Ae	PLP (%)	Ho	He	F _{IS}
Bitung	3,00	2,39	100	0,54	0,56	0,03
Talise	3,00	2,47	100	0,52	0,58	0,09
Talaud	3,00	2,60	100	0,40	0,60	0,32
Bolaang Mongondow	3,00	2,58	100	0,56	0,60	0,07
Rata-rata	3,00	2,51	100	0,51	0,59	0,13

Jumlah alel per lokus (A/L) 3,00 pada semua populasi yang diteliti. Jumlah alel efektif per lokus (Ae) berkisar antara 2,39 (Bitung) hingga 2,60 (Talaud) dengan rata-rata 2,51. Persentase Lokus Polimorfik (PLP) pada taraf kepercayaan 95% sebesar 100% pada semua populasi yang diteliti. Nilai heterozigositas teramati (H_o) berkisar antara 0,40 (Talaud) hingga 0,56 (Bolaang Mongondow) dengan rata-rata sebesar 0,51. Nilai heterozigositas harapan (H_e) berkisar antara 0,56 (Bitung) hingga 0,60 (Bolaang Mongondow). Nilai indeks fiksasi (F_{IS}) pada setiap populasi dan lokus yang diamati bernilai positif, yang mengindikasikan bahwa pada semua populasi terjadi kecenderungan

pengurangan heterozigositas yang mengarah pada perkawinan kerabat (*inbreeding*). Populasi dengan indeks fiksasi paling kecil adalah populasi Bitung (0,03) dan yang paling tinggi adalah populasi Talaud (0,32).

Nilai heterozigositas harapan (H_s) pada setiap lokus berdasarkan populasi seperti ditampilkan pada Tabel 4, berkisar antara 0,56 (Bitung) hingga 0,60 (Bolaang Mongondow) dengan rata-rata 0,59. Nilai heterozigositas observasi (H_o) pada setiap lokus berdasarkan populasi berkisar antara 0,40 (Bitung) hingga 0,56 (Bolaang Mongondow) dengan nilai rata-rata sebesar 0,51 (Tabel 5).

Tabel 4. Heterozigositas harapan (H_s) berdasarkan lokus dan asal populasi

Provenans	Hs pada lokus					Rata-rata
	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Est-3</i>	<i>Got-1</i>	<i>Gdh-1</i>	
Bitung	0,42	0,60	0,62	0,66	0,50	0,56
Talise	0,49	0,65	0,63	0,62	0,50	0,58
Talaud	0,48	0,57	0,65	0,66	0,64	0,60
Bolaang Mongondow	0,55	0,64	0,65	0,64	0,53	0,60
Rata-rata	0,48	0,62	0,64	0,65	0,54	0,59

Berdasarkan Tabel 4 dan Tabel 5 diketahui bahwa pada semua populasi yang diteliti memiliki nilai H_o yang lebih rendah dari nilai H_s .

Hal ini mengindikasikan bahwa individu yang terdapat pada keempat populasi yang diamati tersebut lebih banyak bergenotipe homozigot.

Tabel 5. Heterozigositas observasi (H_o) berdasarkan lokus dan asal populasi

Provenans	Ho pada lokus					Rata-rata
	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Est-3</i>	<i>Got-1</i>	<i>Gdh-1</i>	
Bitung	0,38	0,45	0,56	0,63	0,68	0,54
Talise	0,38	0,52	0,72	0,40	0,60	0,52
Talaud	0,20	0,42	0,48	0,42	0,48	0,40
Bolaang Mongondow	0,56	0,47	0,62	0,56	0,59	0,56
Rata-rata	0,38	0,47	0,59	0,50	0,58	0,51

3. Keragaman genetik antar populasi

Keragaman genetik suatu jenis yang terbagi dalam beberapa populasi dapat ditaksir dari ferkuensi allel dalam bentuk heterozigositas harapan dalam populasi (H_s) dan antar populasi (D_{ST}) yang tidak tergantung pada frekuensi genotipe (Nei, 1973). Nilai relatif dari perbedaan gen antar subpopulasi dapat diukur dengan G_{ST} yang merupakan koefisien perbedaan gen. Nilai G_{ST} akan menjadi identik dengan nilai F_{ST} apabila hanya terdapat dua allel pada sebuah lokus, oleh karena itu nilai F_{ST} dan G_{ST} dalam penelitian ini tidak identik karena terdapat tiga allel dalam satu lokus, sehingga nilai yang digunakan untuk menaksir perbedaan genetik *D. rumphii* di Sulawesi Utara antar populasi menggunakan nilai G_{ST} . Nilai G_{ST} bervariasi dari 0 sampai 1 yang dapat diklasifikasikan menjadi rendah ($< 0,05$), sedang ($0,05-0,15$), tinggi ($0,15-0,25$) dan sangat tinggi ($> 0,25$).

Jarak genetik merupakan ukuran dari besarnya perbedaan genetik antar populasi dan berguna untuk pengelompokkan populasi. Jarak genetik standar Nei (Nei, 1972) paling banyak digunakan diantara banyak taksiran perbedaan genetik yang menggunakan frekuensi allel antar populasi. Jika sebagian besar perbedaan populasi sebagai akibat isolasi karena jarak geografis, maka jarak genetik dan jarak geografis diharapkan berkorelasi positif (Yeh, 2000). Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai heterozigositas total untuk keempat populasi *D. rumphii* di Sulawesi Utara sebesar 0,64.

Nilai keragaman antar populasi (D_{ST}) sebesar 0,05. Proporsi keragaman genetik antar populasi terhadap total keragaman genetik (G_{ST}) di antara keempat populasi *D. rumphii* sebesar 0,08. Nilai keragaman genetik antar populasi dan proporsi keragaman genetik antar populasi terhadap total populasi ditampilkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Nilai keragaman genetik antar populasi (D_{ST}) dan koefisien diferensiasi populasi (G_{ST})

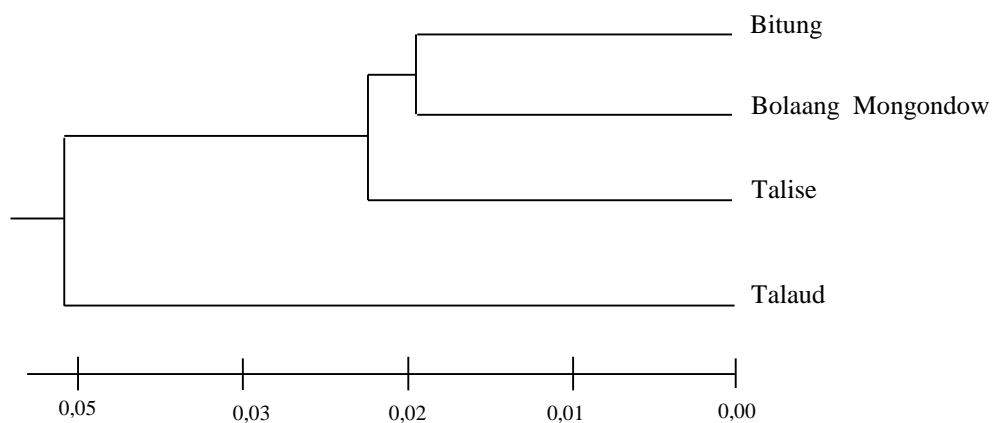
Heterozigositas Total (H_T)	Heterozigositas Harapan (H_s)	Keragaman Genetik Antar Populasi (D_{ST})	Proporsi Keragaman Genetik Antar Populasi Terhadap Total Keragaman Genetik (G_{ST})
0,64	0,59	0,05	0,08

Jarak genetik antar pasangan populasi disajikan pada Tabel 7. Populasi yang memiliki jarak genetik terbesar diantara keempat populasi *D. rumphii* yang dianalisis, adalah populasi Talise dan Talaud (0,06) dan populasi yang memiliki jarak genetik terkecil adalah populasi Bitung dan Bolaang Mongondow (0,02).

Hubungan kekerabatan antar populasi digambarkan melalui dendrogram analisis kluster *Unweighted Pair Group Methode with Aritmatic Mean Analysis* (UPGMA) berdasarkan *Nei's Standard Genetic Distance* (1972) (Gambar 2).

Tabel 7. Jarak genetik (bawah diagonal) dan identitas genetik(atas diagonal) dari 4 populasi *D. rumphii* berdasarkan *Nei's Standard Genetic Distance* (1972)

Populasi	Bitung	Talise	Talaud	Bolaang Mongondow
Bitung	-----	0,96	0,95	0,97
Talise	0,03	-----	0,93	0,97
Talaud	0,04	0,06	-----	0,95
Bolaang Mongondow	0,02	0,02	0,04	-----



Gambar 2. Hubungan kekerabatan empat populasi *D. rumphii* di Sulawesi Utara berdasarkan *Nei's Standard Genetic Distance* (1972), dengan metode UPGMA

B. Pembahasan

1. Pewarisan pola pita (*inheritance of banding pattern*)

Pola pita dari setiap sistem enzim merupakan zona-zona aktif yang diinterpretasikan sebagai lokus. Berdasarkan hasil pengujian awal dengan tujuh sistem enzim yang digunakan diketahui bahwa enzim EST, GOT dan GDH mempunyai aktifitas tinggi dengan pola pita konsisten. Tiga sistem enzim yaitu ACP, DIA dan SHD membentuk pola pita yang tidak jelas, sedangkan sistem enzim 6PG membentuk pola pita yang jelas dan konsisten namun monomorfik sehingga tidak digunakan.

Perbedaan pola pita berkaitan langsung dengan susunan asam amino. Enzim yang menganalisis dan susunan asam amino yang

membentuk protein ini disandi oleh susunan basa nukleotida dalam DNA yang khas untuk setiap jenis protein atau enzim. Oleh karena itu tidak setiap enzim akan cocok untuk suatu jenis tanaman ataupun akan terjadi polimorfisme dari setiap sistem enzim. Sebagai contoh pada hasil penelitian keragaman genetik untuk jenis meranti (*Shorea leprosula*) yang menggunakan tujuh sistem enzim, terdapat tiga sistem enzim yang tidak dapat digunakan untuk mendeteksi keragaman genetik pada jenis meranti (Na'iem, 2001). Seido (1993) melaporkan bahwa sistem enzim yang dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik untuk tanaman kehutanan sebanyak 25 jenis yang memiliki pola pita (*banding pattern*) yang konsisten menggambarkan polimorfik. Penggunaan sistem enzim polimorfik akan membantu dalam

penentuan keanekaragaman genetik (Lee et al., 2002).

2. Keragaman genetik dalam populasi

Rata-rata jumlah alel efektif per lokus lebih rendah dari rata-rata jumlah alel secara aktual per lokus. Hal ini mengindikasikan bahwa di dalam populasi-populasi tersebut ada sejumlah alel yang frekuensinya rendah dan sedikit mempengaruhi variasi genetik dalam populasi. Selain itu alel efektif (A_e) yang lebih rendah daripada alel aktual (A/L) juga menunjukkan terjadi perubahan frekuensi alel yang semakin berkurang. Pengurangan frekuensi alel ini dapat disebabkan oleh seleksi ataupun peluang (*drift*). Efek genetik *bottleneck* dapat terjadi karena *drift* secara ekstrim dan dapat dideteksi dari perubahan pada frekuensi alel (Lee et al., 2002). Hilangnya alel ini akan mengurangi perbandingan tersebut yang berakibat pada terjadinya populasi *bottleneck*.

Nilai rata-rata keragaman genetik dalam populasi yang ditunjukkan oleh nilai rata-rata heterozigositas harapan (H_e) dari keempat populasi *D. rumphii* yang diteliti sebesar 0,59. Nilai ini lebih besar dari yang dilaporkan oleh Restu (2007), yang melakukan penelitian untuk eboni dari spesies yang berbeda yaitu *D. celebica* yang berasal dari lima provenans Sulawesi Selatan (Barru, Malili, Mamuju, Maros dan Sidrap) dengan menggunakan empat sistem enzim (EST, GOT, 6PG, GDH) dengan nilai rata-rata keragaman genetik dalam populasi (H_s) sebesar 0,22. Widyatmoko, Nurtjahjaningsih, dan Prastyono (2011) menyebutkan bahwa rata-rata keragaman genetik *D. celebica* dalam populasi yang berasal dari tiga provenans di Sulawesi Tengah dan Sulawesi Selatan (Parigi, Wasupoda dan Mangkutana) sebesar 0,28. Nilai rata-rata keragaman genetik dalam populasi yang ditunjukkan oleh nilai heterozigositas harapan (H_s) dalam penelitian ini sebesar (0,59) termasuk tinggi jika dibandingkan dengan rata-rata nilai H_e dari 16 spesies tumbuhan tropis seperti dilaporkan oleh Hamrick dan Godt (1990) dalam

Lestyaningsih, Nai'em dan Winarni (2005) yaitu sebesar 0,21.

Nilai heterozigositas harapan untuk keempat populasi *D. rumphii* di Sulawesi Utara tergolong tinggi sesuai kriteria nilai heterozigositas, bahwa nilai $H_e > 0,30$ tergolong besar, nilai H_e berkisar antara 0,20 - 0,30 tergolong sedang, dan nilai $H_e < 0,20$ tergolong rendah (Na'iem, 2001). Nilai H_e yang paling kecil ditunjukkan oleh populasi Bitung sebesar 0,56 sedangkan yang paling tinggi ditunjukkan oleh populasi Bolaang Mongondow dan populasi Talaud (0,60). Hal ini mengindikasikan bahwa populasi *D. rumphii* yang ada di Sulawesi Utara, meskipun sudah terbagi dalam sub-sub populasi dan terpisah-pisah (terisolasi), namun masih menyimpan keragaman genetik yang tinggi. Hal ini diduga karena *D. rumphii* memiliki kecenderungan berkawin silang dan kemungkinan didukung oleh agen polinator yang berperan besar terhadap keberhasilan penyerbukan. Pada kondisi yang demikian, peluang terjadinya perkawinan kerabat (*inbreeding*) yang tidak menguntungkan menjadi lebih kecil. Menurut Indrioko (1996), disebutkan bahwa perkawinan kerabat secara perlahan-lahan menyeleksi individu-individu dengan genotipe yang buruk, kemudian lambat laun jumlah alelnya akan semakin menurun dan akhirnya hilang dari populasi yang sangat kecil dan saling terpisah, sehingga bisa terjadi seleksi mundur (*disgenic selection*).

Jenis *D. rumphii* memiliki preferensi berkawin silang (*outcrossing*). Hasil analisis menunjukkan bahwa, variasi keragaman genetik *D. rumphii* dalam populasi sangat tinggi yang ditunjukkan oleh nilai H_s sebesar 0,59 (91,24%). Hal ini sesuai dengan yang diungkapkan oleh Hamrick dan Godt (1989), bahwa jenis yang berkawin silang (*outcrossing*) terutama yang diserbuki oleh angin mempunyai keragaman genetik dalam populasi lebih besar dan keragaman genetik antar populasi yang rendah. Perkawinan silang (*outcrossing*) dapat menyebabkan terjadinya pencampuran materi

genetik dari satu pohon induk dengan pohon induk lainnya.

Nilai rata-rata indeks fiksasi atau koefisien silang dalam (F_{IS}) *D. rumphii* di Sulawesi Utara untuk semua populasi sebesar 0,13. Indeks fiksasi *D. rumphii* pada keempat populasi menunjukkan nilai > 0 , yang mengindikasikan bahwa untuk semua populasi *D. rumphii* di Sulawesi Utara terjadi pengurangan frekuensi alel-alel tertentu yang mempengaruhi keragaman genetik, meskipun nilai keragaman genetik dalam populasi yang ditunjukkan oleh nilai H_e maupun H_s tergolong tinggi ($> 0,30$). Nilai indeks fiksasi yang paling besar ditunjukkan oleh populasi Talaud (0,32), disusul populasi Talise (0,09), populasi Bolaang Mongondow (0,07) dan yang paling rendah ditunjukkan oleh populasi Bitung (0,03). Populasi Talaud dan Talise memiliki nilai indeks fiksasi yang paling tinggi dibandingkan populasi lainnya dapat dipahami karena kedua populasi tersebut merupakan daerah kepulauan, sehingga banyak faktor yang dapat menyebabkan indeks fiksasi pada kedua populasi tersebut menjadi tinggi diantaranya yaitu karena jumlah individu pohon dewasa yang terlibat dalam perkawinan, ukuran populasi yang kecil dan waktu pembungaan yang tidak seragam diduga ikut berpengaruh menurunkan tingkat keberhasilan perkawinan silang (*outcrossing*) dan menyebabkan peningkatan frekuensi perkawinan kerabat (*inbreeding*).

Secara keseluruhan dapat dipahami bahwa keragaman genetik *D. rumphii* dari empat populasi di Sulawesi Utara pada saat ini masih dalam keadaan baik karena menyimpan keragaman genetik yang tinggi, namun indeks fiksasi yang menunjukkan kecenderungan peningkatan perkawinan kerabat (*inbreeding*) harus menjadi perhatian untuk dipertimbangkan dalam manajemen pengelolaan sumberdaya genetik.

3. Keragaman genetik antar populasi

Keragaman genetik antar populasi atau provenans dapat diukur dari besarnya nilai F_{ST} atau G_{ST} . Nilai G_{ST} paling banyak digunakan

untuk mengukur perbedaan genetik antar populasi atau provenans karena tidak dipengaruhi oleh sistem reproduksi spesies, jumlah alel per lokus dan bentuk kekuatan-kekuatan evolusi seperti migrasi, mutasi dan seleksi. Nilai G_{ST} bervariasi dari 0 sampai 1. Menurut Nei (1973) disebutkan bahwa nilai G_{ST} dibedakan menjadi empat kelompok atau kategori yaitu; rendah ($< 0,05$), sedang (0,050 – 0,150), tinggi (0,151 – 0,250) atau sangat tinggi ($> 0,250$). Berdasarkan kriteria tersebut diatas, perbedaan genetik *D. rumphii* antar populasi di Sulawesi Utara tergolong “sedang” yang ditunjukkan oleh nilai G_{ST} sebesar 0,08 (8,76%). Hal ini menunjukkan bahwa total keragaman genetik yang ada (H_T) sebesar 0,64 berasal dari keragaman genetik antar populasi 8,76% sedangkan 91,24% berasal dari keragaman genetik dalam populasi. Nilai ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian keragaman genetik *D. celebica* yang dilaporkan oleh Restu (2007), yang berasal dari lima provenans di Sulawesi Selatan (Barru, Malili, Mamuju, Maros dan Sidrap) dengan nilai G_{ST} sebesar 0,04. Keragaman genetik *D. celebica* yang berasal dari lima provenans di Sulawesi Selatan sebesar 95,04% berasal dari keragaman dalam populasi sedangkan antar populasi sebesar 4,96%. Widyatmoko et al. (2011), melaporkan bahwa keragaman genetik *D. celebica* dari tiga provenans di Sulawesi yang berasal dari Parigi (Sulawesi Tengah), Wasupoda dan Mangkutana (Sulawesi Selatan) sebesar 70% terdistribusi di dalam provenans dan 30 % terdistribusi antar provenans.

Nilai keragaman genetik antar populasi *D. rumphii* dalam penelitian ini ($G_{ST} = 0,08$) sedikit lebih rendah jika dibandingkan dengan rata-rata nilai G_{ST} pohon tropis yaitu 0,10 (Lovelless, 1992 dalam Haryjanto, 2009) dan rata-rata nilai G_{ST} tanaman tropis berumur panjang yang tersebar secara regional yaitu 0,11. Hamrick dan Godt (1989), menyebutkan bahwa tanaman tropis berumur panjang dengan sistem perkawinan silang (*outcrossing*) dan

penyerbukannya dilakukan oleh binatang memiliki nilai G_{ST} sebesar 0,09.

Perbedaan genetik antar populasi *D. rumphii* dalam penelitian ini yang tergolong “sedang” mengindikasikan bahwa aliran genetik (*gene flow*) antar populasi masih berlangsung dengan baik yang diduga dipengaruhi oleh kontribusi dari *agen pollinator* salah satu diantaranya yaitu kelelawar yang memiliki jangkauan terbang yang luas, selain itu karena jenis *D. rumphii* memiliki sistem reproduksi *outcrossing*. Menurut Hamrick dan Godt (1989), yang melakukan penelitian terhadap 449 jenis tumbuhan yang mewakili 165 genera menyebutkan bahwa, pada umumnya jenis tumbuhan berkayu yang penyebarannya luas, sistem reproduksinya *outcrossing* dan penyebaran biji luas cenderung mempunyai keragaman genetik dalam populasi lebih besar daripada keragaman genetik antar populasi. Rendahnya nilai perbedaan genetik antar populasi pada pohon tropis telah dilaporkan juga misalnya pada jenis *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake sebesar 0,11 (Bell & House, 1994 dalam Haryjanto, 2009), *Intsia palembanica* sebesar 0,04 (Lee et al., 2002), *Intsia bijuga* sebesar 0,04 (Yudohartono, 2008). Dengan struktur genetik populasi *D. rumphii* di Sulawesi Utara yang memiliki keragaman genetik sebesar 91,24% terdistribusi di dalam populasi, maka dapat menangkap lebih dari 99% dari total keragaman genetik yang ada seperti dikemukakan oleh Hamrick (1993), bahwa untuk species tumbuhan tropis bila 80% dari total keragaman genetik terdistribusi dalam populasi, maka lima populasi sampling dianggap dapat menangkap 99% dari total keragaman genetik yang ada.

Berdasarkan analisis kluster keempat populasi *D. rumphii* di Sulawesi Utara terbagi menjadi tiga kluster. Populasi Bitung dan Bolaang Mongondow membentuk kluster pertama, populasi Talise membentuk kluster kedua dan populasi Talaud membentuk kluster ketiga. Populasi Bitung dan Bolaang Mongondow yang membentuk kluster pertama dapat dipahami karena kedua populasi tersebut

berada pada satu daratan di pulau utama Sulawesi, sedangkan populasi Talise dan Talaud yang membentuk kluster sendiri-sendiri karena kedua populasi tersebut berada di daerah kepulauan. Populasi Talise meskipun membentuk kluster terpisah dari kluster pertama (Bitung-Bolaang Mongondow), namun masih berdekatan dengan kluster pertama karena populasi Talise yang berasal dari Pulau Talise di Kabupaten Minahasa Utara secara geografis masih berdekatan dengan kluster pertama (Bitung-Bolaang Mongondow) yang berjarak ± 40 km sebelah utara dari populasi Bitung. Populasi Talaud yang berasal dari pulau Karangetan, terpisah jauh dari kluster pertama dan kluster kedua karena secara geografis populasi ini terletak di laut Pasifik Utara yang berjarak $\pm 348,65$ km sebelah utara dari populasi Bitung (kluster pertama) dan berjarak $\pm 319,93$ km sebelah utara dari populasi Talise (kluster kedua).

4. Implikasi pada program konservasi genetik

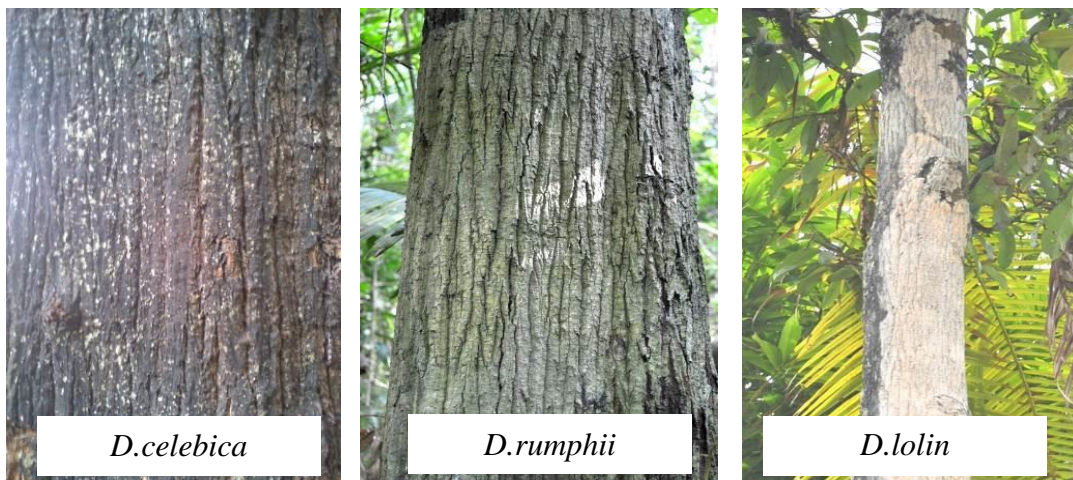
Nilai keragaman genetik *D. rumphii* yang tinggi pada keempat populasi di Sulawesi Utara yang ditunjukkan oleh nilai H_e maupun H_s ($> 0,30$), mengindikasikan bahwa tegakan *D. rumphii* pada sebaran alamnya masih dalam kondisi yang baik. Tujuan konservasi genetik *D. rumphii* lebih diarahkan untuk menjaga kemampuan evolusi jangka panjang. Menurut Jane et al., (1998) dalam Widyatmoko (2006), disebutkan bahwa tujuan utama dari pendokumentasian tingkat dan distribusi keragaman genetik suatu jenis adalah untuk mendesain strategi yang optimal untuk konservasi suatu jenis.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keragaman *D. rumphii* di Sulawesi Utara sebagian besar terdistribusi di dalam populasi (91,24%), sedangkan sisanya terdistribusi di antar populasi (8,76%). Hamrick (1993), mengusulkan bahwa untuk jenis tanaman tropis, jika lebih dari 80% dari total keragaman genetik terdistribusi dalam populasi, lima populasi yang

ditempatkan secara strategis seharusnya dapat mempertahankan 99% dari total keragaman genetiknya, sehingga dengan keragaman genetik *D. rumphii* sebesar 91,24% terdistribusi di dalam populasi maka setidaknya dapat menangkap lebih dari 99% dari total keragaman *D. rumphii* di Sulawesi Utara. Meskipun demikian, karena *D. rumphii* memiliki sistem perkawinan silang luar (*outcrossing*) dan variasi sifat-sifat morfologis/fenotipe dan adaptifnya belum diketahui dengan baik maka jumlah populasi yang dikonservasi seharusnya lebih dari empat populasi. Dengan mempertimbangkan tingkat dan distribusi keragaman genetik *D. rumphii* berdasarkan penanda isoenzim dan fitogeografi

tumbuhan di kawasan Wallacea, maka sebaiknya materi genetik *D. rumphii* yang akan digunakan untuk tujuan konservasi *ex situ* diambil lebih dari empat populasi tersebut.

Terdapat tiga jenis *Diospyros* yang tergolong sebagai kayu eboni yang memiliki kemiripan morfologis yaitu *D. celebica*, *D. rumphii* dan *D. lolin* sehingga dalam melakukan eksplorasi materi genetik untuk tujuan konservasi sumberdaya genetik harus dilakukan secara hati-hati. Kemiripan morfologis tersebut misalnya pada penampakan permukaan batang, ketiga jenis tersebut memiliki permukaan batang berwarna hitam dan beralur seperti ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Penampakan permukaan batang tiga jenis *Diospyros* yang memiliki kemiripan morfologis

Pengambilan populasi - populasi *D. rumphii* dari sebaran geografis yang diduga kemungkinan lebih banyak pada daerah kepulauan yang saling terpisah oleh lautan yang dapat menyebabkan terjadinya isolasi reproduksi perlu menjadi pertimbangan dalam program konservasi genetik *D. rumphii*. Isolasi reproduksi dan adaptasi lokal dapat menyebabkan semakin besarnya diferensiasi genetik antar populasi *D. rumphii* di semenanjung utara Sulawesi. Center for Plant Conservation (1991), merekomendasikan bahwa jumlah 10-50 individu per populasi merupakan jumlah yang layak antara batas minimum dan pengambilan

sampel yang terlalu banyak. Yonezawa (1985) dalam Widyatmoko (2006), menganjurkan bahwa 10 individu per populasi memenuhi kriteria baik dari segi kecukupan maupun efisiensi. Meskipun tidak ada ketentuan pasti mengenai jumlah individu per populasi tetapi yang perlu diperhatikan adalah posisi antar individu. Individu-individu yang akan dijadikan sumber pengumpulan materi genetik sebaiknya agak berjauhan dengan maksud agar biji atau anakan yang dikumpulkan tidak hanya merupakan hasil perkawinan dari individu-individu yang dipilih tetapi merupakan hasil

perkawinan lebih dari sejumlah individu-individu pohon yang terpilih.

5. Implikasi pada program pemuliaan

Penelitian yang terkait dengan keragaman genetik *D. rumphii* belum banyak dilakukan seperti pada jenis *D. celebica*. Meskipun demikian, hasil-hasil penelitian mengenai keragaman genetik *D. celebica* dapat dijadikan acuan dalam menyusun program pemuliaan *D. rumphii*. Hal tersebut karena tidak menutup kemungkinan dalam penelitian-penelitian keragaman genetik eboni yang dilakukan sebelumnya terjadi pencampuran materi antara *D. celebica* dan *D. rumphii* mengingat kedua jenis ini secara sepintas sangat mirip di alam.

Upaya-upaya dalam program pemuliaan *D. rumphii* sangat penting dan mendesak untuk segera dilakukan. Hal ini didasari dengan pertimbangan karena eboni *D. rumphii* merupakan jenis kayu komersil yang termasuk dalam “Kelompok Indah Satu” dalam penggolompokan jenis kayu komersil (Departemen Kehutanan, 2003).

Koleksi materi genetik *D. rumphii* dan pembangunan tegakan konservasi *ex situ* dari hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai populasi dasar dalam strategi pemuliaan pohon dan menjadi tempat menyimpan genotipe-genotipe tertentu yang mungkin hilang akibat seleksi yang dilakukan pada program pemuliaan (Gambar 4).



Gambar 4. Koleksi materi genetik *D. rumphii* di persemaian yang akan digunakan untuk pembangunan kebun konservasi *ex situ*

Keragaman genetik *D. rumphii* yang masih tinggi pada populasi Bolaang Mongondow ($He = 0,60$) diharapkan dapat mendukung upaya pemuliaan jenis ini. Hal ini karena tidak semua jenis pohon memiliki korelasi antara keragaman pada penanda genetik dengan fenotipe untuk kebanyakan sifat-sifat penting secara ekonomi (Moran, & Glaubitz, 2000). Contoh yang dapat dijadikan sebagai bahan pembelajaran dan evaluasi yaitu pada *Acacia mangium* yang menunjukkan adanya korelasi antara keragaman genetik dengan fenotipe, dimana pada populasi yang terisolasi (Seram & Sidei), memiliki variasi genetik yang sangat kecil (Butcher, Moran, &

Perkins, 1996) dan kedua populasi tersebut berdasarkan hasil uji provenans memiliki pertumbuhan yang paling lambat (Hardwood & William, 1992 dalam Hardiyanto, 2000). Demikian pula dengan jenis Cendana seperti dilaporkan Jones (2008), bahwa keragaman genetik Cendana dari India, Timor dan Northern Territory di Kununurra (Australia Barat) menggunakan penanda nRFLP (*Nuclear Restriction Fragment Length Polymorphism*), memiliki heterozygositas sangat rendah (Ho dan $He = 0,04$) yang berkorelasi dengan rendahnya variasi kandungan minyaknya. Dengan demikian untuk *D. rumphii* masih dapat ditingkatkan

kecepatan pertumbuhan dan kualitas kayu (strip atau garis yang terbentuk pada kayu teras) melalui program pemuliaan. Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI), kayu teras eboni yang memiliki strip (garis hitam) lebih dari 10 strip pada lebar bidang radial 10 cm, merupakan kualitas utama (Hendromono & Allo, 2008).

Keragaman genetik *D. rumphii* yang terdistribusi lebih banyak didalam populasi (91,24%) daripada antar populasi (8,76%) berarti seleksi individu yang akan dilibatkan dalam program pemuliaan lebih banyak diambil dari dalam populasi. Karakter penting yang dimuliakan minimal cukup dikendalikan oleh faktor genetik dan memiliki nilai ekonomi (Zobel, & Talbert, 1984). Kualitas kayu teras adalah karakter penting yang dikendalikan oleh faktor genetik, sehingga karakter ini yang menjadi kriteria dalam melakukan seleksi. Peningkatan variasi genetik pada generasi selanjutnya membutuhkan infusi materi genetik dari populasi atau provenans lainnya, sehingga seleksi dapat dilakukan secara lebih intensif (White, 1987). Materi infusi juga dapat dilakukan melalui persilangan dengan jenis lain yang masih dalam satu marga yang sama.

IV. KESIMPULAN

Total keragaman genetik *D. rumphii* dari empat populasi yang diamati sebesar 0,64. Keragaman genetik tersebut sebagian besar terdistribusi didalam populasi yaitu sebesar 91,24 % dan sisanya 8,76 % terdistribusi antar populasi. Terdapat tiga klaster yang menunjukkan hubungan kekerabatan diantara populasi-populasi tersebut yaitu populasi Bitung dan Bolaang Mongondow membentuk klaster pertama, populasi Talise membentuk klaster kedua dan populasi Talaud membentuk klaster ketiga. Nilai indeks fiksasi pada setiap populasi dan lokus yang diamati bernilai positif mengindikasikan bahwa pada semua populasi yang diteliti meskipun memiliki keragaman genetik yang terdistribusi sebagian besar didalam

populasi, namun terlihat adanya indikasi terjadi pengurangan heterozigositas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kami sampaikan kepada Dr. Ir. Mahfudz, MP, (Kepala Balai Penelitian Kehutanan Manado), Ir. Sudiyono, M.Si (Kepala Balai Konservasi Sumberdaya Alam), Ir. Agus Rante Lembang, M.Si (Kepala Balai Taman Nasional Bogani Nani Wartabone) yang telah banyak memfasilitasi sehingga penelitian ini dapat terlaksana. Penghargaan dan Ucapan terima kasih yang tulus kami sampaikan kepada kepala Laboratorium Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada dan staff yang telah membantu dalam pelaksanaan analisis genetik menggunakan penanda Isoenzim. Penghargaan dan terima kasih yang tulus juga disampaikan kepada rekan-rekan tim penelitian eboni di Balai Penelitian Kehutanan Manado yang telah banyak membantu dalam persiapan dan pelaksanaan kegiatan penelitian di lapangan. Ucapan Terima Kasih dan penghargaan yang tinggi juga disampaikan kepada semua pihak yang sudah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan tidak dapat kami sebutkan satu per satu.

DAFTAR PUSTAKA

- Alrasyid, H. (2002). Kajian Budidaya Pohon Eboni. *Berita Biologi*, 6(2). Bogor, Indonesia: Puslit Biologi LIPI.
- Butcher, P.A, Moran, G.F, & Perkins. H.D. (1996). Genetic Resources and Domestication of *Acacia mangium*. In M.J. Dieters, A.C. Matheson, D.G. Nikles, C. E. Hardwood, & S. M. Walker (Eds.). *Proc. QFRI-IUFRO Conf. Caloundra, Queensland, Australia*.
- Center for Plant Conservation. (1991). *Genetic Sampling Guidelines For Conservation Collection of Endangered Plants*. In D.A. Falk & K.E. Holsinger (Eds.) Genetics and conservation of rare plants. New York: Oxford University Press.
- Departemen Kehutanan. (2003). Pengelompokan Jenis Kayu Sebagai Dasar Pengenaan Iuran Kehutanan, Pub. L. No. 163/Kpts-II/2003 (2003). Departemen Kehutanan, Indonesia.

- <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hamrick, J. L., & Godt, M. J. W. (1990). Allozyme diversity in plant species. In *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. (pp. 43–63). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hamrick, J.L. (1993). Genetic Diversity and Conservation in Tropical Forest. In R. M. Drysdale., S.E.T. John, 7 A.C. Yasa (Eds.). *Proceeding of The ASEAN-Canada Symposium On Genetic Conservation and Production of Tropical Tree Seed., 1-9 ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre, Muaklek, Saraburi, Thailand*.
- Hamrick, J.L & Godt, M.J.W. (1989). Isozyme and The Analysis of Genetic Structure In Plant Population. In D. E. Soltis & P. S. Soltis (Eds.). *Isozyme in Plant Biology*. Oregon: Dioscoridos Press.
- Hardiyanto, E.B. (2000). Genetik dan Strategi Pemuliaan *Acacia mangium*. In *Seminar Nasional Silvikultur 1999. Peluang dan Tantangan Menuju Produktifitas dan Kelestarian Sumberdaya Hutan Jangka Panjang*. Yogyakarta: Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada.
- Haryjanto, L. (2009). Keragaman genetik cendana (*Santalum album* Linn) di Kebun Konservasi Ex-situ Watusipat, Gunungkidul dengan penanda isozim. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 3(3), 127–138. <https://doi.org/10.20886/jpth.2009.3.3.127-138>
- Hendromono & Allo, M.K. (2008). Konservasi Sumberdaya Genetika Eboni Di Sulawesi Selatan. *Info Hutan*, V(2), 177–187.
- Indrioko, S. (1996). *Studi Variasi Genetik Pinus merkusii Jungh. Et de Vriese di Pulau Jawa dengan Metode Analisis Isozym* (Tesis tidak dipublikasikan). Universitas Gadjah Mada.
- Jones, C.G. (2008). *The Best of Santalum album: Essential Oil Composition, Biosynthesis and Genetic Diversity in The Australian Tropical Sandalwood Collection* (Thesis). Faculty of Natural and Agriculture Science, The University of Western Australia.
- Kinho, J. (2014). Status Dan Strategi Konservasi Eboni (*Diospyros rumphii* Bakh .) Di Sulawesi Utara. In S. W. Manuhara, D. Winarni, Ni'matusahroh, S. Hariyanto & H. Purnobasuki (Eds.). *Seminar Nasional Biodiversitas V "Pemanfaatan dan Konservasi Keanekaragaman Hayati Untuk Kesejahteraan Manusia* (pp. 130–137). Surabaya: Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Lee, S.L., Kevin, K. S., Leng-Guan Saw, Norwati, A., Salwana, M. H. S., Chai-Ting Lee, & Norwati, M. (2002). Population Genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and Genetic Conservation of Virgin Jungle Reserve in Peninsular Malaysia. *American Journal of Botany*, 89(3), 447–459.
- Lestyaningsih, I., Nai'em, M. & Winarni, W. W. (2005). Keragaman Genetik Konservasi Ex-Situ Meranti Merah (*Shorea leprosula* Miq.) Populasi Sumatera Berdasarkan Analisis Isozim. In *Peran Konservasi Sumberdaya Genetik*. Yogyakarta: International Tropical Timber Trees & Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada.
- Martawijaya, A., & Kartasujana, I. (1977). Ciri Umum, Sifat dan Kegunaan Jenis-Jenis Kayu Indonesia. *Lembaga Penelitian Hasil Hutan*, 41(22&23).
- Moran, G.F., & Glaubitz, J.C. (2000). Genetic Tools: The Use of Biochemical and Molecular Markers. In A.Young, D. Boshier, &T. Boyle. (Eds.). *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. Australia: CSIRO Publishing.
- Na'iem, M. (2001). Genetic variation of *Shorea leprosula* Miq. In Three Population in Indonesia: Implication for Ex Situ Conservation. *Buletin Kehutanan*.
- Nei M. (1972). Genetic Distance Between Population. *American Naturalist*, (106), 283–292.
- Nei, M. (1973). Analysis of Genetic Diversity in Subdivided Population. In *Proceeding of The National Academy of Science*. USA: National Academy of Science.
- Nei, M. (1987). *Moleculer Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Restu, M. (2007). *Keragaman Genetik Lima Provenansi Eboni (Diospyros celebica Bakh.) Untuk Pemuliaan Pohon dan Konservasi Genetik* (Disertasi tidak dipublikasikan). Program Pascasarjana, Universitas Hasanudin, Makassar.
- Seido, K. (1993). *Manual of Isozyme Analysis*. Jakarta: JICA and Directorate General of Reforestation and Land Rehabilitation, Ministry of Forestry in Indonesia.
- Sunaryo. (2002). Konservasi Eboni (*Diospyros celebica* Bakh.). *Berita Biologi*, 6(2). Bogor, Indonesia: Puslit Biologi LIPI.

- White T.L. (1987). A Conceptual Framework For Tree Improvement Programs. *New Forest*, 4, 325–342.
- Widyatmoko, AYPBC. (2006). Strategi Konservasi Ulin Berdasarkan Informasi Keragaman Genetik. In A.Y.P.B.C. Widyatmoko & M. Susanto. (Eds.). *Workshop Sehari Peran Litbang Dalam Pelestarian Ulin* (pp. 141–148). Samarinda, Indonesia: Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan Tanaman dan Tropenbos International Indonesia.
- Widyatmoko AYPBC., Nurtjahjaningsih ILG., & Prastyono. (2011). *Study On The Level Of Genetic Diversity of Diospyros celebica, Eusideroxylon zwagery and Michelia spp. Using RAPD Markers* (No. ITTO Project PD 539/09 Rev.1 (F)).
- Yeh, F.C. (2000). Population Genetics. In A. Young, D. Boshier, & T. Boyle. (Eds.). *Forest Conservation Genetics: Principle and Practice*. CABI Publishing.
- Yudohartono, T.P. (2008). *Studi Variasi Genetik Beberapa Populasi Merbau (Intsia bijuga O.Ktze) Menggunakan Penanda Isoenzim dan Pemanfaatannya Dalam Program Konservasi Genetik* (Tesis tidak dipublikasikan). Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada.
- Zobel B, & Talbert J. (1984). *Applied Forest Tree Improvment*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Willey & Sons.

