

**SCREENING PENANDA MIKROSATELIT *Shorea curtisii* TERHADAP JENIS-JENIS
SHOREA PENGHASIL TENGGAWANG**

(Screening of microsatellite primers of *Shorea curtisii* for *Shorea* spp. producing tengkawang oil)

I.L.G. Nurtjahjaningsih, A.Y.P.B.C. Widyatmoko, P. Sulistyawati dan A. Rimbawanto
Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
E-mail: iluh_nc@yahoo.com

Tanggal diterima: 28 Februari 2012; Direvisi: 26 Maret 2012; Disetujui terbit: 26 Juni 2012

ABSTRACT

Screening primer is an effective method to develop microsatellite markers from related taxa. Aim of this study was to develop microsatellite markers of four *Shorea* producing tengkawang oil, i.e. *Shorea gysbertiana*, *Shorea macrophylla*, *Shorea pinanga* and *Shorea stenoptera* by screening microsatellite primers of *Shorea curtisii*. Leaf samples of the four *Shorea* were collected from nursery at Center for Forest Biotechnology and Tree Improvement Research in Yogyakarta. Four microsatellite primers of *S. curtisii* i.e. Shc-1, Shc-2, Shc-7 and Shc-9 had been used to screen. Results showed that numerous alleles were shared among the *Shorea*. The expected heterozygosity (HE) for locus Shc-1 ranged between 0.594 and 0.722; locus Shc-2 ranged between 0.219 and 0.611; locus Shc-7 ranged between 0.594 and 0.778; and locus Shc-9 ranged between 0.594 and 0.844. Coefficient of inbreeding (FIS) value was low and it was insignificant deviated from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) at almost all loci except Shc-1 of *S. pinanga*. A dendrogram showed two clusters; *S. gysbertiana* and *S. macrophylla* represented in one cluster, while *S. pinanga* and *S. stenoptera* represented in another cluster. Therefore the developed microsatellite markers are possible to be applied for studying population genetics and mating system of these species.

Key words: screening microsatellite, genus *Shorea*, shared allele, expected heterozygosity, coefficient of inbreeding

ABSTRAK

Metode seleksi primer merupakan metode yang efektif untuk mengembangkan penanda mikrosatelit dari jenis yang mempunyai kekerabatan dekat dalam suatu sistem taksonomi. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan penanda mikrosatelit pada jenis *Shorea* penghasil tengkawang yaitu *Shorea gysbertiana*, *Shorea macrophylla*, *Shorea pinanga* dan *Shorea stenoptera* menggunakan metode seleksi primer mikrosatelit dari *Shorea curtisii*. Contoh daun dari empat jenis *Shorea* dikumpulkan dari persemaian di Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman hutan, Yogyakarta. Amplifikasi empat penanda mikrosatelit *S. curtisii* yaitu Shc-1, Shc-2, Shc-7 dan Shc-9 diuji pada empat jenis *Shorea* tersebut. Hasil menunjukkan bahwa sejumlah allele merupakan allele bersama antar jenis *Shorea* yang diuji. Nilai heterozigositas harapan (H_E) per lokus beragam, pada lokus Shc-1 berkisar antara 0,594 dan 0,722; lokus Shc-2 berkisar antara 0,219 dan 0,611; lokus Shc-7 berkisar antara 0,594 dan 0,779; lokus Shc-9 berkisar antara 0,594 dan 0,844. Koefisien inbreeding (F_{IS}) mempunyai nilai rendah dan tidak nyata menyimpang dari hukum keseimbangan Hardy-Weinberg pada hampir semua lokus kecuali lokus Shc-1 pada *S. pinanga*. Dendrogram membentuk dua kelompok: *S. gysbertiana* dan *S. macrophylla* membentuk satu kelompok, sedangkan *S. stenoptera* dan *S. pinanga* membentuk satu kelompok yang lain. Penanda mikrosatelit yang telah dikembangkan dapat digunakan untuk studi genetik populasi dan sistem perkawinan pada jenis *Shorea* yang diuji.

Kata Kunci: seleksi mikrosatelit, genus *Shorea*, allele bersama, heterozigositas harapan, koefisien inbreeding

I. PENDAHULUAN

Mikrosatelit atau *simple sequence repeat* (SSR) merupakan sekuen penanda DNA bersifat ko-dominan dan banyak dijumpai hampir di semua organisme yang mempunyai inti sel sejati

(*eukaryote*). Penanda DNA ini mempunyai tingkat keragaman genetik yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk analisis genetik populasi, aliran gene (*geneflow*), sebaran serbuk sari, analisis tetua, membedakan jenis dan varietas

dengan hasil yang akurat (Dow dan Ashley 1998; Rahman dan Rajora 2002) .

Ada beberapa metode untuk mengembangkan penanda mikrosatelit, misalnya pustaka kekayaan DNA (DNA *enrichment library*) dan isolasi sekuens mikrosatelit. Namun demikian, pengembangan penanda dengan metode tersebut memerlukan biaya, tenaga dan waktu. Metode seleksi primer memberikan alternatif untuk mengembangkan penanda mikrosatelit dengan lebih menghemat biaya, waktu dan tenaga. Selain itu, metode seleksi primer juga mempunyai keberhasilan lebih tinggi pada jenis yang berkerabat dekat dan sudah diterapkan pada beberapa tanaman hutan baik konifer misalnya pada genera *Pinus*, *Picea* dan *Pseudotsuga* yang dikembangkan dari *Pinus strobus* (Echt dkk. 1999), maupun daun lebar misalnya pada *Shorea parvifolia* yang dikembangkan dari *Shorea leprosula* (Lee dkk.2004).

Shorea penghasil tengkawang (Dipterocarpaceae) seperti *S. gysbertsiana*, *S. macrophylla*, *S. pinanga* dan *S. stenoptera* mempunyai nilai ekonomi yang tinggi untuk kayu maupun minyak tengkawang. Strategi pemuliaan untuk empat jenis *Shorea* tersebut telah ditetapkan untuk meningkatkan produktifitas kayu maupun minyaknya. Identifikasi jenis dan populasi menggunakan penanda mikrosatelit memberikan informasi akurat dan menjadi informasi penting dalam

mendukung program pemuliaan maupun konservasi untuk empat jenis *Shorea* tersebut. Namun demikian penanda mikrosatelit untuk empat jenis ini belum dikembangkan.

Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan penanda mikrosatelit pada empat jenis *Shorea* penghasil tengkawang menggunakan metode seleksi primer mikrosatelit dari *S. curtisii*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk mendukung strategi konservasi dan pemuliaan jenis-jenis tersebut.

II. BAHAN DAN METODE

A. Koleksi materi genetik

Contoh daun bibit *S. gysbertsiana*, *S. macrophylla*, *S. pinanga* dan *S. stenoptera* dikumpulkan secara acak dari persemaian Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan Yogyakarta. Bibit tersebut berasal dari populasi alam di Kalimantan Barat dan Kalimantan Tengah serta kebun percobaan Haurbentes, Jawa Barat. Jumlah contoh daun yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 16 daun. Contoh daun tersebut dikemas dalam amplop yang telah diberi *silica gel* dan disimpan pada suhu ruang sampai dilakukan ekstraksi DNA.

B. Ekstraksi DNA dan analisis mikrosatelit

Contoh daun segar seberat 100 mg dihaluskan menggunakan mesin penghalus daun

(*minibead*), kemudian proses ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB (Shiraishi dan Watanabe 1995).

Penanda mikrosatelit pada jenis *Shorea* penghasil tengkawang dikembangkan menggunakan metode seleksi primer mikrosatelit dari *Shorea curtisii* yaitu Shc-1, Shc-2, Shc-7 dan Shc-9 (Ujino dkk. 1998). Sekuen primer tersebut disajikan pada Tabel 1. Proses PCR dilakukan menggunakan thermocycler GeneAmp9700 (Applied Biosystem). Suhu pemanasan awal 94°C selama 10 menit, diikuti dengan 10 siklus reaksi yang masing-masing terdiri dari reaksi denaturasi DNA (suhu 94°C selama 30 detik), reaksi

penempelan primer (annealing) mengikuti protokol *touchdown* (suhu 65°-55 °C selama 30 detik) dan pemanjangan DNA (suhu 72°C selama 60 detik). Kemudian diikuti 25 siklus reaksi yang terdiri dari reaksi denaturasi DNA (suhu 94°C selama 30 detik), reaksi penempelan primer (suhu 55°C selama 30 detik), pemanjangan DNA (suhu 72°C selama 60 detik). Siklus PCR diakhiri pada suhu 72°C selama 1 menit untuk melengkapi proses pemanjangan. Elektroforesis berbasis kapiler menggunakan mesin gene analyzer ABI 3100 Avant (Applied Biosystem). Fragment DNA dianalisa menggunakan genemapper (Applied Biosystem).

Tabel 1. Sekuen primer dan motif ulangan mikrosatelit pada *Shorea curtisii* (Ujino dkk. 1998)

Nama lokus	Sekuen basa (5' - 3')	Motif ulangan	T. ann (°C)	N _A	H _E
Shc-1	GCTAT TGGCA AGGAT GTTCA CTTAT GAGAT CAATT TGACA G	(CT) ₈ (CA) ₁₀ CT(CA) ₄ CTCA	56	20	0,922
Shc-2	CACGC TTTCC CAATC TGTCAGA GCAGA ATCCA G	(CT) ₂ CA(CT) ₅	54	2	0,180
Shc-7	ATGTC CATGT TTGAG TGCATGG ACATA AGTGG ATG	(CT) ₈ CA(CT) ₅ CACCC (CTCA) ₃ CT(CA) ₁₀	54	11	0,810
Shc-9	TTTCT GTATC CGTGT GTTGGCGATT AAGCG GACCT CAG	(CT) ₁₂	54	9	0,818

Keterangan: T. ann: suhu penempelan primer, N_A: jumlah allele yang terdeteksi, H_E: Heterozigositas harapan per lokus

C. Analisis data

Parameter keragaman genetik per lokus yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah allele yang terdeteksi (N_a), nilai heterozigositas harapan (H_E) dan koefisien inbreeding (F_{IS}). Parameter tersebut dihitung menggunakan program GENALEX 6 (Peakall dan Smouse, 2006). Berdasarkan program tersebut, nilai signifikansi F_{IS} yang menyimpang

dari hukum keseimbangan Hardy Weinberg diuji menggunakan test χ^2 .

Nilai H_E (Peakall dan Smouse, 2006) diduga menggunakan persamaan:

$$H_E = 1 - \sum_{pi} p_i^2$$

dengan pi merupakan frekuensi allele ke-i pada suatu populasi.

sedangkan nilai F_{IS} (Peakall dan Smouse, 2006) menggunakan persamaan:

$$F_{IS} = \frac{H_E - H_O}{H_E} = 1 - \left(\frac{H_O}{H_E} \right)$$

dengan nilai H_E diperoleh dari persamaan diatas, H_O merupakan heterozigositas yang teramati. Nilai H_O dapat diperoleh menggunakan persamaan:

$$H_O = 1 - \sum_{i=1} \sum_{j=1} P_{ij}$$

dengan P_{ij} merupakan frekuensi genotipe yang homozigot.

Dendrogram disusun berdasarkan parameter jarak genetik per lokus (D_a ; Nei dkk. 1983) menggunakan metode UPGMA dengan 1.000 kali *bootstrap*. Dendrogram tersebut dianalisis menggunakan software POPTREE2 (Takezaki dkk. 2010).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Allele bersama antar jenis *Shorea* penghasil tengkawang

Ukuran allele yang terdeteksi pada jenis *S. gysbertsiana*, *S. macrophylla*, *S. pinanga* dan *S. stenoptera* dan pada lokus Shc-1, Shc-2, Shc-7 dan Shc-9 disajikan pada Tabel 2. Beberapa allele merupakan allele bersama antar jenis *Shorea* yang diuji maupun *S. curtisii*. Allele 135 (Shc-2) merupakan allele bersama antara jenis *Shorea* yang diuji. Allele 152 (lokus Shc-1) merupakan allele bersama antara *S. curtisii*, *S. gysbertsiana* dan *S. macrophylla*. Sedangkan allele 143 dan 145 (lokus Shc-1); 155 (lokus Shc-2); 197 (lokus Shc-9) merupakan allele bersama antara *S. pinanga* dan *S. stenoptera*.

Tabel 2. Ukuran allele mikrosatelit (bp) pada *Shorea curtisii* (Ujino dkk. 1998) dan empat jenis *Shorea* penghasil tengkawang

Lokus	<i>S. curtisii</i>	<i>S. gysbertsiana</i>	<i>S. macrophylla</i>	<i>S. pinanga</i>	<i>S. stenoptera</i>
Shc-1	152	152, 169, 179, 187	152, 155, 167, 187	143, 145, 157	143, 145, 149
Shc-2	149	131, 135	135, 143, 153	135, 155, 157	135, 147, 155
Shc-7	169	158, 161, 169, 184	152, 154, 165, 179	152, 154, 158, 161, 208	154, 158, 161
Shc-9	197	179, 181, 183, 189, 191, 202, 204	183, 187, 189	185, 187, 197	183, 187, 189, 197

Keragaman genetik per lokus setiap jenis *Shorea*

Tabel 3 menunjukkan parameter keragaman genetik per lokus per jenis *Shorea* yaitu jumlah allele yang terdeteksi (N_a), nilai heterozigositas harapan (H_E) dan koefisien

inbreeding (F_{IS}). Jumlah allele (N_a) berkisar antara 2 (lokus Shc-2- *S. gysbertsiana*) dan 7 allele (lokus Shc-9- *S. gysbertsiana*). Nilai heterozigositas harapan (H_E) berkisar antara 0,219 (lokus Shc-2-*S. gysbertsiana*) dan 0,844 (lokus Shc-9-*S. gysbertsiana*). Nilai koefisien

inbreeding (F_{IS}) tidak signifikan pada setiap lokus setiap jenis kecuali pada lokus Shc-1 pada jenis *S. pinanga*.

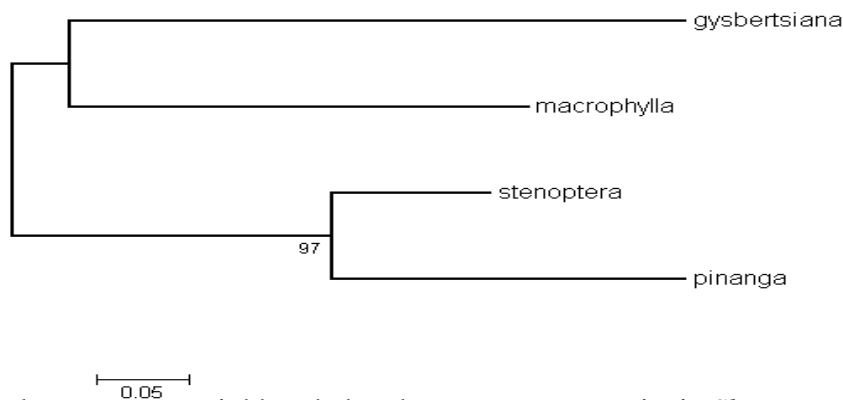
Shc-7	<i>S. stenoptera</i>	4	3	0,594	0,579	ns
Shc-9	<i>S. stenoptera</i>	4	4	0,656	0,238	ns

Keterangan N: Jumlah sampel, N_a : Jumlah allele terdeteksi, H_E : heterozigositas harapan, F_{IS} : koefisien inbreeding, * Berbeda nyata pada taraf uji 5%, ns= Tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%

Tabel 3. Parameter keragaman genetik per lokus per jenis *Shorea*

Lokus	Jenis <i>Shorea</i>	N	N_a	H_E	F_{IS}	
Shc-1	<i>S. gysbertsiana</i>	4	4	0,722	0,538	ns
Shc-2	<i>S. gysbertsiana</i>	4	2	0,219	-0,143	ns
Shc-7	<i>S. gysbertsiana</i>	4	4	0,722	-0,385	ns
Shc-9	<i>S. gysbertsiana</i>	4	7	0,844	-0,185	ns
Shc-1	<i>S. macrophylla</i>	4	4	0,656	0,238	ns
Shc-2	<i>S. macrophylla</i>	4	3	0,406	-0,231	ns
Shc-7	<i>S. macrophylla</i>	4	4	0,667	-0,500	ns
Shc-9	<i>S. macrophylla</i>	4	3	0,625	0,200	ns
Shc-1	<i>S. pinanga</i>	4	3	0,625	1,000	*
Shc-2	<i>S. pinanga</i>	4	3	0,611	-0,636	ns
Shc-7	<i>S. pinanga</i>	4	5	0,778	-0,286	ns
Shc-9	<i>S. pinanga</i>	4	3	0,594	0,579	ns
Shc-1	<i>S. stenoptera</i>	4	3	0,594	0,579	ns
Shc-2	<i>S. stenoptera</i>	4	3	0,594	-0,684	ns

Dendrogram disusun berdasarkan jarak genetik untuk menunjukkan hubungan kekerabatan secara genetik antar empat jenis *Shorea* penghasil tengkawang (Gambar 1). Empat jenis *Shorea* tersebut terpisah secara jelas dan membentuk dua kelompok; kelompok pertama terdiri dari *S. gysbertsiana* dan *S. macrophylla* dan kelompok kedua terdiri dari *S. stenoptera* dan *S. pinanga*. Sub kelompok *S. stenoptera* dan *S. pinanga* terpisah secara jelas dengan interval konfidensi 97% berdasarkan 1,000 kali *bootstrap*.



Gambar 1. Dendrogram menunjukkan kekerabatan antar empat jenis *Shorea* penghasil tengkawang dengan skala jarak genetik dan interval konfidensi *bootstrap*

Keterangan: gysbertsiana: *Shorea gysbertsiana*, macrophylla: *Shorea macrophylla*, pinanga: *Shorea pinanga*, stenoptera: *Shorea stenoptera*

B. Pembahasan

Hal yang paling menguntungkan saat mengembangkan penanda mikrosatelit melalui metode seleksi primer adalah dapat menghemat

tenaga, waktu dan biaya. Pada umumnya keberhasilan metode seleksi primer pada jenis daun lebar mempunyai tingkat yang cukup tinggi, misalnya seleksi primer dari *Shorea*

leprosula ke *S. parvifolia* keberhasilannya mencapai 80% (Lee dkk. 2004). Bahkan hampir semua penanda mikrosatelit yang dikembangkan dari *S. curtisii* dapat digunakan pada 30 jenis Dipterocarpaceae lain (Ujino dkk. 1998). Pada penelitian ini keberhasilan metode seleksi primer mikrosatelit dari *Shorea curtisii* mencapai 100% pada empat jenis *Shorea* penghasil tengkawang yaitu *S. gysbertsiana*, *S. macrophylla*, *S. stenoptera* dan *S. pinanga*. Keberhasilan metode seleksi primer juga dilaporkan pada jenis konifer. Semua penanda mikrosatelit (100%) pada *P. strobus* teramplifikasi pada *P. lambertiana* karena dua jenis tersebut termasuk dalam satu *subsection stobi* sedangkan keberhasilan seleksi primer *P. strobus* terhadap *P. cembra* hanya 86% karena dua jenis tersebut berbeda *subsection*; *P. cembra* termasuk dalam *subsection cembrae* (Echt dkk.1999). Namun demikian, banyak penelitian menunjukkan bahwa metode seleksi primer umumnya sulit diterapkan pada jenis konifer karena jenis ini mempunyai ukuran DNA besar; misalnya keberhasilan metode seleksi primer pada *P. pinaster* dari *P. halepensis* hanya 4% (Mariette dkk. 2001). Oleh karena susunan sekuen basa berbeda-beda untuk setiap individu maka dalam satu jenis yang sama pun metode seleksi primer tidak dapat diaplikasikan (Ujino dkk. 1998).

Adanya allele bersama menunjukkan kedekatan antar jenis. Pada penelitian ini,

jumlah allele bersama berkisar antara 1-4 allele. Allele bersama juga ditunjukkan pada jenis *Pinus* yaitu berkisar antara 1-7 allele (Echt dkk. 1999).

Jumlah allele yang terdeteksi per lokus setiap jenis *Shorea* cukup tinggi, berkisar antara 2 (lokus Shc-2 pada *S. gysbertsiana*) sampai dengan 7 (lokus Shc-9 pada *S. gysbertsiana*). Pada lokus yang sama yaitu Shc-2 dan Shc-9 pada *S. curtisii*, jumlah allele masing-masing sebanyak 2 dan 9 (Ujino dkk. 1998). Tingkat polimorfisme allele juga cukup tinggi, nilai H_E per lokus berkisar antara 0,219 (lokus Shc-2 pada *S. gysbertsiana*) dan 0,844 (lokus Shc-9 pada *S. gysbertsiana*). Hal yang sama juga dilaporkan pada *S. curtisii* bahwa nilai H_E berkisar antara 0,180 (lokus Shc-2) sampai 0,818 (lokus Shc-9) (Ujino dkk. 1998). Selain itu, hampir semua lokus di setiap jenis mempunyai nilai inbreeding (F_{IS}) yang tidak nyata menyimpang dari hukum keseimbangan Hardy Weinberg. Hal ini menunjukkan tidak adanya kemungkinan *null allele* pada lokus-lokus tersebut kecuali lokus Shc-1. Indikasi *null allele* terlihat di lokus Shc-1 yang menunjukkan nilai F_{IS} yang cenderung tinggi pada semua jenis; namun nilainya tidak signifikan kecuali pada *S. pinanga*. *Null allele* adalah amplifikasi allele yang sebenarnya homozigot tapi menunjukkan allele heterozigot karena mutasi gen atau suhu annealing yang tidak sesuai pada proses PCR. *Null allele* sangat mengganggu

proses genotyping karena menyebabkan kesalahan pembacaan allele sehingga tidak dapat digunakan untuk analisis genetik (Moriguchi dkk.2003). Adanya indikasi *null allele* pada Shc-1 tidak dilaporkan pada jenis *S. curtisii* (Ujino dkk. 1998). Selain itu untuk membuktikan indikasi *null allele* tersebut dapat ditelusuri dengan menambah jumlah sampel yang diuji atau membandingkan amplifikasi allele antara genotype pohon induk dan anaknya. Apabila target allele teramplifikasi pada anakan namun tidak teramplifikasi pada pohon induk kemungkinan allele tersebut adalah *null*.

Dendrogram (Gambar 1) menunjukkan kedekatan genetik antar empat jenis *Shorea* yang diuji. Berdasarkan analisis RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) yang telah dilakukan juga menunjukkan pola kelompok (*cluster*) yang sama dengan hasil penelitian ini (data tidak dipublikasi). Berdasarkan frekuensi allele per lokus pada setiap jenis *Shorea*, dendrogram membentuk satu kelompok antara *S. gysbertsiana* dan *S. macrophylla*, sedangkan *S. stenoptera* dan *S. pinanga* membentuk satu kelompok yang lain, dengan jenis-jenis dalam kelompok yang sama mengindikasikan kedekatan secara genetik. Informasi tersebut dapat digunakan untuk meningkatkan keberhasilan proses persilangan (hibridisasi) antar jenis yang merupakan salah satu strategi pada program pemuliaan pohon

untuk mendapatkan gabungan sifat antar jenis yang diinginkan dan sudah diterapkan misalnya pada *Acacia mangium* dan *A. auriculiformis* (Rimbawanto dkk. 1996). Selain dalam satu kelompok, kedekatan genetik juga ditunjukkan pada jenis yang ada di luar kelompok namun letak sub kelompok saling berdekatan yang pada penelitian ini ditunjukkan pada sub kelompok *S. macrophylla* dan *S. stenoptera* (Gambar 1). Peluang keberhasilan proses hibridisasi antara *S. macrophylla* dan *S. stenoptera* akan lebih tinggi dibanding antara *S. macrophylla* dan *S. pinanga*.

Belum banyak informasi mengenai kedekatan genetik *S. gysbertsiana* dan *S. macrophylla*, sehingga sulit menemukan referensi yang mutakhir. Beberapa pustaka melaporkan bahwa *S. gysbertsiana* merupakan nama lain *S. macrophylla* (Soerianegara dan Lemmens, 1994; Newman dkk., 1996). Pada penelitian ini diperoleh bahwa meskipun beberapa allele merupakan allele bersama antara *S. gysbertsiana* dan *S. macrophylla* namun susunan maupun frekuensi allele dua jenis tersebut berbeda. Data genetik tersebut menunjukkan bahwa meskipun mempunyai jarak genetik yang lebih rendah/dekat dibandingkan dengan dua jenis *Shorea* lainnya yaitu *S. stenoptera* dan *S. pinanga* namun struktur allele *S. gysbertsiana* dan *S. macrophylla* berbeda satu sama lain. Namun demikian, untuk memastikan perbedaan dua

jenis *Shorea* tersebut masih membutuhkan penelitian lebih lanjut.

IV. KESIMPULAN

Empat penanda mikrosatelit yaitu Shc-1, Shc-2, Shc-7 dan Shc-9 telah tersedia untuk empat jenis *Shorea* penghasil tengkawang yaitu *S. gysbertsiana*, *S. macrophylla*, *S. pinanga* dan *S. stenoptera* yang dikembangkan melalui metode seleksi primer dari *S. curtisii*. Empat penanda tersebut mempunyai tingkat keragaman genetik yang tinggi dan mempunyai nilai *inbreeding* yang tidak nyata, kecuali di lokus Shc-1 pada *S. pinanga*. Selain itu, penelitian ini menunjukkan bahwa *S. gysbertsiana* berkerabat dekat dengan *S. macrophylla*, sedangkan *S. pinanga* berkerabat dengan *S. stenoptera*. Oleh karena penanda mikrosatelit yang telah dikembangkan mempunyai tingkat keragaman genetik yang cukup tinggi dan tidak nyata menyimpang dari hukum keseimbangan Hardy-Weinberg, maka penanda tersebut dapat digunakan untuk analisis genetik populasi maupun sistem perkawinan pada empat jenis *Shorea* tersebut.

V. DAFTAR PUSTAKA

- Dow, B.D., Ashley, M.V. 1998. High levels of gene flow in bur Oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *The Journal of Heredity* 89 (1): 62-70.
- Echt, C.S., Vendramin, G.G., Nelson, C.D., Marquardt, P. 1999. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Can. J. For. Res.* 29: 365-371.
- Lee, S.L. Tani, N., NG, K.K.S, Tsumura, Y. 2004. Isolation and characterization of 20 microsatellite loci for an important tropical tree *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae) and their applicability to *S. parvifolia*. *Molecular Ecology Notes* 4: 222-225.
- Mariette, S., Chagne, D., Decroocq, S., Vendramin, G.G., Lalanne, C., Madur, D. Plomion, C. 2001. Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Ann. For. Sci.*, 58: 203-206.
- Moriguchi, Y., Iwata, H., Ujino-Ihara, T., Yoshimaru, K., Taira, H., Tsumura, Y. 2003. Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Theor. Appl. Genet.* 106: 751-758.
- Nei, M., Tajima, F., Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol.* 19: 153-170.
- Newman, M.F., Burgess, P.F., Whitmore, T.C. 1996. Manual of dipterocarps for foresters. Borneo Island light hardwoods: Anisoptera, Parashorea, Shorea (red, white and yellow meranti). Royal Botanic Garden Edinburgh, United Kingdom. 275 pp.
- Peakall, R., Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Rahman, M.H., Rajora, O.P. 2002. Microsatellite DNA fingerprinting, differentiation, and genetic relationship of clones, cultivars, and varieties of six poplar species from three sections of the genus *Populus*. *Genome* 45: 1083-1094.
- Rimbawanto, A., Shiraishi, S., Watanabe, A., Widyatmoko, A.Y.P.B.C. 1996. Tropical Plantation Establishment Improving Productivity through Genetic Practices. *Proceeding International Seminar*. Yogyakarta.
- Shiraishi, S., Watanabe, A. 1995. Identification of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb et Zucc and *P. thumbergii* Parl based on the polymorphism in *rbcL* gene. *Journal of Japanese Forestry Society* 77: 429-436.
- Soerianegara, I., Lemmens, R.H.M. 1994. Plant Resources of South-East Asia No. 5(1) Timber trees: Major commercial timbers. PROSEA, Bogor, Indonesia.
- Ujino, T., Kawahara, T., Tsumura, Y., Nagamitsu, T., Yoshimaru, H., Ratnam, W. 1998. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* 81: 422-428.