

VARIASI FENOTIP DAN GENOTIP EBONI (*Diospyros celebica* Bakh) PADA HUTAN ALAM DAN HUTAN TANAMAN DI SULAWESI TENGAH DAN SULAWESI BARAT

Wahyuningsih¹, Muslimin², Yusran²

Jurusan Kehutanan, Fakultas Kehutanan, Universitas Tadulako
Jl. Soekarno-Hatta Km. 9 Palu, Sulawesi Tengah 94118

¹Mahasiswa Fakultas Kehutanan Universitas Tadulako

²Staf Pengajar Fakultas Kehutanan Universitas Tadulako

Abstract

The aim of this research are to know phenotype and genotype diversity between population of ebony on the forest in Sulawesi specially from Central Sulawesi and West Sulawesi. The study was conducted from January to April 2014, extraction of DNA has been done in laboratory of Biotechnology, faculty of Mathematics and Natural Science, Tadulako University and DNA analysis in Kyoto Prefectural University, Japan. PCR-RAPD technique was employed in this study with 4 RAPD primers. Sample from 9 population in natural forest and plant forest in Central Sulawesi and West Sulawesi and all leaf sample taken show different. There were 2 primary that resulting the best amplifying quality in genotype diversity analysis that was TCH05 and AS9870. There is unique bands on DNA fragment from Lende area, has band size 2500-3000bp while from ebony individu sample from other area locus cannot be found. Based on dendogram analysis on distance matrix revealed the 10 genotypes were grouped into two main groups. The first group population from Lende. The second group was further divided into two sub group (2A and 2B). Subgroup 2A consisted of *Diospyros kaki*. Subgroup 2B included population from Ako, Tibo, Bale, Tompe, Maleali, and Kasimbar.

Key words: *Diospyros celebica* Bakh, RAPD, Phenotyp and Genotype Variation

PENDAHULUAN

Eboni (*Diospyros celebica* Bakh) sebagai spesies asli Indonesia banyak tumbuh di Pulau Sulawesi sehingga menjadikan flora ini sebagai tanaman endemik dengan daerah penyebaran di Sulawesi Tengah, Sulawesi Utara dan Sulawesi Selatan (Alrasyid, 2001). Tingginya harga jual eboni (*Diospyros celebica* Bakh) baik di dalam maupun di luar negeri mengakibatkan semakin maraknya ilegal logging dan penyelundupan keluar negeri akibatnya populasi eboni (*Diospyros celebica* Bakh) semakin berkurang. Saat ini statusnya dikategorikan sebagai tumbuhan yang mulai langka (SK Mentan No.54/kpts/Um/2/1972), sehingga dikhawatirkan akan punah. Hal ini selain disebabkan karena eksploitasi yang berlebihan, juga karena kurangnya upaya pelestarian dan konservasinya.

Plasma nutfah perlu dijaga kelestariannya karena sangat penting dalam hal pemuliaan dan konservasi. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah studi keragaman genetik eboni (*Diospyros celebica* Bakh). Adanya variasi dalam suatu jenis perlu diketahui lebih dahulu sebelum memulai kegiatan pemuliaan pohon. Penggunaan ekspresi morfologi yang didasarkan pada sifat fenotip berupa morfologi buah, daun, dan kenampakan batang belum dapat dijadikan dasar utama untuk perbedaan sifat yang tetap, terutama bila ingin menggunakan keunggulan genetik dari pohon tersebut. Informasi yang diperoleh secara fenotip ini seringkali memberikan hasil yang tidak konsisten, karena karakter yang tampak bukan semata-mata menggambarkan informasi secara genetik tetapi sudah dipengaruhi oleh lingkungan. Oleh karena itu keturunan yang diperoleh dari hasil persilangan ini sering

kali mengalami perubahan karakter ke arah yang tidak diinginkan, terlebih bila karakter tersebut lebih dipengaruhi oleh lingkungan (heritabilitas rendah). Seperti yang dikemukakan oleh Prasetyono, dkk. (2003) bahwa seleksi yang berdasarkan fenotip saja akan menemui kesulitan karena kondisi lingkungan yang bervariasi. Dengan melihat kelemahan-kelemahan dari teknik pemuliaan konvensional serta untuk memperkuat hasil identifikasi berdasarkan sifat fenotipe, perlu diteliti pengaruh dari faktor genetika terhadap keragaman pertumbuhan tanaman eboni (*Diospyros celebica* Bakh). Pendekatan melalui molekuler merupakan salah satu cara yang tepat dan cepat yang dapat dilakukan untuk mengetahui potensi genetik eboni (*Diospyros celebica* Bakh). Salah satunya melalui penggunaan metode penanda genetik molekuler RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Oleh karenanya, informasi mengenai keragaman eboni (*Diospyros celebica* Bakh) khususnya di Daerah Sulawesi Tengah dan Sulawesi Barat baik secara fenotip dan genotip perlu diketahui sehingga upaya konservasi genetik secara *in situ* dan *ex situ* dapat dilakukan secara baik, serta dalam hal

upaya pemuliaan dalam rangka pengembangan untuk berbagai tujuan khususnya seperti menciptakan sifat genetik unggul. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman fenotip dan genotip antar populasi eboni (*Diospyros celebica* Bakh) dari berbagai hutan alam dan hutan tanaman khususnya yang berada di Sulawesi Tengah dan Sulawesi Barat.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2014 hingga April 2014, ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas MIPA Universitas Tadulako, dan analisis DNA dilakukan di Kyoto Prefectural University, Japan. Pengambilan sampel daun untuk analisis fenotip dan genotip dilakukan pada populasi hutan alam dan hutan tanaman eboni (*Diospyros celebica* Bakh) yang tersebar di daerah Sulawesi Tengah dan Sulawesi Barat, yang disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Letak geografis, ketinggian tempat, diameter dan tinggi pohon serta pH tanah, pada lokasi pengambilan sampel daun eboni (*Diospyros celebica* Bakh)

No	Lokasi	Letak Geografis	Ketinggian (dpl)	Diameter dan Tinggi	PH
1.	Kasimbar Sulawesi Tengah	S 00 ⁰ 07,548' E 119 ⁰ 57,479'	65 m	D = 38,21 cm T = 11 m	5,2
2.	Kasimbar 2 Sulawesi Tengah	S 00 ⁰ 08,588' E 119 ⁰ 58,466'	59 m	D = 45,38 cm T = 25 m	5
3.	Kasimbar 3 Sulawesi Tengah	S 00 ⁰ 06,412' E 119 ⁰ 48,122'	22 m	D = 28,18 cm T = 9 m	5,4
4.	Bale Sulawesi Tengah	S 00 ⁰ 14,978' E 119 ⁰ 47,848'	323 m	D = 57,3 cm T = 35 m	6,2
5.	Tibo Sulawesi Tengah	S 00 ⁰ 30,993' E 119 ⁰ 46,178'	2 m	D = 23,22 cm T = 10	6,2
6.	Maleiali Sulawesi Tengah	S 00 ⁰ 07,548' E 119 ⁰ 57,479'	215 m	D = 13,69 cm T = 9 m	7
7.	Lende Sulawesi Tengah	S 00 ⁰ 25,472' E 119 ⁰ 46,178'	10 m	D = 25 cm T = 10 m	6
8.	Tompe Sulawesi Tengah	S 00 ⁰ 19,154' E 119 ⁰ 45,412'	15 m	D = 30 cm T = 11 m	6
9.	Ako Sulawesi Barat	S 01 ⁰ 09,239' E 119 ⁰ 23,281'	61 m	D = 30,57 cm T = 11 m	6

Metode Penelitian

1. Metode survey, berupa interview dengan warga pemilik tegakan eboni (*Diospyros celebica* Bakh), yang mencakup identitas pemilik, tahun penanaman, sumber bibit, serta observasi daun
2. Metode eksplorasi, berupa hasil analisis DNA yaitu hasil skoring pola pita DNA dengan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)
3. Metode deskriptif, berupa deskripsi sifat fenotip dan penentuan penanda DNA berdasarkan teknik RAPD yang sesuai dengan eboni (*Diospyros celebica* Bakh)

Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel di lapangan berasal dari tegakan yang diambil secara acak di beberapa hutan berupa diameter batang, tinggi pohon, titik koordinat, ketinggian, serta pH tanah. Sampel daun dari lapangan diberi label, diukur, dan dideskripsikan kemudian ditempatkan dalam wadah plastik tertutup yang sebelumnya telah diberi *ice*.

Ekstraksi DNA. Berdasarkan QIAGEN HotStarTaq™ PCR Handbook : 100 mg sampel daun eboni, ditambahkan liquid nitrogen, 400 µl buffer API, 4 µl enzim Rnase lalu dihomogenkan dengan vortex, dipanaskan dalam tabung eppendorf, ditambahkan 130µl buffer AP2 dan dimasukkan ke refrigerator selama 5 menit, centrifuge selama 5 menit suhu 125°C, pindahkan ke tabung *QIAshredder Mini Spin Column* dan spin 2 menit, pipet 300 µl kemudian ditambahkan 400 µl buffer AP3 dan spin 1 menit, buffer AW 500µl dan spin 1 menit, 500 µl buffer AW dan spin 2 menit, 100 µl buffer AE, diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang dan 1 menit.

PCR dan Analisis RAPD. Template DNA dari masing-masing individu eboni (*Diospyros celebica* Bakh) diuji dengan 4 primer RAPD. Proses PCR dilakukan dengan 30 siklus, diawali denaturasi pada 94°C selama 2 menit, kemudian 30 siklus berikutnya yang terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu 55°C selama 45 detik, dan perpanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 30 detik. Tahap terakhir dilanjutkan dengan perpanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72°C selama 5 menit dan

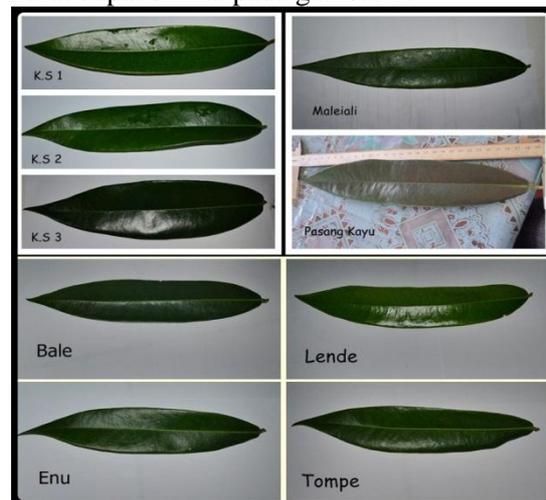
pendinginan (*cooling*) sampai suhu 16°C. DNA dikuantifikasi menggunakan elektroforesis pada agarose gel 1%.

Analisis Data Molekuler. Hasil PCR dianalisis dengan melakukan skoring. Profil pita DNA hasil analisis RAPD diskoring dengan ada atau tidaknya hasil amplifikasi. Pendugaan hubungan kekerabatan dilakukan berdasarkan jumlah pita polimorfik yang dimiliki bersama. Pengelompokan kerabat dilakukan berdasarkan metode *Unweighted Pair Grouping with Arithmetic Averaging (UPGMA)* dengan menggunakan software *Multi Variate Statistical Package (MVSP)* version 3 (Kovack 2005; Sun & Lo 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ragam Fenotip Daun Eboni (*Diospyros celebica* Bakh)

Beberapa sampel daun dari berbagai populasi eboni (*Diospyros celebica* Bakh) yang berada pada hutan alam dan hutan tanaman di Sulawesi Tengah dan Sulawesi Barat dapat dilihat pada gambar 1.



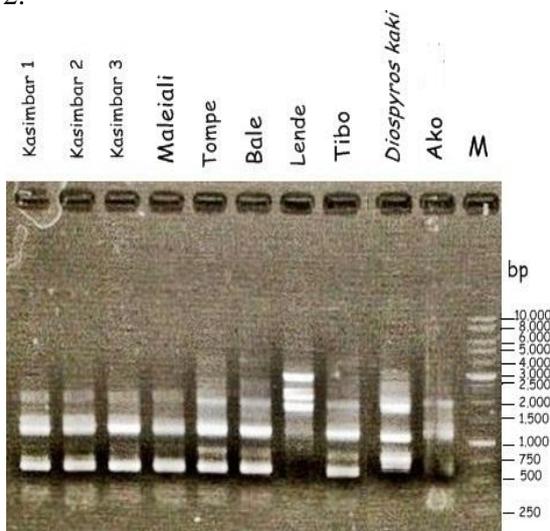
Gambar 1. Sampel daun eboni (*Diospyros celebica* Bakh)

Dari sembilan sampel daun yang diambil pada berbagai populasi eboni (*Diospyros celebica* Bakh) pada hutan alam dan hutan tanaman di Sulawesi Tengah dan Sulawesi Barat memperlihatkan kenampakan yang berbeda pada bentuk daun. Semua daun memiliki bulu halus yang berada di permukaan bawah, dan umumnya meruncing pada ujung daun. KS1, KS2, dan KS3, adalah

sampel daun yang berasal dari daerah yang sama yaitu Kasimbar, tetapi dengan tempat tumbuh yang berbeda. KS1 terletak pada ketinggian 65m dpl, KS2 terletak pada ketinggian 59m dpl, dan KS3 terletak pada ketinggian 22m dpl. Wright (1976) dalam Restu, M. (2007) mengemukakan bahwa adanya perbedaan pertumbuhan dari suatu jenis yang ditumbuhkan pada tempat atau kondisi lingkungan yang relatif sama. Dari gambar terlihat bahwa terdapat perbedaan bentuk daun yang menonjol walaupun berasal dari daerah yang sama tetapi dengan ketinggian yang berbeda. Hal ini sesuai dengan pernyataan Restu, M. (2007) bahwa kondisi ekologis masing-masing provenansi eboni mempunyai variasi terutama dipengaruhi oleh ketinggian tempat, luas areal dan letak geografis.

Keragaman Genetik Eboni (*Diospyros celebica* Bakh)

Empat primer yang digunakan dalam proses amplifikasi, yaitu TCL05, TCH05, AS9870, dan TCM20. Ditemukan 2 primer yang menghasilkan polimorfisme cukup jelas pada analisis RAPD eboni, yaitu TCH05 dan AS9870. TCL05 dan TCM20 tidak menghasilkan pita polimorfik. Hasil proses PCR-RAPD eboni dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil proses PCR-RAPD menggunakan primer AS9870

Hasil proses PCR-RAPD menggunakan primer AS9870 pada sembilan populasi eboni menunjukkan adanya jarak dan variasi yang berbeda. Dari proses amplifikasi primer

AS9870 menghasilkan 51 pita polimorfik dengan panjang berkisar 250 bp hingga 3000 bp. Pada amplifikasi dengan primer AS9870 ini semua sampel mampu menghasilkan produk amplifikasi. Sedangkan pada primer TCH05 menghasilkan 41 pita polimorfik. Menurut Grattapaglia *et al.* (1992), amplifikasi DNA terjadi jika primer menempel pada dua situs komplementer yang jaraknya berdekatan dan orientasinya saling terbalik. Jarak antar situs amplifikasi ini menghasilkan fragmen DNA dengan berbagai ukuran pasang basa. Analisis keragaman DNA didasarkan pada ada atau tidaknya pita DNA dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan 1 untuk adanya pita DNA.

Diospyros kaki yang dipakai sebagai sampel dalam proses analisis keragaman eboni hanya digunakan sebagai pembanding dalam satu species yang sama dengan genus yang berbeda. Terdapat pola pita yang khas pada fragmen DNA yang berasal dari daerah Lende, yang memiliki pita pada ukuran 2500-3000bp. Sedangkan pada sampel individu eboni yang berasal dari daerah lainnya lokus tersebut tidak ditemukan. Hal ini diduga karena adanya mutasi yang mengubah informasi genetik di dalam urutan DNA pada gen. Sehingga secara spontan dan dalam keadaan frekuensi tertentu yang sesuai dengan informasi genetik kromosom dan keadaan lokus, mutasi pada beberapa lokus dapat terjadi dengan mudah. Sementara pada lokus-lokus lainnya kromosomnya sangat stabil. Tingkat kestabilan kromosom terhadap mutasi juga bergantung pada keadaan alel yang mengendalikan lokus.

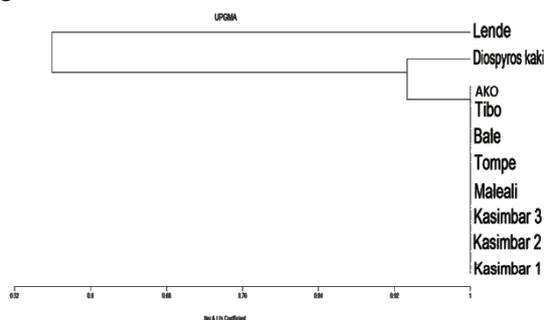
Pengamatan secara morfologi yaitu pertumbuhan diameter dan tinggi yang dapat dilihat pada Tabel 1, menunjukkan adanya perbedaan dari setiap sampel yang diambil pada masing-masing daerah. Hal ini berhubungan dengan usia masing-masing eboni yang berbeda. Setiap lokasi pengambilan sampel juga memiliki pH tanah yang berbeda pula, serta identifikasi fenotip daun yang berbeda dari setiap daerah yang ditunjukkan pada Tabel 3. Untuk eboni dari Kasimbar dengan ketinggian yang berbeda untuk setiap sampel terlihat adanya hubungan fenotip yang nyata yaitu adanya perbedaan

diameter dan tinggi, pH tanah, serta kenampakan bentuk daun yang berbeda, hal ini tidak berbanding lurus dengan pengamatan genetiknya yang terlihat pada hasil proses PCR-RAPD menunjukkan kromosomnya tetap stabil. Hubungan fenotip yang lebih tinggi daripada genotip tersebut terjadi karena faktor lingkungan serta interaksi genetik dan lingkungan mendukung ekspresi gen-gen dalam *pleiotropisme* (satu gen mengendalikan beberapa karakter) dan *linkage* (dua atau lebih gen terletak pada kromosom yang sama dan cenderung diturunkan secara bersama) (Pinaria *et al.* 1995) dalam Martono, B. (2009).

Hubungan genetik yang tinggi juga dapat terjadi jika faktor lingkungan tidak dapat mendukung ekspresi gen-gen pengendali dari karakter-karakter tersebut. Seperti terlihat pada hasil penelitian Sudarmadji *et al* (2007), menunjukkan bahwa sifat-sifat yang diamati pada ketiga persilangan wijen memiliki variasi genetik yang cukup besar seperti sifat tinggi tanaman, jumlah buah, jumlah cabang, berat 1.000 biji dan hasil biji per hektar. Hal ini berarti bahwa peranan faktor genetik pada penampilan fenotip sangat besar, atau peranan lingkungan pada penampilan tersebut kecil.

Variasi Genetik Antar Populasi

Berdasarkan analisis nilai jarak genetik yang telah dihitung menggunakan *software Multi Variate Statistical Package (MVSP)* (Kovach, 2005), dihasilkan dendogram jarak genetik antar populasi seperti terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Dendogram populasi eboni (*Diospyros celebica* Bakh) berdasarkan analisis RAPD

Berdasarkan dendogram tersebut, terdapat 2 kelompok besar dalam populasi ini. Kelompok I eboni yang berasal dari daerah

Lende. Kelompok II yang terbagi menjadi 2 sub kelompok (2A dan 2B). Sub kelompok 2A yaitu *Dyospiros kaki*. Sub kelompok 2B berasal dari daerah Ako, Tibo, Bale, Tompe, Maleali dan Kasimbar. Dari Dendogram kelompok 2B terlihat bahwa populasi eboni dari Desa Ako (Sulawesi Barat) ternyata memiliki jarak genetik yang sama dengan 7 populasi eboni yang berasal dari daerah Sulawesi Tengah yaitu sebesar 1.00. Jika ditinjau dari letak geografis, masing-masing provinsi memiliki jarak lokasi yang jauh sehingga diduga masih tetap mempunyai kemiripan antar populasi tersebut. Juga didasarkan pada hasil wawancara dengan pemilik hutan tanaman dari Desa Ako yang menyatakan bahwa sumber bibit berasal dari daerah yang termasuk dalam administratif Sulawesi Tengah, tepatnya di Kabupaten Parigi. Sehingga kemungkinan populasi tersebut berasal dari anakan yang awalnya berasal dari tempat yang sama. Hal ini diasumsikan bahwa kondisi lingkungan tidak berpengaruh meskipun memiliki letak geografis yang jauh di setiap populasi.

Diospyros kaki yang termasuk dalam kelompok 2A, walaupun berbeda genus kemungkinan primer belum bekerja secara spesifik sehingga data yang diperoleh belum detail dan belum mampu membedakan antara *Diospyros kaki* dan *Diospyros celebica*.

Hasil di atas dapat digunakan sebagai acuan dalam penentuan induk untuk pembuatan bibit. Semakin jauh hubungan kekerabatan antar sampel, maka semakin kecil keberhasilan persilangan, tetapi kemungkinan untuk memperoleh genotip unggul lebih besar jika persilangan berhasil. Semakin beragam relatif, maka semakin besar kemungkinan diperoleh relatif unggul. Perkawinan antara individu berjarak relatif dekat atau hubungan kekerabatannya sama mempunyai efek peningkatan homozigositas, sebaliknya perkawinan antara individu berjarak relatif besar atau kekerabatannya jauh mempunyai efek peningkatan heterozigositas. Informasi ini berdampak baik bagi proses pembuatan bibit unggul. Perkawinan tetua dengan variasi yang relatif tinggi akan menghasilkan individu dengan heterozigositas lebih tinggi.

KESIMPULAN

Dari hasil dan pembahasan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Dari 9 sampel daun yang diambil pada berbagai populasi eboni (*Diospyros celebica* Bakh) pada hutan alam dan hutan tanaman yang berada di Sulawesi Tengah dan Sulawesi Barat memperlihatkan kenampakan yang berbeda pada setiap bentuk daun dari masing-masing daerah.
2. Empat primer yang digunakan dalam proses amplifikasi, yaitu TCL05, TCH05, AS9870, dan TCM20. Ditemukan 2 primer yang menghasilkan polimorfisme cukup jelas pada analisis RAPD eboni, yaitu TCH05 dan AS9870
3. Terdapat pola pita yang khas pada fragmen DNA yang berasal dari daerah Lende, yang memiliki pita pada ukuran 2500-3000bp. Sedangkan pada sampel individu eboni yang berasal dari daerah lainnya lokus tersebut tidak ditemukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alrasyid, Harun. 2001. Kajian Budidaya Pohon Eboni (*Diospyros celebica* Bakh). Dalam Lokakarya Manajemen Eboni (*Diospyros celebica* Bakh.) Dalam Mendukung Keunggulan Industri Menuju Otonomisasi Era Pasar Bebas. Makassar 20-21 Maret 2001. Universitas Hasanuddin, Departemen Kehutanan dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Demeke, T and R.P. Adams. 1994. *PCR Technology Current Innovation: The Use PCR RAPD Analysis in Plant Taxonomy and Evolution*. CRC Press. Inc.
- Fatchiyah. 2008. Amplifikasi DNA: Fungsi Dasar dan Aplikasinya. Disampaikan pada Kursus Singkat Analisis Variabilitas Genetik Tanaman Menggunakan PCR (RAPD) Tanggal 19-20 Agustus 2008. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Malang. pp.9.
- Finkeldey R. 2005. *Pengantar Genetika Hutan Tropis*. Jamhuri E., Siregar IZ., Siregar UJ., Kertadikara AW., penerjemah. Gottingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding Georg-August-University-Gottingen. Terjemahan dari : *An Introduction to Tropical Forest Genetics*.
- Grattapaglia, D., Chaparro, J., Wilcox, P., McCord, S., Werner, D., Amerson, H., McKeand S., Bridgwater, F., Whetten, R., O'Malley, D. & Sederoff, R. 1992. Mapping in Woody Plants with RAPD Markers: Application to Breeding in Forestry and Horticulture. Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series CSSA/ASHS/AGA. Minneapolis.
- Husnaeni Anna. 2008. Variasi Genetik Jati Pada Hutan Tanaman Di Jawa Berdasarkan Penanda RAPD. [skripsi]. Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor
- Karsinah. 2002. Keragaman Genetik Plasma Nutfah Jeruk Berdasarkan Analisis Penanda RAPD. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. 7(1). Pp 8-16
- Kovach WL. 2005. MVSP - A MultiVariate Statistics Package for Windows, ver.3.1. Pentraeth, Wales: Kovach Computing Services.
- Munawar A dan M. Na'iem, 2003. Studi Variasi Genetik *Pinus merkusii* Jungh et de Vriese di Hutan Alam Tapanuli dan Kerinci dan Implementasinya dalam Konservasi Genetik. *Jurnal Agrosains*, Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Martono, B. 2009. Keragaman genetik, Heritabilitas dan Korelasi Antar Karakter Kuantitatif Nilam (*Pogostemon sp.*) Hasil Fusi Protoplas. *Jurnal Littri* 15(1), Maret 2009. Hlm. 9 – 15
- Nai'em, 2001. Genetic Variation of *Shorea leprosula* Miq. In Three Population in Indonesia : Implication for Ex Situ Conservation. *Bulletin Kehutanan*. Jogyakarta.
- Nai'em, M. 2005. Pemuliaan Pohon dan Hutan Tanaman Prospektif di Indonesia. Dalam: Prosiding Peran Konservasi Sumberdaya Genetik, Pemuliaan dan Silvikultur dalam Mendukung Rehabilitasi Hutan. Seminar Nasional Peningkatan Produktivitas Hutan. 26-27 Mei. *ITTO Project-Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada*, Yogyakarta. p: 15-23.

- Nei's Genetic Distance, 1972. *Molucular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance Between Populations. *American Naturalist*. 106: 283-292.
- Pharmawati, M. 2013. The Genetic Relationships of *Grevillea* Hybrids Determined by RAPD Marker. *Hayati Journal of Biosciences*. 20(4): 196-200
- Pinaria, s., A. Baihaki, R. Setiamihardja, dan A.A. Daradjat. 1995. Variabilitas Genetik Dan Herita-Bilitas Karakter-Karakter Biomassa 53 Genotipe Kedelai. *Zuriat* 6 (2): 88-92.
- Prana, T. K., dan N. S. Hartati. (2003). Identifikasi Sidik Jari DNA Talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan Teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) : Skrining Primer dan Optimalisasi Kondisi PCR. *Jurnal Natur Indonesia* 5(2): 107-112 (2003).
- Prasetyono, J., Tasliah, H. Aswidinnoor, and S. Moeijopawiro. 2003. Identifikasi Marka Mikrosatelit yang Terpaut dengan Sifat Toleransi terhadap Keracunan Aluminium pada padi Persilangan Dupa x ITA131. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. Vol 8 (2) : pp. 35-45
- Qiagen. 2002. *Hotstar Taq PCR Handbook*. Germany : Qiagen
- Riswan, Soedarsono. 2001. Kajian Biologi Ebony (*Diospyros celebica* Bakh). Dalam Lokakarya Manajemen Ebony (*Diospyros celebica* Bakh.) Dalam Mendukung Keunggulan Industri Menuju Otonomisasi Era Pasar Bebas. Makassar 20-21 Maret 2001. Universitas Hasanuddin, Departemen Kehutanan dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Sidiyasa, Kade dan Riskan Efendi. 1988. Kayu Hitam (*Diospyros celebica* Bakh) Flora Pohon Langka yang Bernilai Komersial Tinggi. Makalah disajikan dalam diskusi panel pada Pelestarian dan Pemanfaatan Flora dan Fauna Indonesia Tanggal 24 Maret 1988 di Bogor.
- SK Mentan No.54/kpts/Um/2/1972. Noerdjito M, Maryanto Ibnu. Editor. Jenis-Jenis Hayati yang Dilindungi Perundang-Undangan Indonesia. Bidang Zoologi (museum Zoologicum Bogoriense, Puslit Biologi. LIPI, The Nature Conservancy and USAID
- Subandiyah, S. 2006. Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi atau Identifikasi Patogen Tumbuhan. Beberapa Metode Ekstraksi DNA. Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR. Malang. hlm. 43-50.
- Sudarmadji, Mardjono Rusim, Sudarmo Hadi. 2007. Variasi Genetik, Heritabilitas, Dan Korelasi Genotipik Sifat-Sifat Penting Tanaman Wijen (*Sesamum indicum* L.). *Jurnal Litri* 13(3), September 2007 : 88 - 92
- Sun M, Lo EYY. 2011. Genomic Markers Reveal Introgressive Hybridization in the Indo-West Pacific Mangroves: A Case Study. *PLoS ONE* 6(5): e19671. doi:10.1371/journal.pone.0019671
- Restu, M. 2007. Uji Provenansi Ebony (*Diospyros celebica* Bakh) Fase Anakan. *Jurnal Hutan dan Masyarakat*, 2(2): 194-199.
- Restu, M. 2007. Potensi dan karakteristik ekologi provenansi ebony (*Diospyros celebica* Bakh) untuk Pemuliaan dan konservasi genetik. *Jurnal Hutan dan Masyarakat*, 2(1):145-150
- Thielges, A. Bart. Sastrapadja, D. Setijati. Rimbawanto Anto. 2001. *In situ and Ex situ Conservation of Commercial Tropical Trees*. International Tropical Timber Organization (ITTO)
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Widyatmoko YPBC Anthonius, Nurtjahjaningsih ILG, Prastyono., 2011. Study on the Level of Genetic Diversity of *Diospyros celebica*, *Eusideroxylon zwageri* and *Michelia spp*. Using rapid markers. *Technical Report No. 2* http://id.wikipedia.org/wiki/Kayu_hitam_sulawesi >. Diakses 11 Januari 2014