

KEKERABATAN GENETIK
ANAKAN ALAM ULIN (*Eusideroxylon zwageri* TEIJSM. & BINN.)
MENGGUNAKAN PENANDA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA
*Genetic relationship of ulin (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn.) wildlings using random amplified polymorphism DNA markers*

I.L.G. Nurtjahjaningsih¹, Sukartiningsih², Anna Puspa Amarta Saranti³, Purnamila Sulistyawati,¹ dan Anto Rimbawanto¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta
Jalan Palagan Tentara Pelajar KM.15 Purwobinangun, Pakem, Sleman Yogyakarta

²Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur
Kampus Unmul Gunung Kelua, Jalan Ki Hajar Dewantara, 75116, PO Box 1013

³Fakultas Teknobiologi, Universitas Atmajaya, Yogyakarta
Kampus Gedung Thomas Aquinas Jalan Babarsari 44 Yogyakarta 55281

Tanggal diterima : 19 Oktober 2016, Tanggal direvisi : 10 November 2016, Disetujui terbit : 11 April 2017

ABSTRACT

The study aimed to assess genetic diversity and genetic relationship of ulin wildlings randomly collected from a nursery and originated from Bukit Soeharto natural forest, East Kalimantan. DNA templates were extracted from leaf samples of 1.5 years old wildlings. Five RAPD primers consisted 55 polymorphic loci were used for genetic studies. Genetic diversity and relationship were analyzed using GenAlex software. The results showed moderate mean value of genetic diversity ($H_E=0,345$, SE 0,015) of the wildlings. Forty eight wildlings were clustered in only 3 groups; almost all wildlings (65%) were clustered in one main cluster. Moreover, 4 wildlings were clones (8%). In conclusion, the 48 wildlings of ulin consisted high genetic relationship and individual clones that reflects the low genetic diversity of this species.

Keywords: *ulin wildling, genetic diversity, genetic relationship, clone*

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman dan kekerabatan genetik antar anakan alam ulin yang diambil secara acak dari persemaian dan berasal dari Bukit Soeharto, Kalimantan Timur. DNA cetakan diekstraksi dari contoh daun anakan alam ulin berumur 1,5 tahun. Lima penanda RAPD (*random amplified polymorphism DNA*) yang terdiri dari 55 lokus polimorfik digunakan untuk analisis genetik. Keragaman dan kekerabatan genetik dianalisis menggunakan program komputer GenAlex. Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata keragaman genetik anakan alam tersebut dalam kategori sedang ($H_E=0,345$, SE 0,015). Empat puluh delapan individu anakan membentuk 3 kelompok: bahkan hampir semua individu (65%) mengelompok dalam satu kelompok utama. Selain itu, 4 individu anakan merupakan klon (8%). Berdasarkan penelitian ini, 48 anakan ulin terdiri dari individu dengan kekerabatan genetik tinggi dan merupakan individu klon. Hal ini dapat menyebabkan rendahnya nilai keragaman genetik pada ulin.

Kata kunci: *anakan alam ulin, keragaman genetik, kekerabatan genetik, klon*

I. PENDAHULUAN

Pohon ulin (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn.) adalah salah satu jenis species hutan hujan tropis, berukuran besar, umur dapat mencapai ribuan tahun (Kurokawa, Yoshida, Nakamura, Lai, & Nakashizuka, 2003). Jenis ini tersebar secara alami di pulau Sumatera bagian Timur dan Selatan, Bangka, Belitung, seluruh Kalimantan, kepulauan Sulu dan Palawan

(Philipina) (Soerianegara, & Lemmens, 1994). Kayu ulin sangat kuat dan tahan air, sehingga pohon ini banyak dimanfaatkan untuk tiang galangan kapal, jembatan dan rumah.

Proses reproduksi ulin terjadi setiap tahun (Fijridiyanto, Mujahidin, & Hatta, 2011). Bunga ulin berukuran sangat kecil (1,5 mm), berbau harum dan berwarna kekuningan menyerupai daunnya (Irawan, 2005; Soerianegara & Lemmens, 1994). Meskipun belum ada informasi mengenai agen

penyerbuk pada ulin, namun sesuai morfologi dan ciri bunga tersebut, kemungkinan penyerbukannya dibantu oleh serangga. Serangga cukup efektif dalam menyerbuki, membantu terjadinya proses aliran gen (*gene flow*) dan menjaga laju silang luar (*outcrossing*) (Harata dkk., 2012), contohnya serangga jenis lebah bersengat (*Trigona spinipes*) sangat efektif menyerbuki tanaman kopi hingga jarak 200 km (Jaffé dkk., 2016). Oleh karena sifatnya yang demikian, ulin memiliki keragaman genetik yang cukup tinggi (Irawan, 2005).

Buah ulin berukuran relatif besar dan berat, sehingga secara alami biji ulin disebarkan mengikuti gravitasi. Oleh karena itu, sebaran biji ulin tidak jauh dari pohon induknya. Selain itu, salah satu keistimewaan buah ulin adalah apabila terbelah menjadi beberapa bagian, mampu tumbuh menjadi individu baru yang berbeda namun sama secara genetik (individu klon) (Irawan, 2005). Di hutan alam, pembelahan bagian buah tersebut dapat terjadi karena buah ulin dimakan oleh hewan seperti orangutan dan tupai yang merupakan agen penyebar biji ulin. Hal tersebut dapat menyebabkan ditemukannya individu klon pada ulin.

Belum banyak informasi mengenai keragaman genetik anakan alam ulin. Peran serangga dalam membantu proses reproduksi pada ulin dapat cukup efektif dalam menjaga aliran gen sehingga keragaman genetik dapat terjaga. Walaupun demikian, berdasarkan ciri sebaran buah ulin yang mengikuti gravitasi, dapat terbelah lalu tumbuh menjadi lebih dari satu individu klon, ada kemungkinan keragaman genetik jenis ini tidak terlalu tinggi. Analisis genetik diperlukan salah satunya untuk memastikan keragaman genetik anakan alam ulin yang akan digunakan dalam rehabilitasi hutan ulin.

Untuk mengidentifikasi keragaman genetik diperlukan penanda genetik. Penanda *random amplified polymorphism DNA* (RAPD) merupakan salah satu penanda

genetik molekuler, tersusun oleh 10 basa nukleotida, bersifat dominan sehingga hanya mampu mengenali alel homozigot dominan atau resesif, sementara alel heterozigot dibaca sebagai alel homozigot dominan. Penanda RAPD memiliki tingkat polimorfisme cukup tinggi, sehingga sering digunakan untuk mengetahui keragaman genetik didalam populasi maupun jenis, bahkan untuk mengidentifikasi tetua jantan di kebun benih (Goto, Miyahara, & Ide, 2002). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman dan kekerabatan genetik antar anakan alam ulin menggunakan penanda RAPD tersebut.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan

Materi genetik yang digunakan berupa anakan alam ulin yang berasal dari hutan alam di wilayah Bukit Soeharto, Kalimantan Timur. Contoh daun sebanyak 48 individu diambil secara acak dari anakan alam berumur 1,5 tahun dari persemaian yang dikelola oleh Pusat Rehabilitasi Hutan (PUSREHUT) di Bukit Soeharto, Kalimantan Timur. Contoh daun dikeringkan menggunakan silika gel dan disimpan pada suhu ruang sampai dilakukan ekstraksi DNA.

Isolasi DNA menggunakan bahan kimia yang sesuai dengan metode CTAB (Shiraishi & Watanabe, 1995), untuk proses PCR menggunakan *KAPATaqpolymerase kit* (KAPABIOSYSTEMS), sedangkan untuk proses elektroforesis menggunakan *agarose gel* (Thermo Scientific).

B. Metode Penelitian

1. Isolasi DNA dan analisis RAPD

Isolasi DNA dilakukan dengan cara menimbang contoh daun kering tersebut di atas, seberat 50 mg dan diekstraksi menggunakan metode CTAB (Shiraishi & Watanabe, 1995). Analisis genetik menggunakan penanda RAPD adalah salah satu analisis DNA berdasarkan proses PCR

(*polymerase chain reaction*). Larutan PCR terdiri dari 5 ng/μL DNA; 10 pmol primer RAPD; 5x KAPATaq Extra Buffer (tanpa Mg²⁺); 0,3mM dNTP; 1,75mM MgCl₂; 1,25 U/50μL KAPATaq Extra Hot-start DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS). Kondisi mesin thermal cycler (9700) terdiri dari 3 tahap: tahap I adalah tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit; tahap II terdiri dari 45 siklus yang meliputi denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik; *annealing* pada suhu 37°C selama 30 detik, dan pemanjangan 72°C selama 1,5 menit; tahap III merupakan tahap pemanjangan terakhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Penelitian ini menggunakan 6 primer RAPD dengan panjang 10 basa nukleotida (Operon Technologies, USA; Tabel 1). Hasil PCR selanjutnya diamati pada 1,2% gel agarose menggunakan alat elektroforesis yang dialiri listrik 120 voltase. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan alat visualisasi yang dilengkapi dengan kamera dan lampu UV (Hitachi).

2. Analisis data

Keragaman genetik didalam populasi diukur berdasarkan variabel jumlah allele (N_A)

dan keragaman genetik harapan (H_E). Kedekatan genetik antar individu dianalisis menggunakan konsep analisis prinsip koordinat (PCoA=*principal coordinate analysis*). Keragaman genetik dan PCoA dianalisis menggunakan GenAlex software (Peakall, & Smouse, 2012).

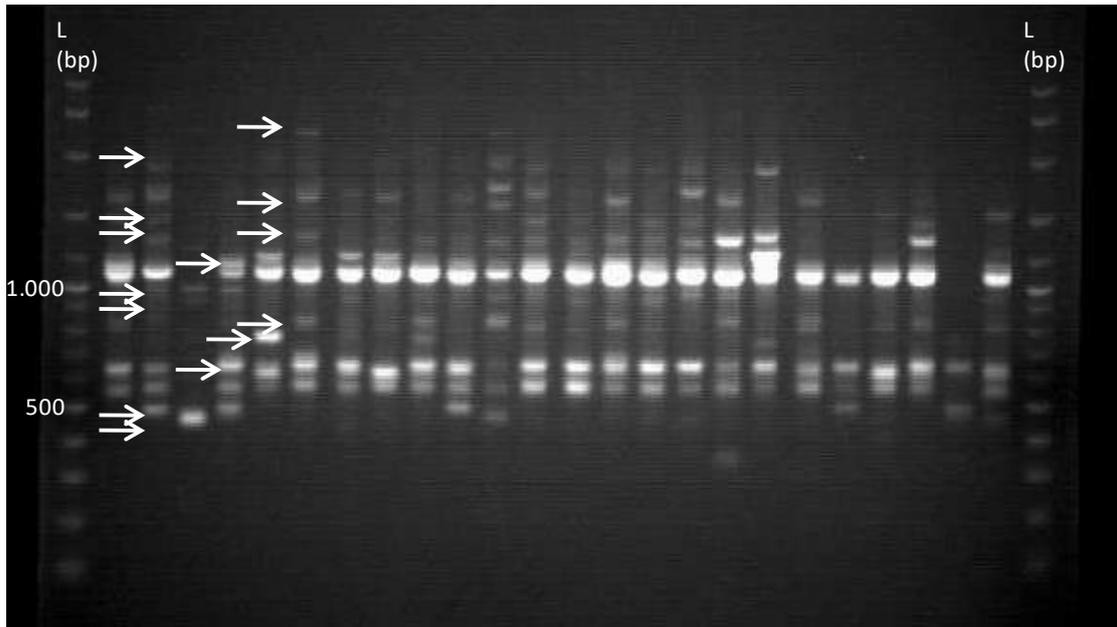
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Proses seleksi polimorfisme primer RAPD pada ulin sudah pernah dilakukan oleh Widyatmoko (komunikasi pribadi, 2016). Meskipun demikian, dalam penelitian ini dilakukan proses seleksi primer kembali untuk memastikan ukuran jumlah lokus polimorfik pada setiap primer. Lima primer RAPD yang digunakan cukup polimorfik, yaitu berkisar antara 9 sampai dengan 14, dari total 55 lokus polimorfik (Tabel 1). Salah satu contoh primer RAPD (OPA18) yang mengamplifikasikan 14 lokus polimorfik ditunjukkan pada Gambar 1. Selanjutnya, 5 primer ini digunakan untuk menganalisis 48 anakan alam ulin.

Tabel 1. Nama primer RAPD dan urutan nukleotida yang digunakan, jumlah lokus dan ukuran lokus polimorfik menggunakan 48 anakan alamulin

No.	Nama primer RAPD	Urutan nukleotida (5'-3')	Jumlah lokus polimorfik	Ukuran lokus polimorfik (bp)
1	OPA18	GAAACGGGTG	14	450, 500, 640, 780, 800, 900, 1000, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 2000, 2250
2	OPG03	GAGCCCTCCA	10	400, 430, 500, 600, 700, 750, 800, 850, 870, 1500
3	OPG08	TCACGTCCAC	12	460, 500, 520, 600, 610, 680, 870, 900, 1000, 1500, 2000, 3000
4	OPG12	CAGCTCACGA	10	470, 680, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2750, 3000
5	OPJ18	TGGTCGCAGA	9	520, 760, 860, 1000, 1200, 1500, 2500, 2750, 3000
Total jumlah lokus			55	



Gambar 1. Salah satu contoh primer RAPD (OPA18) yang mengamplifikasikan 14 lokus polimorfik pada ulin

Keterangan:



: lokasi lokus polimorfik

L: Leader

bp: pasangan basa

Polimorfik lokus mencapai 100%; hal ini menunjukkan bahwa setiap lokus mempunyai dua alel; jumlah alel tersebut merupakan jumlah maksimal apabila menggunakan penanda RAPD. Nilai keragaman genetik per lokus (H_E) pada populasi anakan alam ulin berkisar antara 0,129 sampai dengan 0,689. Rata-rata nilai H_E tersebut dikategorikan dalam nilai sedang ($H_E=0,345$, SE 0,015). Penanda RAPD yang digunakan pada penelitian ini cukup polimorfik, namun nilai H_E pada populasi anakan ulin agak rendah. Hasil tersebut membuktikan bahwa keragaman genetik ulin di hutan Bukit Soeharto sudah seharusnya menjadi perhatian untuk dijaga kelestariannya.

Berdasarkan kedekatan genetik antar 48 anakan alam ulin, analisis PCoA mengelompokkan individu-individu tersebut menjadi 3 kelompok (Gambar 2); 31 individu tersebut mengelompok dalam satu kelompok (65%); sedangkan 17 individu lainnya mengelompok dalam 2 kelompok lainnya dan

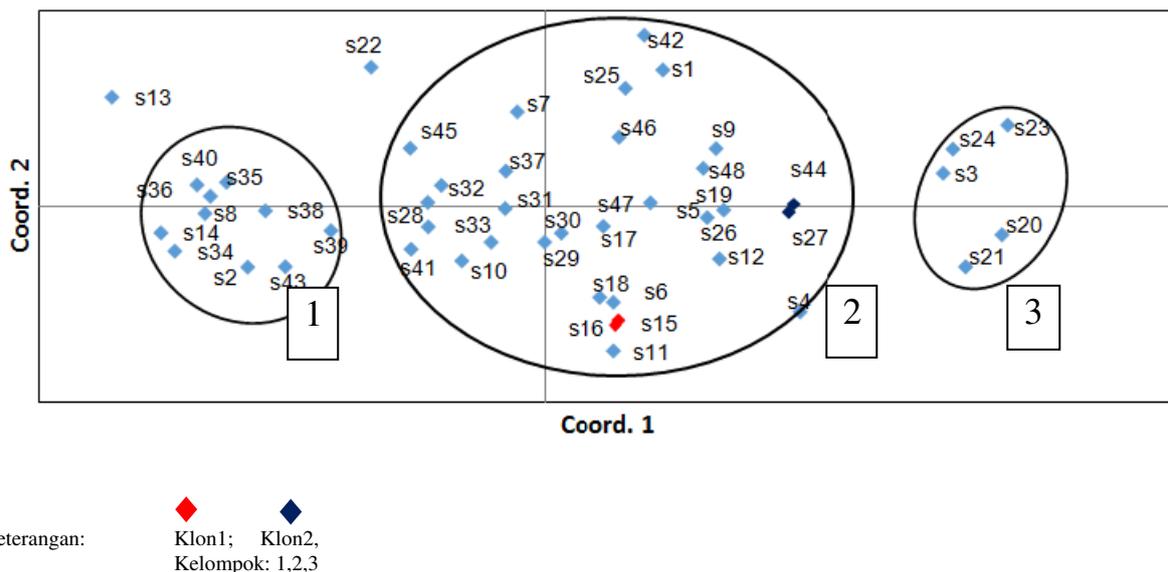
di luar kelompok. Analisis PCoA juga dapat menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan genetik antara 4 anakan (8%) yaitu no15 dan 16 (s15 dan s16), demikian pula antara s27 dan s44; yang mengindikasikan bahwa individu-individu tersebut sebagai klon.

B. Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan menggunakan penanda RAPD, nilai keragaman genetik anakan alam ulin termasuk dalam kategori sedang (rata-rata $H_E=0,345$). Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan nilai yang dilaporkan oleh penelitian sebelumnya ($H_E=0,257$) (Widyatmoko, Nurtjahjaningsih, & Prastyono, 2011). Studi keragaman genetik di hutan alam melaporkan bahwa nilai keragaman genetik yang rendah disebabkan oleh tidak adanya aliran gene (*gene flow*) pada populasi yang terfragmentasi, yang salah satunya disebabkan oleh campur tangan manusia misalnya tekanan terhadap pembalakan yang berlebihan dan alih fungsi lahan (Bodare dkk., 2017). Gangguan *illegal*

logging, perburuan dan tambang merupakan ancaman terhadap sumber daya hayati dan ekosistem yang terus-menerus terjadi di hutan Kalimantan (Laurance, 2016). Selain itu, nilai keragaman genetik yang rendah dapat disebabkan oleh keaktifan, terbatasnya jumlah atau tidak hadirnya agen penyerbuk (*pollinator*) yang membantu proses reproduksi (Fijridiyanto dkk., 2011; Harata dkk., 2012). Keterbatasan atau ketidak hadirannya agen penyerbuk disebabkan karena cuaca, misalnya tingginya kelembaban (Fijridiyanto dkk., 2011) atau ketidaktertarikan penyerbuk terhadap karakter morfologi bunga, seperti yang terjadi pada nyamplung (Nurtjahjaningsih dkk., 2012). Seperti disebutkan di atas, bahwa bunga ulin berukuran sangat kecil (sekitar 1,5 mm), warna bunga menyerupai warna daunnya (Irawan, 2005; Soerianegara & Lemmens, 1994), ciri bunga yang dimiliki tersebut kemungkinan menyebabkan tidak terlihat oleh

penyerbuk, akibatnya sedikit bunga yang diserbuki dan tidak menghasilkan buah. Keterbatasan jumlah penyerbuk mengakibatkan terbatasnya aliran gen (*gene flow*), sehingga keragaman genetik bernilai rendah (Takeuchi dkk., 2004). Walaupun demikian, Irawan (2011) melaporkan bahwa dengan menggunakan penanda AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), nilai keragaman genetik ulin di hutan alam ulin di Jambi termasuk tinggi (53% fragmen bersifat polimorfik). Hal ini disebabkan jenis ini cenderung menyerbuk silang (*outcrossing*). Suatu jenis mampu mempertahankan keragaman genetiknya ketika memiliki perkawinan silang luar tinggi (James & Jordan, 2014). Penggabungan pendapat Irawan (2005), Fijridiyanto, dkk. (2011) dan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa nilai keragaman genetik pada ulin bergantung pada efektif atau tidaknya agen penyerbuk.



Gambar 2. Hasil PCoA terhadap 48 anakan alam ulin

Hasil analisis PCoA menunjukkan bahwa 48 anakan alam ulin dikelompokkan dalam 3 kelompok. Pengelompokan tersebut tidak berdasarkan urutan penempatannya di persemaian melainkan mengelompok secara acak. Hal ini menunjukkan bahwa anakan

alam tersebut dikumpulkan dari hutan alam dan ditempatkan di persemaian secara acak. Selain itu, sebagian besar (31 dari 48) anakan tersebut membentuk kelompok yang sama (kelompok 2; Gambar 2). Hal ini menunjukkan anakan tersebut memiliki kedekatan genetik

tinggi. Anakan hasil kawin kerabat atau bahkan kawin sendiri (*selfing*) berpengaruh terhadap rendahnya keragaman genetik (Tambarussi, Boshier, Vencovsky, Freitas, & Sebbenn, 2017). Pengelompokan tersebut juga menunjukkan bahwa 48 anakan alam tersebut berasal dari tiga asal anakan. Biji ulin berukuran sangat besar dan berat, oleh karena itu, secara alami, biji disebarkan dengan bantuan gravitasi, sehingga biji akan terkumpul di sekitar pohon induknya (Irawan, 2011). Namun demikian, pada penelitian ini belum dapat memberikan gambaran penyebab terbentuknya 3 kelompok yang berbeda tersebut berbeda karena perbedaan populasi, daerah asal atau pohon induk, kecuali dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan penanda DNA yang lebih akurat seperti penanda *simple sequence repeats* (SSR) (Yao, Li, Long, He, & Kang, 2016).

Analisis PCoA juga menunjukkan ada 4 individu yang berasal dari 2 klon. Hal ini membuktikan bahwa sebaran anakan alam di lantai hutan alam kemungkinan berasal dari satu biji yang terbelah menjadi beberapa bagian. Seperti disebutkan di atas, bahwa keistimewaan biji ulin yang berbelah dapat tumbuh menjadi individu klon. Biji terbagi menjadi beberapa bagian karena dimakan oleh hewan pemakan biji ulin seperti orang-utan dan bajing, yang secara tidak langsung membantu dalam menyebarkan biji ulin (Irawan, 2005). Pada tanaman semak (*Lepidospartum burgessii*), yang secara alami memperbanyak dirinya secara vegetatif/klonal, cenderung memiliki keragaman genetik yang rendah karena tingginya kawin antar kerabat atau berkembangnya individu-individu klon dalam satu populasi (Williams dkk., 2016). Individu klon juga banyak ditemui pada *Eucalyptus absita* menyebabkan rendahnya nilai silang luar (*outcrossing*) dan keragaman genetik ($t_m=0,281$; $H_e=0,547$) (Bradbury dkk., 2016). Resiko terhadap populasi yang terbentuk dari individu klon adalah berkawin antar individu berkerabat atau klon dan

sebaran serbuk sari yang terbatas sehingga keragaman genetik menjadi rendah (Dering, Raczka, & Szmyt, 2016; Jolivet, & Degen, 2011). Namun demikian, pada *Quercus pyrenaica*, mampu mempertahankan keragaman genetiknya, karena disamping memperbanyak secara vegetatif melalui tunas akar, jenis ini juga memperbanyak secara generatif/ biji (Valbuena-Carabaña, & Gil, 2017).

IV. KESIMPULAN

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa 48 anakan alam ulin terdiri dari individu dengan kedekatan genetik tinggi dan beberapa individu klon. Hal ini dapat menjadi salah satu penyebab rendahnya nilai keragaman genetik ulin. Keberadaan individu dengan kekerabatan tinggi dan klon harus diwaspadai dalam program rehabilitasi atau pengayaan genetik hutan ulin, sehingga analisis genetik perlu dilakukan terhadap anakan alam/semai yang terlibat dalam program tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Kepala Pusat Rehabilitasi Hutan, Samarinda, yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan studi di arboretum Pusrehut. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Bapak Y. Triyanta dan Ibu Wahyunisari yang telah banyak membantu kegiatan analisis DNA di Laboratorium Genetika Molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Bodare, S., Ravikanth, G., Ismail, S. A., Patel, M. K., Spanu, I., Vasudeva, R., ... Tsuda, Y. (2017). Fine and local scale genetic structure of *Dysoxylum malabaricum*, a late successional canopy tree species in disturbed forest patches in the Western Ghats, India. *Conserv Genet*, 18(1), 1-15.
- Bradbury, D., Grayling, P. M., MacDonald, B., Hankinson, M., & Byrne, M. (2016). Clonality, interspecific hybridisation and inbreeding in a rare mallee eucalypt, *Eucalyptus absita* (Myrtaceae), and

- implications for conservation. *Conserv Genet*, 17(1), 193-205.
- Dering, M., Rączka, G., & Szmyt, J. (2016). Sex-specific pattern of spatial genetic structure in dioecious and clonal tree species, *Populus alba* L. *Tree Genetics & Genomes*, 12(70), 1-13. doi: 10.1007/s11295-016-1028-5
- Fijridiyanto, I. A., Mujahidin, & Hatta, H. (2011). Fenologi pohon ulin (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn.). *Paper presented at the Status konservasi dan formulasi strategi konservasi jenis-jenis pohon yang terancam punah (ulin, eboni dan Michelia)*. Bogor.
- Goto, S., Miyahara, F., & Ide, Y. (2002). Identification of the male parents of half-sib progeny from Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) clonal seed orchard using RAPD markers. *Breeding Science*, 52, 71-77.
- Harata, T., Nanami, S., Yamakura, T., Matsuyama, S., Chong, L., Diway, B. M., ... Itoh, A. (2012). Fine-scale spatial genetic structure of ten Dipterocarp tree species in a Bornean rain forest. *Biotropica*, 44(5), 586-594.
- Irawan, B. (2005). Bulian (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn.) sebagai salah satu komoditi unggulan di propinsi Jambi. *Jurnal Agronomi*, 9(1), 49-54.
- Irawan, B. (2011). Genetic variation of *Eusideroxylon zwageri* and its diversity on variety. *Paper presented at the Status konservasi dan formulasi strategi konservasi jenis-jenis pohon yang terancam punah (ulin, eboni dan Michelia)*. Bogor.
- Jaffé, R., Castilla, A., Pope, N., Imperatriz-Fonseca, V. L., Metzger, J. P., Arias, M. C., & Jha, S. (2016). Landscape genetics of a tropical rescue pollinator. *Conserv Genet*, 17(2), 267-278.
- James, E. A. & Jordan, R. (2014). Limited structure and widespread diversity suggest potential buffers to genetic erosion in a threatened grassland shrub *Pimelea spinescens* (Thymelaeaceae). *Conserv Genet*, 15, 305-317.
- Jolivet, C. & Degen, B. (2011). Spatial genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.): II. Effect of density and clonal propagation on spatial genetic structure based on simulation studies. *Tree Genetics & Genomes*, 7(3), 541-552.
- Kurokawa, H., Yoshida, T., Nakamura, T., Lai, J., & Nakashizuka, T. (2003). The age tropical rain-forest canopy species, Borneo ironwood (*Eusideroxylon zwageri*), determined by ¹⁴C dating. *Journal of Tropical Ecology*, 19, 1-7.
- Laurance, W. F. (2016). Lessons from Research for Sustainable Development and Conservation in Borneo. *Forests*, 7(314), 1-7. doi: 10.3390/f7120314
- Nurtjahjaningsih, I. L. G., Sulistyawati, P., Widyatmoko, A. Y. P. B. C., & Rimbawanto, A. (2012). Karakterisasi pembungaan dan sistem perkawinan nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) pada hutan tanaman di Watusipat, Gunung Kidul. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6(2), 65-78.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenA1Ex 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research -an update. *Bioinformatics Applications Note*, 28(19), 2537-2539.
- Shiraishi, S. & Watanabe, A. (1995). Identification of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb et Zucc and *P. thunbergii* Parl based on the polymorphism in *rbcL* gene. *Journal of Japanese Forestry Society*, 77, 429-436.
- Soerianegara, I. & Lemmens, R. H. M. J. (1994). *Plant Resources of South-East Asia* (pp. 610). Bogor, Indonesia: Prosea Foundation Bogor.
- Takeuchi, Y., Ichikawa, S., Konuma, A., Tomaru, N., Niiyama, K., Lee, S., ... Tsumura, Y. (2004). Comparison of the fine-scale genetic structure of three dipterocarp species. *Heredity*, 92, 323-328.
- Tambarussi, E. V., Boshier, D., Vencovsky, R., Freitas, M. L. M., & Sebbenn, A. M. (2017). Inbreeding depression from selfing and mating between relatives in the Neotropical tree *Cariniana legalis* Mart. Kuntze. *Conserv Genet*, 18(1), 225-234.
- Valbuena-Carabaña, M. & Gil, L. (2017). Centenary coppicing maintains high levels of genetic diversity in a root resprouting oak (*Quercus pyrenaica* Willd.). *Tree Genetics & Genomes*, 13(28). doi: 10.1007/s11295-017-1105-4
- Widyatmoko, A. Y. P. B. C., Nurtjahjaningsih, I. L. G., & Prastyono. (2011). Studi keragaman genetik pada beberapa jenis terancam punah (endangered species) menggunakan penanda RAPD. *Paper presented at the Status konservasi dan formulasi strategi*

konservasi jenis-jenis pohon yang terancam punah (ulin, eboni dan Michelia). Bogor.

Williams, E. W., Cheung, R., Siegel, C., Howard, M., Fant, J., & Havens, K. (2016). Persistence of the gypsophile *Lepidospartum burgessii* (Asteraceae) through clonal growth and limited gene flow. *Conserv Genet*, 17(5), 1201-1211.

Yao, P.-Q., Li, G.-H., Long, Q.-Y., He, L.-G., & Kang, X.-Y. (2016). Male Parent Identification of Triploid Rubber Trees (*Hevea brasiliensis*) and the Mechanism of 2n Gametes Formation. *Forests*, 7(12), 1-13. doi: 10.3390/f7120301