

Keragaman Genetik *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese Strain Tapanuli Berdasarkan Penanda Mikrosatelit

Diversity of Pinus merkusii Jungh. et de Vriese of Tapanuli Strain based on Microsatellite Markers

Ulfah Juniarti Siregar¹ dan I Made Mayun Maha Diputra¹

¹Departemen Silviculture, Fakultas Kehutanan IPB

ABSTRACT

Pinus merkusii of Tapanuli strain, which grows naturally in Tapanuli area to the south of Toba Lake, has decreased considerably due to intensive logging. This research aimed at investigating genetic diversity of strain Tapanuli Pine using microsatellite markers on its three populations, i.e. Dolok Tusam Timur, Lobugala, and Parinsoran. Leaf samples were extracted using combined CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) and DNeasy plant mini kit, then amplified using seven specific microsatellite primers from *P. merkusii* Aceh strain, i.e. pm01, pm04, pm05, pm07, pm08, pm09a, and pm12. Those primers could amplify polymorphic fragments with different sizes than reported before. Estimation of genetic diversity parameters showed that Lobugala population has the highest heterozygosity ($H_e = 0.4693$) followed by Dolok Tusam Timur ($H_e = 0.4614$) and Parinsoran ($H_e = 0.4316$). Lobugala population was closely related to Parinsoran with 0.0617 genetic distance, and separated from Dolok Tusam Timur by 0.3798 genetic distance. Partition of genetic variation showed that 81% was found within population, and only 18% was among population.

Keywords: genetic diversity, microsatellite, *Pinus merkusii*

PENDAHULUAN

Pinus merkusii Jungh. et de Vriese merupakan satu-satunya jenis dari famili Pinaceae yang dapat tumbuh secara alami di Indonesia pada ketinggian antara 200–2 000 m dpl, dengan kondisi optimal pada ketinggian antara 400–1 500 m dpl (Khaerudin 1999). *P. merkusii* dapat tumbuh baik pada tanah yang kurang subur seperti padang alang-alang. Sifatnya yang cepat tumbuh membuat pinus ini tidak memerlukan tempat tumbuh dengan persyaratan khusus. Berdasarkan sebaran geografis alaminya berada di tiga lokasi di wilayah Utara Sumatera, yaitu Aceh, Kerinci, dan Tapanuli, yang menurut Lamb dan Colling (1967) membentuk strain, Cooling (1968) menyebutnya provenansi, sedangkan Armizon *et al.* (1995) menamakannya galur *P. merkusii*. Strain Tapanuli menyebar di daerah Tapanuli, ke arah Selatan Danau Toba. Tegakan pinus alam terdapat di pegunungan Dolok Tusam, Batu Manumpak, Sialogo, Habinsaran, Dolok Sibualbuali, Dolok Sipirok, Sipagimbar, Padang Mandailing, dan Dolok Pardumahan. Pada perbukitan Dolok Saut tegakan tusam bercampur dengan pohon daun lebar dengan ketinggian tempat 1 000–1 500 m dpl (Siregar 2005).

Saat ini ekosistem daratan Tapanuli mengalami beberapa tekanan kuat yang berpotensi menghilangkan keberadaan sumberdaya hutan yang ada, seperti gangguan tanah longsor, gempa bumi, serta ilegal logging dan pembakaran hutan (Anonim 2009). Usaha pelestarian dan pembangunan hutan yang kurang serta intensitas kegiatan penebangan yang tinggi pada daerah-daerah penyebaran alami di Tapanuli Utara dan Selatan mengakibatkan populasi

pinus strain Tapanuli semakin berkurang. Sementara itu banyak kegiatan penghijauan dan reboisasi, salah satunya Gerhan, yang menggunakan strain Aceh, sehingga dapat menjadi ancaman bagi potensi genetik strain Tapanuli (Aswandi 2011), misalnya berdampak pada perubahan frekuensi gen strain Tapanuli akibat adanya strain lain yang tumbuh pada tempat tumbuh alaminya. Perubahan frekuensi gen melalui migrasi akan mempengaruhi tingkat keragaman genetik suatu populasi. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian tentang keragaman genetik menggunakan marka DNA sehingga upaya pelestarian dan pembangunan hutan, serta konservasi basis genetik strain Tapanuli dapat berjalan dengan maksimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik *P. merkusii* strain Tapanuli di dalam dan antar populasi Dolok Tusam Timur, Lobugala, dan Parinsoran. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi tentang keragaman genetik di dalam dan di antara populasi Dolok Tusam Timur, Lobugala, dan Parinsoran, serta dapat mengetahui persentase sebaran variasi genetik dan nilai indeks fiksasi (F_{ST}) untuk kegiatan pembangunan dan pelestarian hutan, serta konservasi sumberdaya genetik *P. merkusii* strain Tapanuli.

BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan Tempat

Penelitian analisis DNA dilaksanakan dari bulan Oktober 2011 sampai Agustus 2012. Penelitian ini dilakukan di *Common Laboratory* SEAMEO BIOTROP.

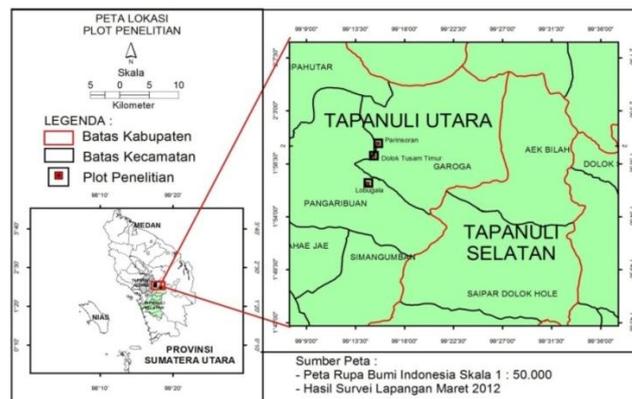
B. Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan berupa daun pinus strain Tapanuli yang diambil secara acak di tiga lokasi, yaitu populasi pinus di dalam kawasan hutan lindung Dolok Tusam Timur, populasi pinus di luar kawasan hutan lindung Dolok Tusam Timur yang masing-masing terletak di Kecamatan Garoga, dan populasi pinus di luar kawasan hutan lindung Dolok Tusam Barat yang terletak di kecamatan Pangaribuan. Kondisi tegakan di dalam kawasan hutan lindung Dolok Tusam Timur didominasi oleh *P. merkusii* yang tumbuh alami, memiliki tegakan yang rapat, dan tidak terjadi

kerusakan atau degradasi hutan. Berbeda dengan sampel Parinsoran yang diambil dari populasi pinus di luar kawasan hutan lindung Dolok Tusam Timur yang telah mengalami kerusakan sehingga menyebabkan penutupan hutan menjadi lebih terbuka. Kerusakan ini sebagian besar disebabkan oleh kegiatan penebangan hutan untuk perladangan masyarakat lokal. Populasi Lobugala berada di luar kawasan hutan lindung Dolok Tusam Barat, juga terdapat banyak aktivitas perladangan. Informasi ketiga lokasi disajikan pada Tabel 1 dan letak lokasi pada Gambar 1.

Tabel 1 Tiga lokasi pengambilan sampel daun pinus di Tapanuli

No	Populasi	Kecamatan	Kabupaten	Provinsi	Koordinat Geografis		Kondisi hutan	Jumlah Sampel
					Lintang Utara	Bujur Timur		
1	Dolok Tusam Timur	Garoga	Tapanuli Utara	Sumatera Utara	01°59'29,8"	099°15'10,0"	Tidak terdegradasi	17
2	Lobugala	Pangaribuan	Tapanuli Utara	Sumatera Utara	01°56'49,2"	099°14'39,4"	Terdegradasi	16
3	Parinsoran	Garoga	Tapanuli Utara	Sumatera Utara	02°00'41,2"	099°15'34,4"	Terdegradasi	16
Total								49



Gambar 1 Peta lokasi pengambilan sampel daun pinus di Tapanuli

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi DNA, PCR, elektroforesis, pewarnaan gel dan pengolahan data. Primer yang digunakan terdiri atas tujuh primer mikrosatelit spesifik *P. merkusii* (Nurtjahjaningsih *et al.*

2005) yang dikembangkan dari pinus strain Aceh di Jember. Pada Tabel 2 di bawah ini disajikan karakteristik ketujuh primer pm01, pm04, pm05, pm07, pm08, pm09a, dan pm12 yang digunakan dalam penelitian ini.

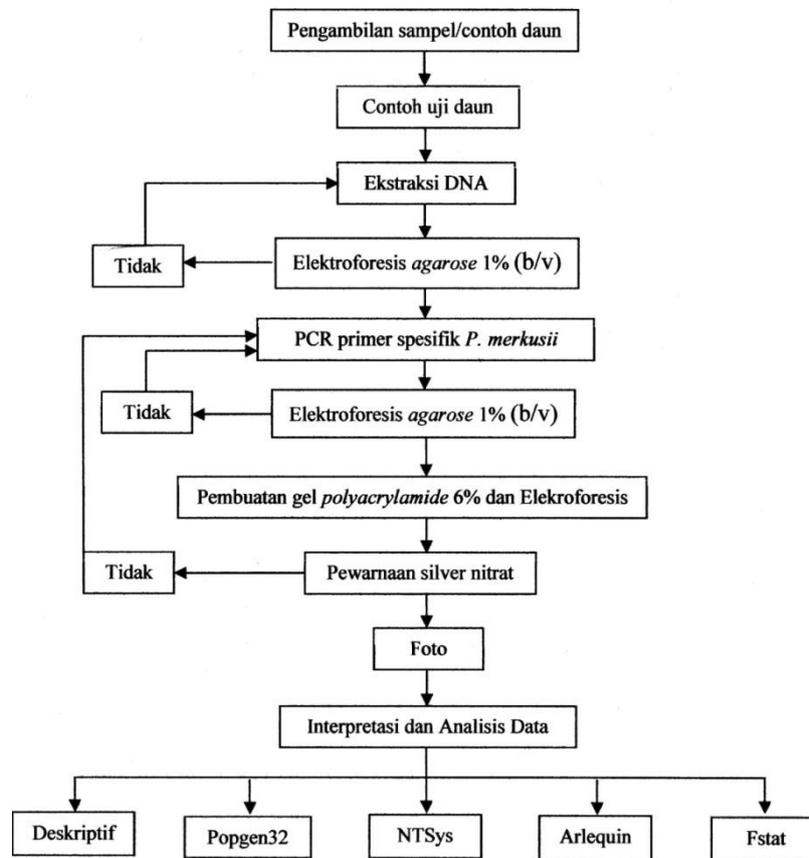
Tabel 2 Pasangan primer mikrosatelit yang digunakan (Nurtjahjaningsih *et al.* 2005)

Lokus	Ukuran produk (bp)	Ta (°C)	Motif berulang	Sekuen primer (5'-3')
pm01	111 - 117	56	(TG)12	F:AGAGAAGGCACGATTTTGTC R:TCCCACTAATCACTTTGAAAG F:CTCTAAGTAGGACAAGGCCT
pm04	92	56	(TG)10	R:CATAATCCAAGGAGTCAAGG F:GAGTCTAATTGCAAACCCCA
pm05	112 - 118	52	(TG)9	R:TGGAGATCTACCACTTTTC F:GAATCTAAGCATATGAAATGAG
pm07	284 - 309	52	(AC)8(AT)4	R:CTTGTTAATGCTACTAGTTATG F:GCTTCAATCTATTGACCCCAT
pm08	132	59	(AT)2(GT)11	R:TAAAGGGGCAGCTGCTACAACCAATGG F:CCTTCTCATTTCGATATGCAC
pm09a	81 - 99	52	(AT)5(GT)18(AT)2	R:ATTAAGGTTATATGGGGCT F:GAACAATCATTGCGGGTCCCG
pm12	181 - 193	59	(GT)5CT(GT)5(AT)5	R:TATGCTGCGTTTATATGTATAAGTGTC

Keterangan: Ta (°C) = Suhu *annealing*.

C. Prosedur Penelitian

Pada Gambar 2 diperlihatkan secara umum prosedur penelitian yang digunakan dengan metode mikrosatelit.



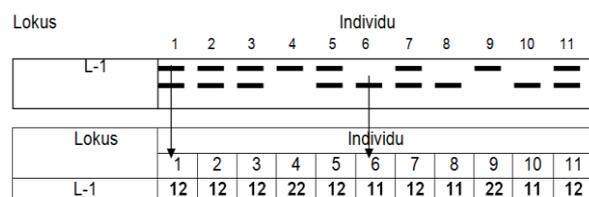
Gambar 2 Bagan tahapan penelitian.

Pada Gambar 2 diatas disajikan prosedur penelitian yang secara garis besar meliputi ekstraksi DNA, elektroforesis, PCR, pewarnaan gel, dan pengolahan data. Ekstraksi DNA dilakukan untuk mendapatkan DNA dalam bentuk larutan yang selanjutnya diuji kualitasnya pada gel *agarose* 1%. DNA yang berhasil diuji dilanjutkan ke tahapan PCR. Produk PCR yang diperoleh kembali diuji kualitasnya pada gel *agarose* 1% untuk memastikan keberhasilan produk yang dihasilkan selama proses PCR. Produk PCR yang berhasil diuji kemudian dilanjutkan ke tahapan elektroforesis gel *polyacrylamide* 6% dan pewarnaan gel. Sampel yang berhasil melalui tahapan ini kemudian dilakukan *scoring* dari pola amplifikasi pita yang muncul.

D. Analisis Data

Hasil PCR yang telah dielektroforesis difoto kemudian dilakukan *scoring* pola pita yang muncul. Cara *scoring* DNA mikrosatelit ditampilkan pada Gambar 3. Data *scoring* kemudian dianalisis dengan menggunakan *software* POPGENE 32 versi 1.31 (Yeh 1999), NTSys Ver 2.0 (Rohlf 1998), dan untuk mengetahui besarnya persentase variasi genetik pada AMOVA (*analysis of molecular variance*) digunakan *software* Arlequin versi 3.5 (Excoffier *et al.* 2011). Selain itu digunakan juga *software* Fstat versi 2.9.3.2

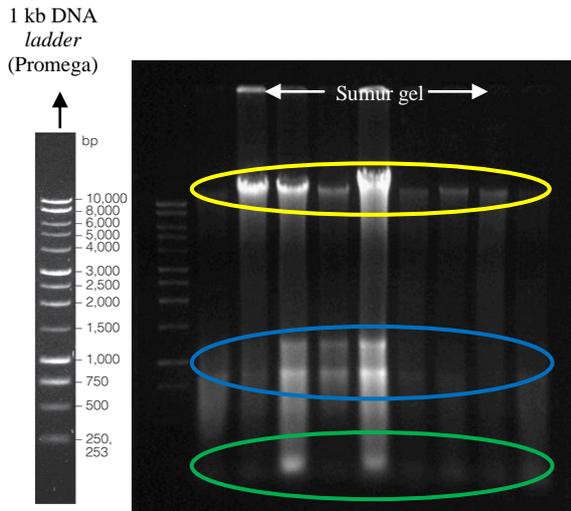
(Goudet 2002) untuk mengecek keakuratan persentase variasi genetik AMOVA. Panjang fragmen pita dihitung dengan menggunakan penggaris yang kemudian dikonversi ke dalam besaran *basepairs*.



Gambar 3 Cara *scoring* DNA mikrosatelit.
HASIL DAN PEMBAHASAN

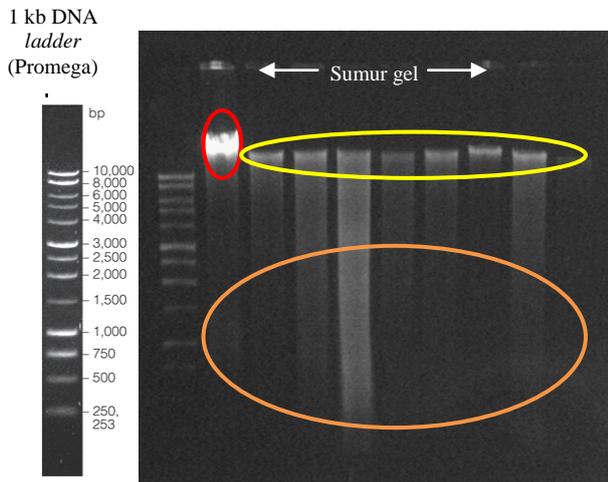
A. Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dalam penelitian ini menggunakan dua metode, yaitu CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) dan *DNeasy plant mini kit* dari QIAGEN. Kemurnian hasil pita DNA yang diperoleh dari kedua metode ini sangat berbeda. Pita DNA yang diperoleh dari metode CTAB menghasilkan pita DNA yang masih kotor, yaitu pita dengan ekor yang tebal (*smear*) masih mengandung kontaminasi protein, polisakarida, RNA (Qiagen 2001), dan masih terdapat sisa-sisa bahan kimia selama proses ekstraksi berupa fenol, kloroform, dan alkohol (Gambar 4).



Gambar 4 Contoh kemurnian pita DNA hasil ekstraksi dengan metode CTAB (garis melingkar kuning = DNA; garis melingkar biru = RNA; garis melingkar hijau = kotoran bahan-bahan kimia)

Metode *DNeasy plant mini kit* dari QIAGEN menghasilkan pita DNA yang tergolong bersih, yaitu tidak terdapat kotoran dan juga RNA (Gambar 6). Hasil tidak adanya RNA disebabkan oleh pengaruh penggunaan RNase A dalam proses ekstraksi. Enzim RNase berfungsi untuk menghancurkan RNA sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh. Kotoran berupa bahan-bahan kimia juga tidak ditemukan dalam larutan DNA hasil ekstraksi karena terdapat penyaring pada *column/tube* yang khusus digunakan pada metode ini.

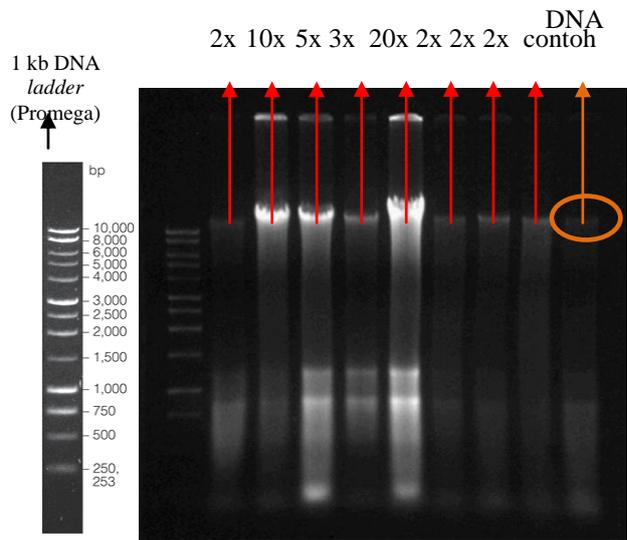


Gambar 5 Contoh kemurnian pita DNA hasil ekstraksi dengan metode *DNeasy Plant Mini Kit* dari QIAGEN (garis melingkar coklat = tidak ada RNA dan juga kotoran sisa ekstraksi; garis melingkar merah = DNA dari contoh sampel daun segar; garis melingkar kuning = DNA dari contoh sampel daun kurang segar)

Kualitas DNA hasil ekstraksi sangat menentukan tahapan PCR, karena itu sebelum digunakan DNA terlebih dahulu diuji kualitasnya dengan elektroforesis untuk mengetahui kemurniannya. Pola pita hasil ekstraksi sangat bervariasi mulai dari yang tebal sampai

yang tipis. Pengenceran DNA dilakukan menggunakan *aquabidest* steril dengan perbandingan tertentu yang mengacu pada tingkat ketebalan pita DNA yang diperoleh, yaitu pita yang tebal dan mengekor/*smear* (masih kotor) pada beberapa sampel memerlukan perbandingan pengenceran yang lebih besar, yaitu dapat mencapai 20 kali (1 μ L DNA:19 μ L *aquabidest* steril). Pengenceran bertujuan untuk mengurangi konsentrasi kontaminasi atau kotoran. Dengan demikian setiap sampel DNA yang berbeda mempunyai perlakuan pengenceran yang berbeda-beda tergantung dari kualitasnya masing-masing (Gambar 7). Pengenceran ini dimaksudkan agar pada tahap PCR primer dapat menempel pada template DNA sehingga dapat teramplifikasi.

Ketebalan pita juga dipengaruhi oleh tingkat kesegaran sampel daun yang digunakan. Sampel yang masih segar akan menghasilkan pita yang lebih tebal dibandingkan dengan sampel yang kurang segar. Ketebalan pita juga bisa berarti konsentrasi DNA lebih tinggi. Pada Gambar 6 menunjukkan bahwa sampel yang segar ditandai dengan garis melingkar merah sedangkan sampel yang kurang segar ditandai dengan garis melingkar kuning. Penyimpanan sampel dalam waktu yang lama akan menyebabkan kerusakan sel-sel daun sehingga DNA yang terkandung didalamnya akan mengalami kerusakan.



Gambar 6 Ukuran pengenceran DNA hasil ekstraksi pada sampel yang berbeda.

Ukuran DNA genom *P. merkusii* strain Tapanuli dapat diperkirakan berada di atas 10 000 bp seperti terlihat pada Gambar 4, 5, dan 6. Finkeldey (2005) menjelaskan bahwa jumlah total DNA inti dari suatu organisme tingkat tinggi berbeda-beda menurut jenis, dan biasanya bervariasi antara 10^8 sampai dengan 10^{11} pasangan basa (bps). Kandungan DNA inti jenis daun jarum mencapai 22×10^9 bps.

B. Hasil PCR dengan Primer Mikrosatelit Spesifik *P. merkusii*

Penelitian ini menggunakan tujuh primer mikrosatelit spesifik untuk jenis *P. merkusii*. Kesesuaian primer dan suhu hibridisasi primer menentukan hasil proses PCR, dimana primer yang tidak spesifik dan suhu hibridisasi yang tidak tepat dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam DNA genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah DNA genom yang teramplifikasi. Adapun ketujuh primer yang digunakan pada penelitian ini ialah pm01, pm04, pm05, pm07, pm08, pm09a, dan pm12 (Nurtjahjaningsih *et al.* 2005) mampu mengamplifikasi dan menghasilkan fragmen DNA yang polimorfik pada strain Tapanuli. Polimorfisme dapat dilihat dari posisi fragmen yang menunjukkan posisi lokus dengan alel yang berbeda. Dengan demikian ketujuh primer ini digunakan dalam penelitian ini.

Hasil elektroforesis pada gel *polyacrylamide* 6% mampu memisahkan DNA lebih sempurna karena memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dibandingkan dengan gel *agarose* 1%. Leung *et al.* dalam Munarti (2005) menyatakan bahwa penentuan ukuran dan jumlah alel yang muncul pada gel didasarkan pada asumsi bahwa pita DNA yang memiliki laju migrasi yang sama disebut homolog. Pada Gambar 8 diperlihatkan hasil elektroforesis amplifikasi DNA strain Tapanuli dengan tujuh primer mikrosatelit spesifik *P. merkusii* beserta marka yang digunakan.

Tabel 3 Perbandingan ukuran pasangan basa (*base pairs*)

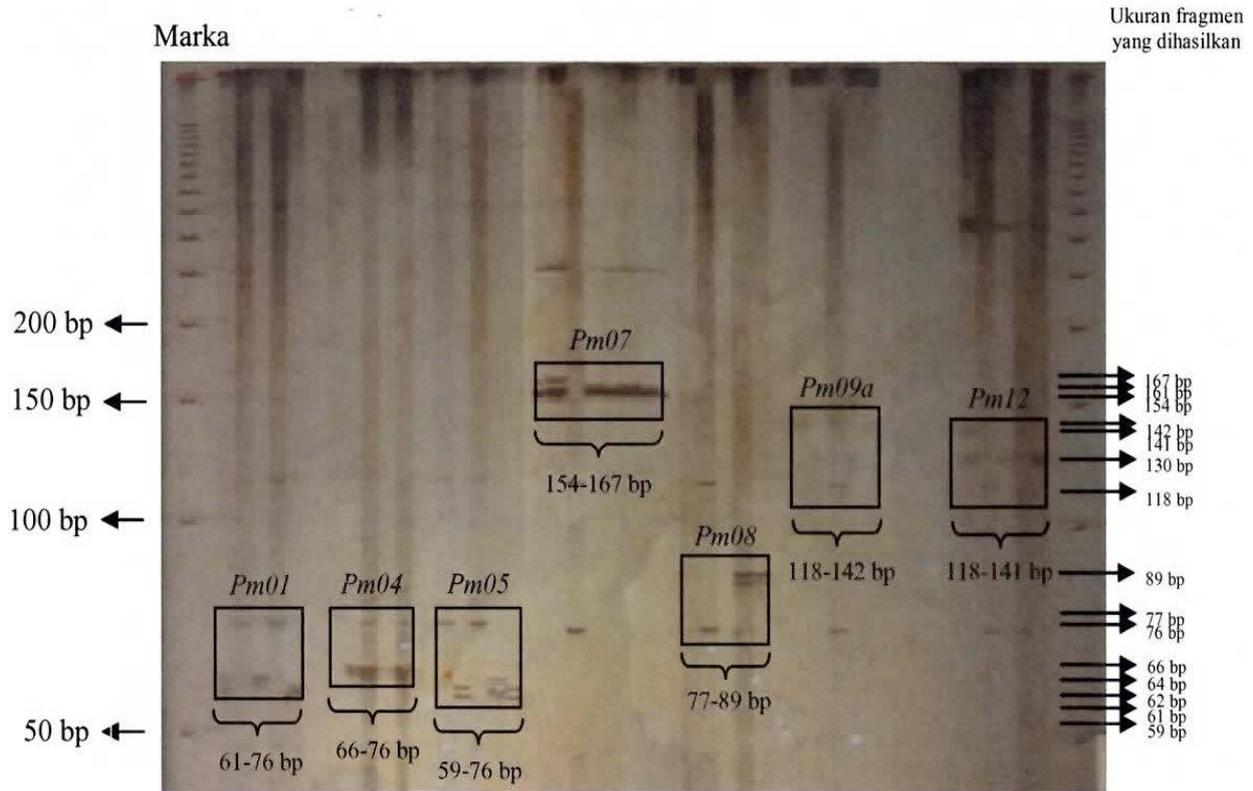
Primer	Hasil PCR menurut Nurtjahjaningsih <i>et al.</i> (2005), (bp)	Hasil PCR pada <i>P. merkusii</i> strain Tapanuli (bp)
pm01	111-117	61-76
pm04	92	66-76
pm05	112-118	59-76
pm07	284-309	154-167
pm08	132	77-89
pm09a	81-99	118-142
pm12	181-193	118-141

Ketujuh primer yang digunakan menghasilkan lokus yang polimorfik, dimana fragmen DNA atau pita *P. merkusii* strain Tapanuli yang dihasilkan memiliki ukuran base pairs (bp) yang berbeda-beda pada masing-masing primer. Pada Tabel 9 dapat dilihat ukuran fragmen yang diperoleh pada masing-masing primer berbeda dengan ukuran fragmen pada penelitian Nurtjahjaningsih *et al.* (2005).

Perbedaan ukuran fragmen yang diperoleh diduga terjadi karena bahan DNA yang digunakan berbeda. Penelitian ini menggunakan bahan DNA *P. merkusii* strain Tapanuli sedangkan bahan DNA yang digunakan oleh Nurtjahjaningsih *et al.* (2005) berasal dari kebun benih di pulau Jawa (Jember), yang secara tidak langsung berasal dari strain Aceh. Pohon induk kebun benih di pulau Jawa berasal dari satu sub populasi di Aceh (Siregar and Hettermen 2005 dalam Nurtjahjaningsih 2008).

Danarto *et al.* (2000) menyebutkan bahwa eksplorasi benih untuk meningkatkan basis genetik *P. merkusii* di Jawa telah dilakukan pada tahun 1995 terhadap populasi Janto, Takengon, dan Blangkejeren. Ketiga daerah ini terletak di Aceh dan material hasil eksplorasi ini telah ditanam di Jember dan Sumedang pada tahun 1996. Selain alasan tersebut ada kemungkinan terjadi mutasi yang dapat mengubah informasi genetik secara acak dari suatu organisme. Finkeldey (2005) memaparkan bahwa mutasi bisa terjadi pada satu sistron tunggal (misalnya mutasi titik, yakni suatu perubahan spontan dari suatu nukleotida tunggal), struktur kromosom (misalnya peleburan, perpindahan, dan pertukaran) atau jumlah gen-gen (misalnya penggandaan, poliploidi).

Handiwirawan (2006) menyatakan bahwa mutasi merupakan sumber yang utama bagi adanya variasi genetik. Mutasi akan memunculkan alel-alel baru atau merubah struktur genom dan akhirnya menghasilkan keragaman genetik. Mutasi pada tingkat molekuler terjadi dalam beberapa cara, yaitu hasil penggantian satu pasang nukleotida dengan nukleotida yang lain (substitusi basa), hasil delesi atau duplikasi dari sekuen nukleotida, dan hasil dari transposisi sekuen DNA dari satu lokasi ke lokasi lain di dalam genom organisme.



Gambar 7 Foto hasil amplifikasi DNA dengan tujuh primer spesifik *P. merkusii*.

C. Keragaman Genetik dalam Populasi

Nilai ukuran keragaman diperoleh dari hasil analisis *scoring* pita DNA mikrosatelit dengan *software* Popgen32. Pita yang di-*scoring* ialah semua pita yang terletak pada suatu lokus yang diamati. Pemberian *score* 1 bagi pita yang terletak paling atas (dekat sumur gel), *score* 2 bagi pita yang berada tepat dibawahnya. *Score* tertinggi yang diberikan tergantung jumlah alel maksimal yang ditemukan dalam suatu individu (misalnya ditemukan jumlah alel maksimal 3 maka *score* tertinggi ialah 3). Cara *scoring* pita DNA mikrosatelit disajikan pada Gambar 4. Finkeldey (2005) mengungkapkan bahwa keragaman genetik dalam populasi dapat diukur dari nilai heterozigitas individual. Adapun ukuran-ukuran yang digunakan untuk mencirikan variasi genetik dalam populasi ialah persentase lokus polimorfik (PLP), jumlah alel yang diamati (*na*), jumlah alel yang efektif (*ne*), dan heterozigositas harapan (*He*). Nilai parameter keragaman pada penelitian ini disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 Keragaman genetik tiga populasi *P. merkusii* strain Tapanuli

No	Populasi	N	PLP (%)	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>He</i>
1	DT Timur	17	100	2,4286	1,9069	0,4614
2	Lobugala	16	100	2,7143	2,0319	0,4693
3	Parinsoran	16	100	2,5714	1,8531	0,4316
	Rata-rata		100	2,5708	1,9306	0,4541

Keterangan:
 N = jumlah total individu; PLP = persentase lokus polimorfik; *na* = jumlah alel yang diamati; *ne* = jumlah alel efektif (Kimura and Crow (1964)); *He* = diferensiasi genetik Nei (1973)/heterozigositas harapan.

Pada Tabel 4 di atas dapat dilihat bahwa nilai rata-rata PLP = 100%, *na* = 2.5708, *ne* = 1.9306, dan *He* = 0.4541. Secara umum ketiga populasi *P. merkusii* dalam penelitian ini memiliki nilai keragaman genetik (*He*) yang tidak berbeda signifikan, yaitu hanya berkisar antara 0.4316 sampai 0.4693. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga populasi tersebut memiliki variasi genetik yang hampir sama, namun dari ketiga populasi tersebut populasi Lobugala memiliki nilai keragaman genetik paling tinggi, yaitu sebesar 0.4693. Nilai *He* yang paling tinggi di Lobugala diduga disebabkan oleh adanya migrasi atau *gene flow* yang berasal dari upaya rehabilitasi hutan. Lokasi kegiatan rehabilitasi hutan ini relatif dekat dengan populasi Lobugala dan telah dilakukan sejak tahun 1984. Adapun pinus yang digunakan untuk merehabilitasi hutan adalah pinus strain Aceh. Migrasi dapat meningkatkan variasi genetik, dimana migrasi alel dari suatu populasi atau spesies lain secara umum diakibatkan oleh disribusi polen atau benih (Irwanto 2006). Adams (1992) juga menyatakan bahwa pola pergerakan gen (*gene flow*) melalui serbuk sari menunjukkan jarak dan jumlah serbuk sari yang berkontribusi pada sistem perkawinan, sehingga pola pergerakan gen ini menentukan keragaman dan struktur genetik benih yang dihasilkan. Pola pergerakan gen *P. merkusii* sangat luas karena selama proses penyerbukan dan penyebaran benih sangat dibantu oleh peranan angin. Pola penyebaran serbuk sari merupakan faktor penting dalam populasi genetik, memegang peranan penting dalam pemuliaan pohon dan konservasi genetik (Nurtjahjaningsih 2008).

Lokasi pengambilan sampel pada Gambar 9 menunjukkan bahwa sampel Dolok Tusam Timur memiliki kerapatan tegakan/populasi yang lebih tinggi

dibandingkan dengan populasi Parinsoran dan Lobugala. Kerapatan yang lebih rendah pada populasi Parinsoran dan Lobugala disebabkan akibat kerusakan hutan berupa penebangan hutan yang tidak terkendali. Pembukaan lahan hutan ini dilakukan oleh masyarakat lokal untuk kegiatan perladangan. Banyak aktivitas perladangan dijumpai di kedua lokasi ini sehingga tampakutupan hutan pinus menjadi lebih terbuka (tidak menyebar rata). Kondisi demikian diduga akan menurunkan variasi genetik pada populasi Parinsoran dan Lobugala di masa datang jika tidak ada upaya konservasi dan rehabilitasi yang didukung program pemuliaan. Langkah awal program konservasi dapat ditempuh melalui rehabilitasi hutan berupa penanaman pohon dengan strain yang sama agar kondisi hutan pinus dapat pulih kembali dan kelestarian *P. merkusii* strain Tapanuli tetap terjaga. Penanaman kembali pada lahan-lahan yang telah terdegradasi akan dapat mengurangi keterbukaan tegakan hutan pinus, sehingga hutan menjadi lebih rapat. Kerapatan tegakan hutan sangat mempengaruhi tingkat keragaman genetik. Finkeldey (2005) menyatakan bahwa tegakan dengan kerapatan yang rendah akan memiliki nilai variasi genetik yang lebih rendah dibandingkan dengan tegakan yang memiliki kerapatan yang tinggi. Kerapatan yang rendah akan menghambat terjadinya aliran gen dalam populasi.

Penanaman hutan kembali di lahan-lahan terdegradasi pada populasi Parinsoran dan Lobugala menggunakan *P. merkusii* strain Tapanuli tidak sulit dilakukan karena Harahap (2000) menjelaskan bahwa *P. merkusii* tergolong jenis cepat tumbuh dan tidak membutuhkan persyaratan khusus. Selain itu Cooling (1968) juga memaparkan bahwa jenis pinus ini tidak

memerlukan persyaratan tempat tumbuh yang tinggi dan merupakan jenis pionir yang dapat tumbuh di segala jenis tanah yang berasal dari beberapa bahan induk berbeda, sehingga memiliki daerah sebaran yang luas di Asia Tenggara termasuk di wilayah Sumatra. *P. merkusii* memiliki daerah sebaran yang luas merupakan suatu indikasi atas kemampuan beradaptasi yang tinggi terhadap lingkungannya. Siregar (2000) mengungkapkan bahwa pada pohon-pohon hutan, keberadaan keragaman genetik yang berbeda dalam populasi bertanggung jawab terhadap perbedaan tingkat adaptasi dan kapasitasnya untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan karena pohon-pohon tidak mampu untuk berpindah dan berumur panjang. Jenis tanaman yang mempunyai sebaran alam yang luas akan mempunyai keragaman genetik yang tinggi, karena eksistensi tanaman pada suatu lingkungan tumbuh merupakan manifestasi kemampuan jenis tersebut tumbuh dan berkembang dalam lingkungan tumbuh yang ada (Hartl dan Clark 1989).

Kegiatan penanaman kembali yang intensif di lokasi Parinsoran dan Lobugala akan berdampak pada kondisi hutan menjadi lebih baik. Semakin bertambah populasi pinus pada kedua lokasi ini akan dapat meningkatkan basis genetik *P. merkusii* strain Tapanuli, sehingga peluang untuk mengembangkan populasi dasar menjadi lebih baik akan semakin terbuka. Populasi dasar yang baik akan mempermudah kegiatan pemuliaan seperti, penentuan spesies/provenansi, studi variabilitas, penentuan sifat-sifat yang diinginkan, serta mengembangkan dan mempertahankan basis genetik untuk kepentingan lebih lanjut.



Gambar 8 Kondisi tempat pengambilan sampel di lapangan: (a) Dolok Tusam Timur, (b) Parinsoran, (c) Lobugala

Hasil tingkat heterozigositas pada penelitian ini lebih kecil apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya (Nurtjahjaningsih *et al.* 2007; 2009), begitu pula jika dibandingkan dengan hasil penelitian Zhan *et al.* (2012) pada jenis pinus yang berbeda, yaitu *P. tabuliformis* dan *P. henryi*. Sedangkan nilai H_e dalam penelitian ini lebih besar jika dibandingkan dengan *P. pinaster* yang diteliti Nadya *et al.* (2010) dimana memiliki nilai H_e sebesar 0.432. Perbedaan nilai tingkat heterozigositas pinus yang masing-masing dianalisis berdasarkan penanda mikrosatelit yang sama diduga dipengaruhi oleh asal-usul sampel, yaitu strain dan populasi yang berbeda, jumlah sampel, termasuk jumlah

populasi, dan jumlah penanda atau lokus yang digunakan dalam penelitian. Handiwirawan (2007) menjelaskan bahwa semakin besar jumlah lokus yang diuji per individu maka hasil yang diperoleh semakin dapat diandalkan, akan tetapi jika lokus yang diuji relatif kecil maka jumlah individu yang diuji harus cukup besar. Selain itu Nei (1987) mengemukakan bahwa jika lokus yang di uji sebanyak 25 maka dianjurkan paling sedikit 20 atau 30 individu diuji untuk setiap lokusnya. Pada Tabel 5 disajikan nilai tingkat heterozigositas pada beberapa jenis pinus yang dianalisis dengan metode mikrosatelit.

Tabel 5 Keragaman genetik beberapa jenis pinus

No	Jenis	Populasi	Metode	He	Referensi
1	<i>P. merkusii</i>	Pulau Jawa	Mikrosatelit	0,489	Nurtjahjaningsih <i>et al.</i> 2007
2	<i>P. merkusii</i>	Jember	Mikrosatelit	0,508	Nurtjahjaningsih 2009
3	<i>P. pinaster</i>	Morocco	Mikrosatelit	0,432	Nadya <i>et al.</i> 2010
4	<i>P. tabuliformis</i>	Cina Utara	Mikrosatelit	0,874	Zhan <i>et al.</i> 2012
5	<i>P. henryi</i>	Cina Utara	Mikrosatelit	0,883	Zhan <i>et al.</i> 2012

D. Keragaman Genetik antar Populasi

Perbedaan genetik antar populasi dikuantifikasi oleh ukuran diferensiasi genetik, (Finkeldey 2005) yaitu jarak genetik, dan ditunjukkan lebih lanjut dengan metode pengelompokan. Jarak genetik mengukur perbedaan struktur genetik antar dua populasi pada suatu lokus gen tertentu. Pada Tabel 6 ditampilkan jarak genetik antar populasi *P. merkusii* strain Tapanuli yang diteliti.

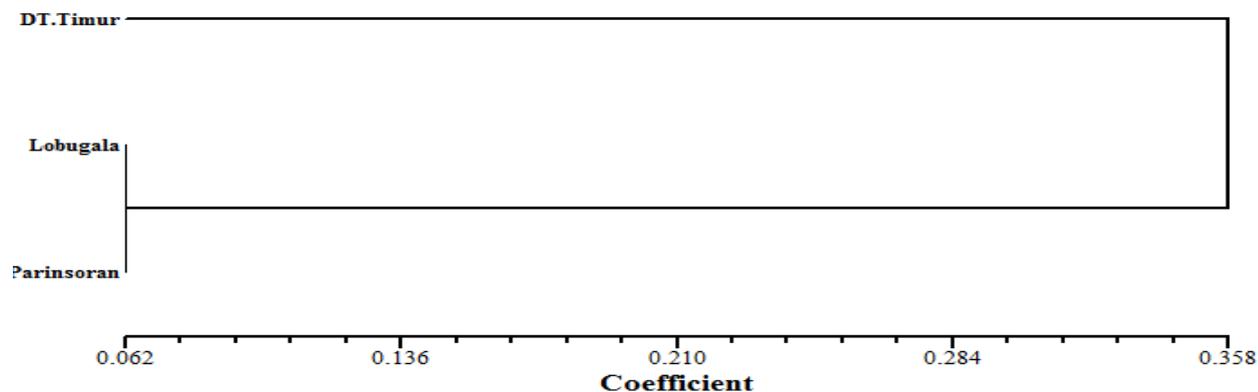
Tabel 6 Jarak genetik Nei (1972) antar populasi *P. merkusii*

Populasi	DT Timur	Lobugala	Parinsoran
DT Timur	0.0000		
Lobugala	0.3798	0.0000	
Parinsoran	0.3367	0.0617	0.0000

Tabel 6 di atas menunjukkan bahwa populasi yang memiliki jarak genetik paling besar ialah antara populasi Dolok Tusam Timur dengan Lobugala

dengan nilai jarak genetik sebesar 0.3798. Hal ini menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan kedua populasi ini cukup jauh, sedangkan populasi yang memiliki nilai jarak genetik terendah ialah populasi Lobugala dan Parinsoran, yaitu dengan jarak genetik sebesar 0.0617. Jarak genetik yang rendah mengindikasikan bahwa semakin dekat hubungan kekerabatan kedua populasi.

Pada hasil jarak genetik yang diperoleh antar populasi *P. merkusii* menurut Nei (1972) di atas, maka digambarkan dendogram jarak genetik antar populasi menggunakan metode pemasangan kelompok aritmatika tidak berbobot (*Unweighted Pair-Grouping Method with Arithmetic Averaging*, UPGMA) dengan *software Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSsys)* versi 2.01. Pada Gambar 10 disajikan dendogram jarak genetik antar populasi *P. merkusii* strain Tapanuli dengan menggunakan 7 pasang primer spesifik mikrosatelit.



Gambar 9 Dendogram hubungan antara 3 populasi *P. merkusii* berdasarkan jarak genetik Nei (1972)

Pada Gambar 9 di atas dapat dilihat bahwa ketiga populasi *P. merkusii* strain Tapanuli yang diteliti membentuk dua kelompok/klaster besar. Kelompok pertama terdiri dari populasi Parinsoran dan Lobugala, sedangkan populasi Dolok Tusam Timur terpisah dari kelompok pertama. Berdasarkan dendogram tersebut, terlihat ketiga populasi tidak mengelompok berdasarkan kedekatan lokasi satu sama lain melainkan mengelompok secara acak. Pada Gambar 2 terlihat jelas bahwa populasi Dolok Tusam Timur memisah dengan Parinsoran walaupun berdasarkan kedekatan lokasi kedua populasi ini terletak berdekatan yaitu pada Kecamatan yang sama. Populasi Parinsoran dan populasi Dolok Tusam Timur terletak pada kecamatan Garoga sedangkan populasi Lobugala terletak pada Kecamatan Pangaribuan.

Informasi tentang keragaman genetik di dalam dan antar populasi merupakan informasi dasar bagi aktivitas pemuliaan pohon di masa datang dan upaya melakukan konservasi genetik serta penelusuran asal usul bahan tanaman. Keragaman genetik menempati posisi kunci dalam program pemuliaan karena optimalisasi perolehan genetik akan sifat-sifat tertentu akan dapat dicapai manakala ada cukup peluang untuk melakukan seleksi gen untuk sifat yang diinginkan. Salah satu aktivitas pemuliaan yang dapat dilakukan untuk mengembangkan potensi genetik pinus Tapanuli ialah membangun kebun benih. Kebun benih merupakan pertanaman dari klon-klon/keturunan dari famili terpilih, diisolasi untuk menghindari atau mengurangi penyerbukan dari luar dan dikelola secara intensif untuk menghasilkan benih bermutu tinggi, terus menerus dan mudah dipanen. Dengan demikian

berdasarkan kondisi tempat tumbuh ketiga populasi, sumber benih yang baik dapat diambil dari populasi Dolok Tusam Timur sebab berada di dalam hutan lindung alami, tidak terdegradasi, serta memiliki kerapatan tegakan yang lebih tinggi sehingga nilai variasi genetik yang tinggi tetap terjaga.

Pengembangan pinus strain Tapanuli melalui pembangunan kebun benih dari berbagai sumber benih unggul merupakan langkah yang tepat untuk melestarikannya. Selain jumlahnya yang semakin berkurang di sebaran alamnya juga kegiatan pengembangan strain ini masih sangat kurang. Suhaendi (2005) memaparkan bahwa hutan tanaman pinus strain Tapanuli pernah dibuat dalam skala kecil oleh masyarakat di Kecamatan Pangaribuan dan Kecamatan Sipahutar (keduanya termasuk dalam Kabupaten Tapanuli Utara) dengan menggunakan bibit/anakan alam yang diambil secara cabutan, dan sekarang hampir habis karena pengusahaan oleh rakyat dialihkan menjadi tanaman kopi. Selain itu, Harahap (2000) juga menjelaskan bahwa pengembangan pinus strain Tapanuli tidak dilanjutkan kembali di Aek Nauli, Kabupaten Tapanuli Selatan akibat terkena serangan *Milionia basalis*.

Saat ini populasi *P. merkusi* di pulau Jawa mengalami serangan “kutu lilin” oleh hama *Pineus boeneri* sehingga banyak kerugian yang tidak sedikit baik secara ekologi maupun ekonomi. Kerugian ini terutama sangat dirasakan oleh Perum Perhutani yang mengembangkan pinus sebagai komoditi penghasil kayu dan getah. Getah pinus merupakan bahan baku gondorukem dan terpentin yang saat ini merupakan andalan pendapatan terbesar kedua Perhutani setelah produksi kayu jati (Djaelani dan Tuti 2006 dalam Windyarini 2008). Suhaendi (1988) memaparkan bahwa *P. merkusii* strain Tapanuli memiliki morfologi dan beberapa sifat pohon yang lebih baik dibandingkan strain Aceh yang selama ini telah banyak dikembangkan dan dibudidayakan di pulau

Jawa, yaitu bentuk batang ramping dan lurus, kulit batang tipis dan beralur dangkal, cabang-cabang lebih kecil, serta produksi getah lebih banyak. Selain itu, pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa populasi alami strain Tapanuli yang diteliti memiliki nilai keragaman genetik (H_e) yang cukup tinggi dan tidak terlalu berbeda jauh dibandingkan dengan strain Aceh pada penelitian Nurtjahjansingh *et al.* (2007; 2009). Berdasarkan beberapa keunggulan di atas maka mengembangkan strain Tapanuli di pulau Jawa dapat dijadikan alternatif dan kemungkinan dapat mengurangi kerugian akibat hama “kutu lilin” karena adanya strain lain berasal dari Tapanuli. Namun alternatif ini perlu dikaji lebih mendalam melalui beberapa penelitian sehingga dapat dibuktikan pengaruhnya terhadap tingkat keberhasilan pengembangan yang dilakukan.

Pinus strain Tapanuli yang lestari berarti melestarikan sumberdaya genetiknya. Upaya pelestarian sumberdaya genetik sangat terkait dengan kegiatan konservasi untuk mempertahankan keragaman atau variasi genetik suatu populasi. Keberagaman variasi genetik akan menjamin ketersediaan sumberdaya genetik apabila diperlukan. Tingkat keragaman genetik yang tinggi merupakan modal dasar dalam konservasi plasma nutfah sebab konservasi menjadi hal yang penting diperhatikan dalam rangka menjaga agar tidak terjadi penurunan basis genetik populasi dasar *P. merkusii* strain Tapanuli di masa depan.

E. Variasi Genetik dan Indeks Fiksasi (F_{ST})

AMOVA (*analysis of molecular variance*) untuk mengetahui sebaran variasi genetik dari ketiga populasi dianalisis menggunakan *software* Arlequin versi 3.5 (Excoffier *et al.* 2011) sehingga diperoleh persentase variasi seperti terlihat pada Tabel 7.

Tabel 7 *Analysis of molecular variance* (AMOVA) dari 3 populasi *P. merkusii* menggunakan 7 lokus mikrosatelit

Sumber variasi	Derajat bebas	Jumlah square	Komponen varian	Persentase variasi (%)
Antar populasi	2	27.866	0.37646	18.67
Di dalam populasi	95	155.818	1.64019	81.33
Total	97	183.684	2.01665	100.00

Indeks fiksasi (F_{ST}) = 0.1867

Hasil yang terdapat dalam Tabel 13 di atas menunjukkan bahwa sebesar 81.33% variasi genetik tersebar di dalam populasi (*within populations*) dan 18.67% tersebar di antara populasi (*among populations*) dengan nilai $F_{ST} = 0.1867$, namun berdasarkan hasil analisis data dengan *software* Fstat versi 2.9.3.2 (Goudet 2002) pada Lampiran 3 diperoleh nilai F_{ST} yang berbeda, yaitu sebesar 0.1750. Penghitungan F_{ST} dengan program Fstat dilakukan untuk mengetahui nilai F_{ST} yang lebih akurat. Hasil analisis ini menunjukkan perbedaan nilai F_{ST} yang tidak terlalu signifikan atau tidak berbeda nyata.

Indeks fiksasi (F_{ST}) merupakan ukuran diferensiasi genetik suatu populasi dengan nilai berkisar dari nol sampai satu. Nilai nol menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan secara genetik dari populasi-populasi yang diamati, sedangkan nilai satu menerangkan bahwa ada perbedaan yang sangat jelas. Nilai F_{ST} sebesar 0.1750 menunjukkan bahwa ketiga populasi *P. merkusii* strain Tapanuli yang diteliti memiliki perbedaan genetik yang sedikit. Perbedaan genetik yang sedikit menandakan ketiga populasi ini memiliki hubungan kekerabatan yang tergolong dekat satu dengan lainnya, karena sebanyak 81.33% variasi genetik terdapat di dalam masing-masing populasi

(*within populations*). Dengan demikian ketiga populasi yang diteliti secara genetik masih tergolong sama atau memiliki kemiripan genetik yang cukup tinggi satu dengan lainnya.

Pada populasi Lobugala dan Parinsoran yang telah terjadi degradasi, namun berdasarkan analisis AMOVA masih menunjukkan adanya variasi genetik di dalam populasi yang tinggi. Hal ini diduga degradasi hutan pada kedua lokasi ini belum menunjukkan dampak negatif yang besar bagi potensi genetik yang ada. Potensi genetik berupa variasi genetik yang tinggi ini dikhawatirkan akan menurun jika tidak ada upaya pelestarian pinus Tapanuli pada habitat alaminya. Upaya pelestarian pasca degradasi hutan sangat penting dan dapat dilakukan dengan teknologi silvikultur yang tepat, meliputi penanaman kembali *P. merkusii* strain Tapanuli, pemeliharaan yang intensif, dan kegiatan evaluasi keberhasilan penanaman pada lahan-lahan terdegradasi di tempat tumbuh alaminya. Keberhasilan penanaman dapat meningkatkan jumlah populasi dan potensi genetik yang ada, sehingga upaya pemuliaan dapat dilakukan dengan mudah, seperti kegiatan seleksi dan persilangan untuk mendapatkan sifat-sifat yang diinginkan, serta perbanyakkan massal untuk mewujudkan individu-individu yang diharapkan. Pemuliaan dengan konservasi tidak dapat dipisahkan karena dari areal konservasi inilah materi yang dimuliakan diperoleh, dengan demikian untuk melestarikan pinus Tapanuli sangat diperlukan kegiatan konservasi untuk mengkonservasi potensi genetik, sehingga tidak akan terjadi kepunahan pada jenis ini di masa datang.

Pada Tabel 8 menunjukkan bahwa nilai F_{ST} dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan penelitian sebelumnya dengan strain Aceh (Nurtjahjaningsih *et al.* 2007; 2009). Perbedaan yang mendasar penelitian Nurtjahjaningsih *et al.* (2007), ialah sampel berasal dari 13 populasi tetua (*parental*) berupa pohon plus yang terdapat di kebun benih semai

Jember. Ketigabelas populasi ini masing-masing berasal dari daerah yang berbeda di pulau Jawa. Adapun jumlah total sampel yang dianalisis dari ketigabelas populasi ini berjumlah 644 sampel dan hanya menggunakan 5 primer mikrosatelit spesifik *P. merkusii* (pm01, pm05, pm07, pm09a, dan pm12). Perbedaan juga ditemukan pada penelitian Nurtjahjaningsih (2009), yaitu membandingkan 2 populasi *P. merkusii* strain Aceh di kebun benih semai Jember, yaitu populasi infusi genetik dengan populasi pohon plus kebun benih. Populasi infusi genetik terdiri dari 3 populasi, yaitu Takengon, Janto, dan Blangejeren (strain Aceh) yang masing-masing berjumlah 24 sampel, sedangkan jumlah sampel populasi pohon plus kebun benih berjumlah 644 sampel. Penelitian Nurtjahjaningsih (2009) ini juga menggunakan 5 primer mikrosatelit spesifik *P. merkusii* yang sama seperti pada penelitian sebelumnya.

Nilai F_{ST} yang kecil pada penelitian Nurtjahjaningsih *et al.* (2007; 2009) menunjukkan bahwa antar populasi *P. merkusii* di kebun benih semai Jember tergolong seragam secara genetik, yaitu memiliki kemiripan genetik yang tinggi antar populasinya. Dengan demikian *P. merkusii* yang ada di pulau Jawa memiliki perbedaan genetik yang rendah antar populasinya. Berbeda jika dibandingkan dengan ketiga populasi alami strain Tapanuli yang diteliti memiliki nilai F_{ST} yang lebih tinggi, dimana mengindikasikan bahwa ketiga populasi ini memiliki perbedaan genetik yang cukup tinggi antar populasinya. Dengan demikian terkait konservasi maka strain Tapanuli memerlukan upaya konservasi yang lebih luas agar potensi genetik antar populasinya tidak hilang dan tetap lestari. Semakin besar perbedaan genetik antar populasi maka diperlukan upaya konservasi yang lebih luas agar variasi genetik yang tinggi pada masing-masing populasi tersebut tetap lestari.

Tabel 8 Diferensiasi genetik (F_{ST}) beberapa jenis pinus

No.	Spesies	F_{ST}	Referensi
1	<i>P. merkusii</i>	0,008	Nurtjahjaningsih <i>et al.</i> 2007
2	<i>P. merkusii</i>	0.003	Nurtjahjaningsih 2009
3	<i>P. pinaster</i>	0,121	Nadya <i>et al.</i> 2010
4	<i>P. tabuliformis</i>	0,316	Zhan <i>et al.</i> 2012
5	<i>P. henryi</i>	0,357	Zhan <i>et al.</i> 2012
6	<i>P. merkusii</i>	0,175	Penelitian ini

Nilai F_{ST} yang diperoleh dalam penelitian ini juga lebih tinggi jika dibandingkan dengan jenis pinus lainnya, yaitu *P. pinaster* (Nadya *et al.* 2010), yang dianalisis menggunakan marka mikrosatelit dengan 7 macam primer (PtTX-3025, PtTX-2090, PtTX-3030, PtTX-3020, PtTX-2123, PtTX-3118 dan P-7) . *P. pinaster* yang diteliti berasal dari 10 populasi alami di Morocco yang tersebar di tiga daerah yang berbeda, yaitu *Rif mountain*, *middle Atlas* dan *High Atlas*. Jumlah sampel yang diteliti setiap populasinya berkisar antara 16 sampai 35 pohon, dengan total keseluruhan sebanyak 240 sampel.

Penelitian Zhan *et al.* (2012) pada *P. tabuliformis*, dan *P. henryi* memiliki nilai F_{ST} yang lebih tinggi dari penelitian ini, yaitu masing-masing sebesar 0.316 dan 0.357 (Tabel 14). Kedua jenis pinus yang digunakan ini berasal dari 3 sistem pegunungan di Cina bagian Utara, yaitu Qinling, Daba, dan Wuling. Total populasi dari kedua pinus ini berjumlah 29 populasi alami dengan jumlah sampel pada masing- masing populasi berkisar antara 7 sampai 32 sampel. Jumlah primer yang digunakan untuk menganalisis kedua pinus ini berjumlah 10 primer, yaitu RPTest11, PtTX2123, RPS160, PtTX4001,

PtTX3116, Cjgssr124, PR4.6, RPTest1, pdms065, and pdms221. Perbedaan nilai F_{ST} (indeks fiksasi antar populasi) dari beberapa hasil penelitian di atas diduga sangat ditentukan oleh jenis pinus (termasuk strain/sumber populasi), jumlah populasi dan sampel yang diteliti, serta jumlah penanda atau lokus (primer) yang digunakan dalam analisis.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Keimpulan

Tujuh primer spesifik mikrosatelit *P. merkusii* yang dikembangkan dari strain Aceh dapat menghasilkan amplifikasi berupa pola pita yang polimorfik pada strain Tapanuli dengan ukuran fragmen berbeda. Populasi *P. merkusii* dari Lobugala memiliki tingkat heterozigositas tertinggi dengan $H_e = 0.4693$, populasi Dolok Tusam Timur memiliki nilai $H_e = 0.4614$, sedangkan populasi yang memiliki tingkat heterozigositas terendah ialah populasi Parinsoran dengan $H_e = 0.4316$. Populasi *P. merkusii* dari Dolok Tusam Timur dan populasi Lobugala memiliki hubungan kekerabatan yang paling jauh dengan jarak genetik sebesar 0.3798, sedangkan populasi Lobugala dan populasi Parinsoran memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan jarak genetik sebesar 0.0617. Variasi genetik ketiga populasi tersebar sebanyak 81.33% di dalam populasi (*within populations*) dan sebanyak 17.50% tersebar di antara populasi (*among populations*).

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian keragaman genetik lebih lanjut dengan jumlah sampel (termasuk jumlah populasi) yang lebih banyak agar dapat mewakili keragaman genetik secara menyeluruh *P. merkusii* strain Tapanuli serta perlu dilakukan upaya konservasi dan rehabilitasi yang lebih intensif serta didukung dengan program pemuliaan agar *P. merkusii* strain Tapanuli tetap lestari.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams WT. 1992. Gene dispersal within forest tree populations. *New Forest* 6:217-240.
- [Anonim]. 2009. Hutan lindung terbakar akibat penebangan liar [Internet]. [diunduh 2012 Mei 28]. Tersedia pada: <http://news.liputan6.com/read/230604/hutan-lindung-terbakar-akibat-penebangan-liar>
- Armizon, Sukmana C, Manan S. 1995. Okurasi *Pinus merkusii* Jungh et de Vriese galur Kerinci berdasarkan ketinggian tempat di hutan pegunungan Cagar Alam Bukit Tapan, Kawasan Taman Nasional Kerinci-Seblat. *Rimba Indonesia* 30(4):2-9.
- Aswandi. 2011. Selamatkan tusam Tapanuli [Internet]. [diunduh 2012 Mei 28]. Tersedia pada: <http://bpk-aeknauli.litbang.dephut.go.id>.
- Colling ENG. 1968. *Pinus merkusii Fast Growing Timber Trees of The Low Land Tropics*. Oxford: Commonwealth Forestry Institute Departement of Fprestry University of Oxford.
- Danarto S, Hardiyanto EB, Na'iem M, Suseno OH. 2000. Strategi Pemuliaan *Pinus merkusii* Generasi Kedua. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Status Silvikultur 1999*; [Waktu dan tempat pertemuan tidak diketahui]. Yogyakarta (ID): Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada. hlm 137-143.
- Excoffier L, Lischer H. 2011. *An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis Version 3.5*. Switzerland: Swiss Institute of Bioinformatics.
- Finkeldey R. 2005. *Pengantar Genetika Hutan Tropis*. Djamhuri E, Siregar IZ, Siregar UJ, Kertadikara AW, penerjemah. Göttingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding. Terjemahan dari: *An Introduction to Tropical Forest Genetic*.
- Goudet Jerome. 2002. *Fstat Version 2.9.3.2*. Switzerland: Institute of Ecology biology building UNIL.
- Handiwirawan E. 2007. Keragaman molekuler dalam suatu populasi. Di dalam: Dwiyanto K, editor. *Prosiding Lokakarya Nasional Pengelolaan dan Perlindungan Sumberdaya Genetik di Indonesia*; 2006 Des 20; Bogor, Indonesia. Jakarta (ID): Direktorat Kerjasama Multilateral Departemen Perdagangan, Kementerian Lingkungan Hidup, Pusat Kerjasama dan Pengembangan Departemen Hukum dan HAM dan Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Indonesia (PERIPI). hlm 138-144.
- Harahap RMS. 2000. Keragaman sifat dan data ekologi populasi alam *Pinus merkusii* di Aceh, Tapanuli dan Kerinci. Di dalam: Hardiyanto EB, editor. *Prosiding Seminar Nasional Status Silvikultur 1999*; [Waktu dan tempat pertemuan tidak diketahui]. Yogyakarta (ID): Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada. hlm 216-227.
- Hartl DL, Clark AG. 1989. *Principles of Population Genetics*. USA: Sinauer Inc. Sunderland.
- Irwanto. 2006. Hubungan konseptual antara keragaman dan perolehan genetik [Internet]. [diunduh 2013 Jan 11]. Tersedia pada: http://naturehealthy.webs.com/keragaman_genetik.pdf.
- Khaerudin. 1999. *Pembibitan Tanaman HTI*. Jakarta (ID): Penebar Swadaya.
- Lamb AFA, Cooling ENG. 1967. *Exploration, Utilization, and Conservation of Low Altitude Tropical Pine Gene Resources*. England: Department of Forestry, University of Oxford, Commonwealth Forestry Institute.
- Munarti. 2005. Analisis keragaman genetik jati asal Sulawesi Selatan berdasarkan marker simple

- sequence repeat (ssr) [tesis]. Bogor (ID): Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Pr.
- Nurtjahjaningsih ILG, Saito Y, Lian CL, Tsuda Y, Ide Y. 2005. Development and characteristics of microsatellite markers in *Pinus merkusii*. *Molecular Ecology Notes* 5:552-553.
- _____, Saito Y, Tsuda Y, Ide Y. 2007. Genetic diversity of parental and offspring populations in a *Pinus merkusii* seedling seed orchard detected by microsatellite markers. *Bull Tokyo Univ For* 118:1-14.
- _____. 2008. Penyebaran serbuk sari dan keragaman genetik biji yang dihasilkan kebun benih *Pinus merkusii* di Jember. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 2(3):1-13.
- _____. 2009. Potensi populasi infusi genetik untuk memperluas variasi genetik kebun benih semai *Pinus merkusii* di Jember. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 3(2):73-81.
- Nadya W, Krassimir D, Naydenov, Salim K, Abdelali B, Francine T. 2010. Genetic structure of *Pinus pinaster* Ait. populations in Morocco revealed by nuclear microsatellites. *Biochemical Systematics and Ecology* 38:73-82.
- Qiagen. 2001. *HotStarTaq PCR Handbook*. Germany: Qiagen.
- Rohlf FJ. 1998. *Numerical Taxonomy and Analysis System (NTSYSpc) Version 2.0*. New York: Departement of Ecology and Evolution Sate University of New York.
- Siregar EBM. 2005. Pemuliaan *Pinus merkusii* [Internet]. [diacu 2012 Sep 7]. Tersedia dari: <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/1042?mode=full>.
- Siregar IZ. 2000. *Genetic Aspects of the Reproductive System of Pinus merkusii Jungh. et de Vriese in Indonesia*. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Suhaendi H. 1988. Pendugaan parameter-parameter genetika-ekologi dari beberapa sifat kuantitatif dalam hutan tanaman *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese strain Tapanuli dan strain Aceh [disertasi]. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Suhaendi H. 2005. Kajian konservasi *Pinus merkusii* strain Tapanuli di Sumatra. *Analisis Kebijakan Kehutanan* 2(1):45-57.
- Windyarini E. 2008. Pengaruh tingkat defoliasi akibat serangan kutu lilin terhadap produksi getah tusam [tesis]. Yogyakarta (ID): Sekolah Pascasarjana. Universitas Gadjah Mada.
- Yeh FC, Yang R. 1999. POPGEN Version 1.31: User Guide Centre for International Forestry research. Francis: University of Alberta.
- Zhan-LL, Cheng C, Jianfang L. 2012. High genetic differentiation in natural populations of *Pinus henryi* and *Pinus tabulaeformis* as revealed by nuclear microsatellites. *Biochemical Systematics and Ecology* 42:1-9.