J. Tek. Ling	Vol.11	No.1	Hal. 61 - 69	Jakarta, Januari 2010	ISSN 1441-318X

PENAMPILAN RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA PADA Azadirachta indica A. Juss DARI TAMAN NASIONAL BALURAN

Fajarudin Ahmad dan Yuyu S. Poerba

Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Jl. Raya Bogor Km 46.5 Cibinong, Bogor
E-mail: yyspoerba@yahoo.com

Abstract

Azadirachta indica A. Juss (Apocynaceae) is a large tree of the lowland tropical rain forest of Southeast Asia that occurs in Thailand, the Malay Peninsula, on the island of Java (East Java) and Lesser Sunda Islands. Its economic value was in its wood (timber), and as medicinal plant. The information on genetic diversity of the species is very limited. Hence studies were initiated and genetic diversity estimated using RAPD markers in 27 accessions of A.indica procured from three geographical regions of TN Baluran and Balai Litbang Kehutanan. Seven selected Operon primers (10 mer) generated a total of 133 consistent amplification products ranging from 132 bp to 5.6 Kb. The cluster analysis separated the 27 individuals into 2 clusters. The range of genetic dissimilarity value among samples was from 0.07 to 0.33, while genetic distance among populations was from 0.04 to 0.10. These values showed that A. indica from TN Baluran was not genetically diverse population.

Key words: Azadirachta indica, genetic diversity, RAPD

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Mimba (*Azadirachta indica A. Juss*) merupakan jenis pohon tropis penting yang memiliki kegunaan sebagai bahan bangunan, bahan baku obat, dan biopestisida[22]. Mimba tersebar di daerah hutan kering di Pakistan, India, Sri Lanka, Myanmar, Thailand, Malaysia dan Indonesia (Jawa Timur hingga ke kepulauan Sunda Kecil). Senyawa aktif yang dikandung terutama terdapat pada bijinya yaitu azadirachtin, meliantriol, salannin, dan nimbin[1]. Azadirahtin, suatu senyawa triterpenoid yang dapat digunakan sebagai biopestisida karena bersifat "*antifeedant*" (penolak makan pada serangga) dan mengganggu pertumbuhan serta reproduksi serangga. Walaupun tumbuhan ini juga dilindungi dengan SK Mentan. 54/Kpts/Um/2/1972, yang melarang penebangan pohon berdiameter dibawah 50 cm[28], eksploitasi terhadap tanaman ini menyebabkan penurunan populasinya di alam yang secara langsung mengakibatkan berkurangnya sumber daya genetika di alam

Pemeliharaan keragaman genetik dipandang perlu untuk keberadaan/survival suatu spesies dalam jangka panjang karena keragaman genetik menyediakan potensi berevolusinya tumbuhan tersebut. Lebih jauh lagi, menurunnya keragaman genetik dengan kehilangan alel-alel tertentu menurunkan kemampuan populasi tumbuhan untuk meresponi perubahan lingkungan biotik (misalnya patogen) dan abiotik[9]. Hal-hal

tersebut menjadikan assessment keragaman genetik suatu species menjadi penting. Hingga saat ini, informasi keragaman genetik mimba sudah dilaporkan di India[19), 20), 21)], namun di Indonesia belum banyak diketahui

Marka RAPD digunakan dalam penelitian ini karena selain relatif mudah dan 'cost effective', marka ini sudah banyak digunakan pada jenis-jenis pohon kayu tropis lainnya[5), 9), 11), 12), 13), 16), 18), 19)] dan kelemahan RAPD dalam konsistensi produk amplifikasi[4)] dapat diatasi dengan mengoptimalkan ekstraksi, dan kondisi PCR serta pemilihan primer yang tepat.

1.2. Tujuan

Penelitian dilakukan untuk mengetahui keragaman genetik populasi mimba yang berasal dari TN Baluran dan koleksi Balithut dengan menggunakan penanda DNA yaitu random amplified polymorphic DNA (RAPD).

2. METODOLOGI

2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah 27 aksesi A. indica yang berasal dari 3 populasi di TN Baluran, yaitu: (1) Pantai Bama, (2) Pos Bekol, (3) Savana dan (4) koleksi Balai Penelitian Kehutanan, dengan masing-masing populasi terdiri atas 5-10 individu.. Material DNA ke-27 aksesi ini berupa potongan daun muda yang dikeringkan dengan silica gel, sesuai dengan pedoman pengambilan sampel untuk material DNA[26)].

2.2. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metoda CTAB yang dimodifikasi[2)], yaitu dengan penambahan RNase dengan konsentrasi akhir 250 µg/mL. Kuantitas setiap DNA hasil isolasi diukur dengan Flourometer (Shimadzu UV1201), sedangkan kualitasnya dilihat pada gel elektroforesis 0.8%. Hasil ekstraksi DNA yang menghasilkan kuantitas dan kualitas DNA yang cukup baik, dilanjutkan dengan *polymerase chain reaction* (PCR).

2.3. Amplikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode Williams et al.[27)] yang dimodifikasi dengan menggunakan tujuh primer RAPD terpilih, yaitu OPB-11, OPB-17, OPC-07, OPD-04, OPN-14, OPN-18 dan OPU-12 (Operon Technology Ltd), yang merupakan primer polimorfik dan sebelumnya diuji pada mimba (Poerba & Ahmad, tidak diterbitkan). Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode Williams[27)] yang dimodifikasi. Selanjutnya PCR dilakukan pada total volume 15 µl. Primer yang digunakan pada penelitian selanjutnya adalah empat primer dari Operon Technology (Tabel 2). Masing-masing tabung PCR berisi 0.2 nM dNTPs; 1.5 µl bufer reaksi; 2mM MgCl2; 10 ng DNA ; 5 pmol primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega).

Reaksi PCR dengan menggunakan thermocycler (Takara) selama 45 siklus. PraPCR pada suhu 94^0C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas denaturasi 1 menit pada suhu 94^0C, penempelan primer 1 menit pada suhu 36^0C, dan 2 menit pemanjangan pada suhu 72^0C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti pascaPCR 4 menit pada suhu 72^0C dan pendinginan pada suhu 4^0C selama 30 menit. Hasil amplifikasi difraksinasi secara elektroforesis dengan menggunakan Mupid Mini Cell pada gel agarosa 2.0% dalam bufer TEA (Tris-EDTA) selama 60 menit pada 50 V. Kemudian direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi akhir 1µg ml-1 selama 10 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA dideteksi dan difoto menggunakan Gel documentation system. Sebagai standar digunakan 100 bp DNA ladder (Promega) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

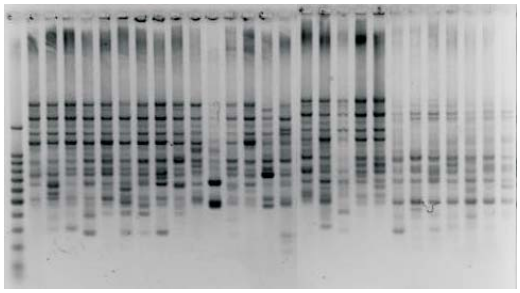
2.4. Analisis data

Setiap pita RAPD dianggap sebagai satu alel putatif. Hanya alel yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk skoring: ada (1) dan kosong (0). Matriks binari fenotip RAPD ini kemudian disusun untuk digunakan pada analisis kluster dengan menggunakan UPGMA program NTSYS-pc versi 1.80[15]. Nilai kesamaan genetika diambil dari Simple Matching Coefficient[3, 15], sedangkan nilai ketidaksamaan genetik merupakan pengurangan nilai matrix of simmilarity oleh [13]. Matrik jarak genetik antar populasi dihitung dengan menggunakan Nei's unbiased genetic distances[8] dengan program POPGENE software[29]. Dendrogram yang dihasilkan dari analisis dilihat menggunakan program TREEVIEW software[10].

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Analisa Profil RAPD

Hasil amplifikasi total genom DNA dengan menggunakan empat tujuh RAPD (OPB-11, OPB-17, OPC-07, OPD-04, OPN-14, OPN-18 dan OPU-12 dari Operon Technology), pada 27 aksesi mimba menghasilkan produk PCR yang dapat dibaca dan diskor, sehingga hasilnya dapat dianalisis. Hasil PCR dengan salah salah satu primer (OPD-04) dapat dilihat pada Gambar 1. Sekuens dari keempat primer ini dan jumlah marka RAPD yang dihasilkan tertera pada Tabel 1.



Gambar 1. Pola pita RAPD pada 27 aksesi Azadirachta indica A. Jus dengan primer OPD-04

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa diperoleh 133 fragmen DNA yang berukuran dari 132 bp hingga 5.6.kb, 77.44% diantaranya merupakan fragmen DNA polimorfik . Primer OPB-11, OPN-14 dan OPU-12 masing-masing menghasilkan 100% pita polimorfik, dengan jumlah maksimum pita polimorfik 25 terdapat pada primer OPN-14 (Tabel 1). Hal ini menunjukkan marka RAPD yang digunakan memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi (>50% pita polimorfik). Ketujuh primer menghasilkan 11-25 fragmen DNA yang dapat dideteksi dan diskor. Rata-rata setiap primer menghasilkan 19 pita yang dapat dideteksi dan diskor.

Tabel 1. Primer yang digunakan dan jumlah pita DNA hasil amplifikasi pada 27 aksesi Azadirachta indica A. Juss

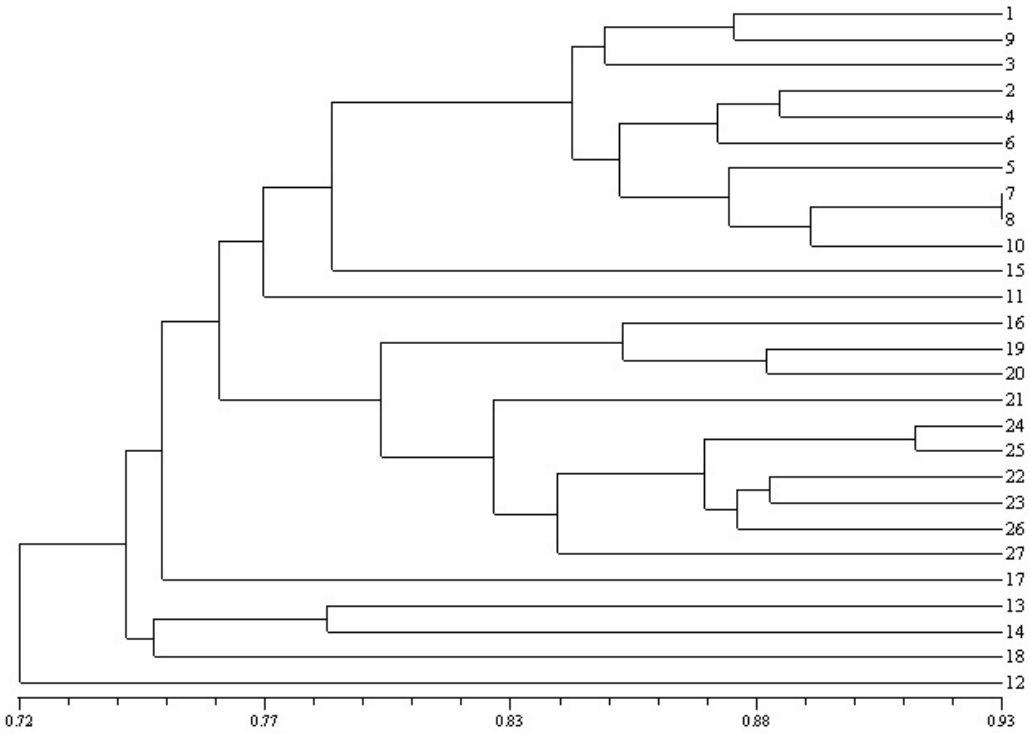
No	Kode Primer	Urutan basa	Jumlah pita	Jumlah pita polimorfik
1	OPB-11	GTAGACCCGT	21	21
2	OPB-17	AGGGAACGAG	25	23
3	OPC-07	GTCCCGACGA	11	10
4	OPD-04	TCTGGTGAGG	21	10
5	OPN-14	TCGTGCGGGT	25	25
6	OPN-18	GGTGAGGTCA	19	3
7	OPU-12	TCACCAGCCA	11	11
		Jumlah	133	103 (77.44%)

Jumlah dan intensitas pita DNA yang dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan PCR sangat tergantung bagaimana primer mengenal urutan DNA komplementernya pada cetakan DNA (DNA template) yang digunakan[24]. Hasil amplifikasi DNA A. indica menggunakan tujuh primer acak diatas tidak selalu memperoleh pita dengan intensitas yang sama. Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer sangat dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi cetakan DNA. Cetakan DNA yang mengandung senyawa-senyawa seperti polisakarida dan senyawa fenolik, serta konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau tidak jelas[25]. Selain itu, sebaran situs penempelan primer pada cetakan DNA dan adanya kompetisi tempat penempelan primer pada cetakan DNA dapat menyebabkan satu fragmen diamplifikasi dalam jumlah banyak dan fragmen lainnya sedikit. Proses amplifikasi mungkin saja diinisiasi pada beberapa tempat, namun hanya beberapa set yang dapat dideteksi sebagai pita sesudah diamplifikasi[25]. Pemilihan primer pada analisis RAPD berpengaruh terhadap polimorfisme pita yang dihasilkan, karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri. Akibatnya, pita DNA polimorfik yang dihasilkan setiap primer menjadi berbeda, baik dalam ukuran banyaknya pasang basa maupun jumlah pita DNA.

Analisis kluster antar individu dan antar populasi

Analisis kluster kesamaan genetik pada 27 sampel A. indica menunjukkan pemisahan sampel kedalam kluster-kluster yang mengelompok sebagian berdasarkan populasinya (B, koefisien kesamaan 0.84), sebagian secara acak (C, koefisien kesamaan 0.79; dan D, koefisien kesamaan 0.75) (Gambar 2). Dendrogram menunjukkan satu kluster utama (A; koefisien kesamaan 0.74), dan satu individu no 12. Kluster A merupakan kelompok yang terdiri dari subkluster B (koefisien kesamaan 0.84), dan C (koefisien kesamaan 0.79) dan D (koefisien kesamaan 0.75), serta individu-individu yang tersebar diantaranya.

Fenomena lain dari hasil analisis kluster ini adalah mengelompoknya individu dari populasi yang berlainan ke dalam satu kluster. Hal ini mengindikasikan adanya genetic flow pada A. indica, yang mungkin disebakan adanya rekombinasi genetik yang terjadi. Hal ini menunjukkan adanya persamaan properti genetik dari berbagai populasi, yang mengindikasikan sempitnya keragaman genetik pada A. indica di TN Baluran.



Gambar 2. Dendrogram 27 aksesi Azadirachta indica A. Jus

Keterangan: 1-10 = Kehutanan, 11-15 = Pantai Bama, 16-22= Pos Bekol, dan 23-27= Savana.

Dendrogram dibuat berdasarkan UPGMA (*unweighted pair group with arithmeatic average*) program NTSYS-pc (*numerical taxonomy system*) versi 2.0[15]. Nilai kesamaan genetika diambil dari *Simple Matching Coefficient 3*),[15].

Nilai ketidaksamaan genetik untuk ke-27 sampel berkisar dari 0.06 – 0.33, yang tertinggi (0.33) terdapat antara aksesi l3 (Pantai Bama) dan 23 (populasi Savana) dan paling rendah (0.06) antara aksesi 7 dan 8 (keduanya termasuk dalam populasi Koleksi Balai Penelitian Kehutanan). Hal ini menunjukkan adanya keragaman genetik antar individu dan antar populasi yang sempit. Pendugaan pertama adalah mekanisme penyerbukan pada tanaman ini cenderung menyerbuk sendiri, atau persentasi persilangan sendiri lebih besar dari pada penyerbukan silang. Selain itu, mungkin populasi tanaman mimba di TN Baluran tida terlalu banyak. Tanaman ini diintroduksi ke TN Baluran hanya di bagian pinggir hutan, bukan tanaman yang dominan di TN Baluran. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa tumbuhan ini menyerbuk sendiri. Hal yang sama juga ditunjukkan dengan penampilan morfologi tumbuhan mimba, yang tidak menunjukkan perbedaan.

Keragaman genetik antar individu pada tiap populasi dapat dilihat pada Tabel 2. Populasi 2 (Pantai Bama) memiliki nilai na, ne, dan He tertinggi dibandingkan dengan populasi lainnya yaitu na = 1.4361+0.4978, ne = 1.2043+0.2945, PLP = 43.61% dan He = 0.1297+0.1674. Sedangkan populasi 4 (Savana) menunjukkan nilai keragaman genetik yang paling rendah dengan

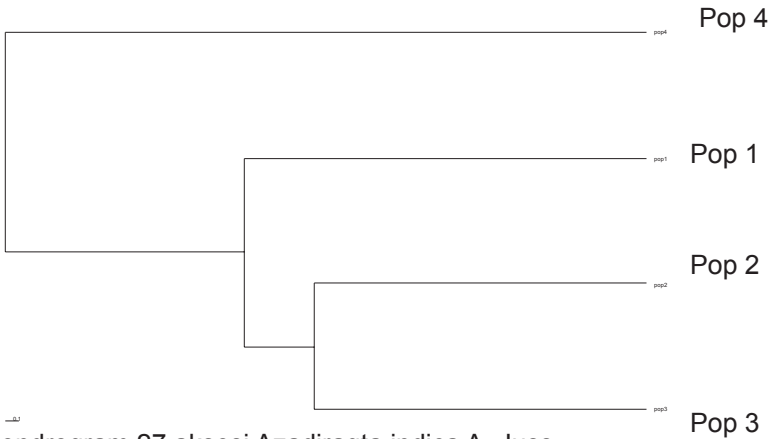
nilai rata-rata na = 1.2556+0.4379, ne = 1.1210+ 0.2529, PLP = 25.56% dan He = 0.0761+0.1445. Hal ini mengindikasikan bahwa di daerah populasi 2 (Pantai Bama) persilangan antar individu terjadi dengan persentasi yang lebih tinggi dibandingkan di daerah lain. Namun demikian, analisis lebih mendalam diperlukan dengan menggunakan aksesi dari populasi lain dan primer yang lebih banyak untuk membuktikan hasil ini. Sedangkan Populasi 4 (Savana) merupakan populasi yang memiliki keragaman genetik yang paling rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa populasi mungkin berasal dari induk yang terbatas atau sama.

Selanjutnya untuk mengetahui bagaimana sebaran fenotip RAPD antar populasi, dibuat dendrogram pengelompokkan berdasarkan jarak genetik Nei[8)] (Gambar 3). Dendrogram yang dibuat dengan metoda UPGMA menunjukkan hubungan kekerabatan genetik antara populasi yang dianalisis berdasarkan matrik Nei's genetic distance diantara populasi (Tabel 4). Secara umum, populasi A. indica membentuk 2 dua kelompok. Kelompok pertama, terdiri atas populasi 4 (Savana), kelompok kedua terdiri atas populasi 1 (Kehutanan), 2 (Pantai Bama) dan 3 (Pos Bekol) yang mengelompok menjadi satu yang menunjukkan kesamaan properti genetik.

Tabel 2. Properti genetik 4 populasi Azadirachta indica A. Juss

Populasi	Ukuran sample	Na	Ne	Persen Lokus polimorfik	H
1	10	1.3609 + 0.4821	1.1461+0.3735	36.09 %	0.0914+0.1533
2	5	1.4361+0.4978	1.2043+0.2945	43.61 %	0.1297+0.1674
3	7	1.4361+0.4978	1.1627+0.2666	43.61 %	0.1061+0.1508
4	5	1.2556+0.4379	1.1210+0.2529	25.56%	0.0761+0.1445

Keterangan: Populasi 1 = Kehutanan, Populasi 2 = Pantai Bama, Populasi 3 = Pos Bekol, dan Populasi 4= Savana.
* na = Observed number of alleles
* ne = Effective number of alleles
* h = Nei's7) gene diversity



Gambar 3. Dendrogram 27 aksesi Azadiragta indica A. Juss

Keterangan:
*) Dendrogram dibuat berdasrakan Nei's[6)] Genetic distance: Method = UPGMA (Modifikasi dari NEIGHBOR procedure of PHYLIP Version 3.50)[29)].
**) Keterangan: Populasi 1 = Kehutanan, Populasi 2 = Pantai Bama, Populasi 3= Pos Bekol; Populasi 4= Savana

Nilai *pairwise genetic distance* [8] di antara populasi yang diuji tertera pada Tabel 4. Nilai jarak genetik di antara populasi berkisar dari 0.0447 – 0.1026. Jarak genetik tertinggi (0.1026) terdapat antara populasi 2 (Pantai Bama) dan 4 (Savana), sedangkan jarak genetik terdekat (0.0447) terdapat antara antara populasi 2 (Pantai Bama) dan 3 (Pos Bekol), yang menunjukkan bahwa kedua populasi memiliki properti genetik yang mirip, kemungkinan kedua populasi berasal dari sumber yang sama.

Tabel 4. Nilai jarak genetik Nei8) pada empat populasi Azadirahta indica A. Juss

Populasi	1	2	3	4
1	***			
2	0.0518	***		
3	0.0564	0.0447	***	
4	0.1019	0.1026	0.0540	***

Keterangan: Populasi 1 = Kehutanan, Populasi 2 = Pantai Bama, Populasi 3= Pos Bekol; Populasi 4= Savana

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai ketidaksamaan genetik antar individu (0.06 – 0.33) pada jelutung lebih tinggi daripada nilai jarak genetik antar populasi (0.04-0.10). Hal yang sama juga terdapat pada tumbuhan tropis lain yang memperlihatkan keragaman genetik yang tinggi, dan kebanyakan terjadi dalam populasi[9), 23)], khususnya dalam cendana[14), 17)].

Upaya konservasi dan pembudidayan dan pemuliaan A. indica hendaknya didasarkan atas kondisi properti genetika setiap populasi dan individu dalam setiap populasi, khususnya populasi 2 (Pantai Bama) yang memiliki keragaman genetik tertinggi di TN Baluran perlu mendapat perhatian dalam pelestariannya.

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk memperoleh gambaran yang lebih menyeluruh mengenai kondisi keragaman genetika mimba di berbagai populasi yang ada di TN Baluran dan daerah konservasi lainnya dengan menggunakan lebih banyak primer RAPD dan/atau dengan menggunakan marka molekuler selain RAPD untuk mendeteksi keragaman genetika

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Keragaman genetik 27 koleksi A. indica dapat dideteksi dengan menggunakan marka RAPD. Dari tijuh primer RAPD (OPB-11, OPB-17, OPC-07, OPD-04, OPN-14, OPN-18 dan OPU-12 dari Operon Technology), diperoleh 133 pita DNA, 77.44% diantaranya merupakan pita polimorfik. Dendrogram hasil analisis kluster menunjukkan terdapat dua kluster, yang sebagian besar mengelompok berdasarkan populasinya. Nilai ketidaklsamaan genetik antar individu mimba berkisar antara 0.06 – 0.33, sedangkan nilai jarak genetik antar populasi pada mimba lebih rendah yaitu 0.04-0.10.42. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keragaman genetik mimba di TN Baluran tidak terlau luas. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk memperoleh gambaran yang lebih menyeluruh mengenai kondisi keragaman genetika mimba di berbagai populasi yang ada di TN Baluran daerah konservasi lainnya dengan menggunakan lebih banyak primer RAPD dan/atau dengan menggunakan marka molekuler selain RAPD untuk mendeteksi keragaman genetika.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terselenggara atas bantuan dana dari Program DIPA: Pengembangan BNA Bank Flora dan Fauna Indonesia Tahun 2007.

DAFTAR PUSTAKA

1. Biswas, K., I. Chattopadhyay, R.K. Banerjee and U. Bandyopadhyay. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem *(Azadirachta indica).* Current Science 82(11):1344.
2. Delaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. Plant Molecular Biology Reporter 4:19–21.
3. Dunn, G. dan B.S. Everitt. 1982. *An Introduction to Mathematical Taxonomy.* Cambridge University Press. Cambridge. 152 pp.
4. Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castagiole, M.O. Winfield, F. Sala, C. Van del Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettsshneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevschi, N. Marmiroli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vasquez and A. Karp. 1997. A Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding 3(5):382-390.
5. Mori, E.S., P.Y. Kageyama, R.F. de A Veiga, L. Zimback, J.R.S. Mello Junior. 2004. Genetic structure *of Trichilia pallida Swartz* (Meliaceae) populations by RAPD markers. Scientia Forestalis 65:114-119.
6. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist 106:283-292.
7. Nei, M 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natil Acad Sci. USA 70:3321- 3323.
8. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
9. Pither, R., J.S. Shore and M. Kellman. 2003. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. Heredity 91(3):3017-313.
10. Page, R,D,M. 1998. TreeView (Win 32). Available at: ttp://www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html.
11. Poerba, Y.S. 2007. Studi keragaman genetik pulai *[Alstonia scholaris* (L) R.Br.] berdasarkan marka Random Amplified Polymorhic DNA. Berita Biologi 8(5):353-363.
12. Poerba, YS., AH Wawo dan KS Yulita. 2007. Keragaman fenotipe RAPD *Santalum album* L. di Pulau Timor bagian timur. Berita Biologi 8(6):525-534.ISSN 0126-1754.
13. Rath, P., G. Rajaseger, C. J. Goh, and P. Kumar. 1998. Phylogenetic analysis of Dipterocarps using Random Amplified Polymorphic DNA markers. Annals of Botany 82: 61-65.
14. Rimbawanto, A., A.Y.P.B.C. Widyatmoko dan Harkingto. 2006. Keragaman populasi *Eusideroxylon zwageri*Kalimantan Timur berdasarkan penanda RAPD. Jurnal Penelitian Hutan Tanaman 3(3):201-208.
15. Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis. Version 1.80.Applied Biostatistics Inc.
16. Runo, M.S., G.M. Muluvi and D.W. Odee. 2004. Analysis of genetic structure in *Melia volkensii* (Gurke.) populations using random amplified polymorphic DNA. African Journal of Biotechnology 3 (8):421-425.
17. Shashidhara, G., M.V. Hema, B. Koshy and A.A. Farooqi. 2003. Assessment of genetic diversity and

identification of core collection in sandalwood germplasm using RAPDs. Journal of Horticultural Science & Biotecnology 78(4):528-536.

18. Siregar U.J., E. Sudarmonowati and N.S. Hartati. 1998. Development of RAPD protocol for *Shorea laevis*. Annales Bogorienses 5(2):85-92.
19. Singh, D.R.P., R. Singh, K. Malik, and G.J. Randhawa. 2005. Assessment of genetic diversity and genetic relationship among 29 populations of *Azadirachta indica* A. Juss. Using RAPD marker. Genetic Resources and Crop Evolution 52(3)285-292.
20. Singh, A., M.S. Negi, J. Rajagopal, S. Bhatia, U.K. Tomar, P.S. Srivastava and M. Lakshmikumaran. 1999. Assessment of genetic diversity in Azadirachta indica using AFLP markers.Theorytical and Applied Genetics 99 (1-2):272-279.
21. Singh, A., A. Chaudhurya, P.S. Srivastava, M. Lakshmikumaran. 2002. Comparison of AFLP and SAMPL markers for assessment of intra-population genetic variation in Azadirachta indica A. Juss. Plant Science 162 (1):17-25.
22. Sunarno, B., N. Tonanon and S. Noshiro. 1995. Azadirachta AHL Juss. In: *Plant Resources of South-East Asia No 5(2). Timber trees: Minor commercial timbers.* R.H.M.J.Lemmnens and W.C. Wong (Editors). Backhuys Publishers, Leiden. pp. 72-78.
23. Telles, M.P.C., A.S.G. Coelho, L.J. Chaves, J.A.F. Diniz-Filho, and F. D'Ayala Valva. 2003. Genetic diversity and population structure of Eugenia dysenterica DC. (cagaiteira - Myrtaceae) in Central Brazil: spatial analysis and implications for conservation and management. Conservation Genetics 4:685-695.
24. Tingey, S.V., J.A. Rafalski and M.K. Hanafey. 1994. Genetic analysis with RAPD markers. In: *Plant Molecular Biology.* C. Coruzzi and P. Puidormenech (Eds.) p.491-498.
25. Weeden, N.F., G.M. Timmerman, M. Hemmat, B.E. Kneen and M.A. Lodhi. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series CSSA/ ASHS/AGA. Minneapolis, 1 November 1992.
26. Widjaja, E.A. dan Y.S. Poerba. 2004. Pengumpulan data plasma nutfah dan genetika. Dalam: *Pedoman Pengumpulan Data Keanekaragaman Flora.* Rugayah, E.A. Widjaya dan Praptiwi (Editor). Pusat Penelitian Biologi –LIPI. Pp. 113-140.
27. Williams, JG, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalsky and SV Tingev. 1990. DNA plolymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acid Res. 18(22):6531-6535.
28. Wiriadinata, H. 2001. Tumbuhan. Dalam: *Jenis- jenis hayati yang dilindungi perundang-undangan Indonesia.* Noerdjito, M. and I. Maryanto (Eds). Balitbang Zoologi (Museum Zoologicum Bogoriense) Puslitbang Biologi-LIPI & The Nature Conservancy. 221p.
29. Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 1999. Popgene Version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Available at: http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm.