

# VARIASI ISOZIM PADA HUTAN TANAMAN *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese DI JAWA

## *Isozyme Variation of Pinus Merkusii Jungh. et de Vriese Plantation in Java*

Sapto Indrioko<sup>1</sup> dan Mohammad Na'iem<sup>2</sup>

*Program Studi Ilmu Kehutanan  
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada*

### ABSTRACT

The genetic variation of *P. merkusii* was investigated using seven loci from three enzyme systems, namely Esterase (EST), Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), and Shikimate dehydrogenase (ShDH) as marker genes. Three *P. merkusii* plantation populations in Sumedang, Kebasen, and Jember were chosen for this study.

Electrophoretic analysis of megagametophyte tissues in the three plantations revealed that overall genetic similarity was very high. The mean proportion of polymorphic loci was 85.7 percent, the mean number of alleles per locus was 2.286, and the mean expected heterozygosity was 0.259. Based on the inter-population genetic relationship among all plantations, Nei's genetic distances cluster analysis showed that all plantations have a low level and similar genetic base. However, in general it can be concluded that *P. merkusii* plantation population in Java has a moderate genetic variation.

**Keywords:** *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese -- enzyme system - polymorphic loci -- expected heterozygosity -- genetic distance -- cluster analysis.

## PENGANTAR

Keragaman karakteristik yang terdapat pada suatu populasi hutan dapat diwariskan kepada keturunannya, sehingga sifat-sifat yang ada pada suatu generasi akan muncul kembali pada generasi berikutnya. Hal ini disebabkan sifat-sifat yang dimiliki diturunkan secara genetik. Berdasarkan variasi genetik yang ada selanjutnya dapat dilakukan usaha pemuliaan pohon untuk meningkatkan kualitas sifat-sifat tersebut.

Studi variasi genetik diperlukan untuk mengetahui besarnya keragaman genetik pada suatu populasi, mengingat pentingnya informasi ini sebagai landasan kegiatan pemuliaan pohon. Untuk itu langkah awal yang perlu dipersiapkan sebelum dilakukan analisis genetik ialah tersedianya penanda genetik (*genetic marker*) yang dapat berdasarkan atas sifat morfologi atau biokimia.

---

1. Swasta

Penanda morfologi berdasarkan atas sifat-sifat yang tampak sebagai fenotip individu dan dilaksanakan dengan menguji keturunan pohon-pohon tersebut dalam suatu pertanaman uji (Adams, 1983). Pengujian ini menggunakan parameter pertumbuhan dan kenampakan pohon, sehingga diperlukan rancangan pertanaman uji yang tepat serta waktu relatif lama karena sifat pertumbuhan pohon yang lambat.

Penanda biokimia, misalnya dengan metode analisis isozim, dapat mengatasi kelemahan penanda morfologi. Variasi isozim dapat digunakan sebagai dasar penanda genetik karena merupakan refleksi langsung dari variasi genetik (Gardner *et al.*, 1991).

Salah satu jenis tanaman kehutanan yang perlu terus ditingkatkan sifat-sifat genetiknya adalah *P. merkusii*. Jenis ini merupakan satu-satunya anggota marga *Pinus* yang persebaran alaminya hingga di sebelah selatan garis khatulistiwa. Di Indonesia sendiri *P. merkusii* terdapat sebagai provenans di Aceh, Tapanuli, dan Kerinci (Cooling, 1968), selanjutnya telah dilakukan pembangunan hutan tanaman hingga persebarannya sekarang ke seluruh Pulau Jawa. Benih yang digunakan merupakan hasil introduksi dari Aceh (Hamzah dalam Satjapradja, 1983).

Pemuliaan *P. merkusii* dimulai dengan dibangunnya kebun benih semai uji keturunan di Sumedang, Baturaden, dan Jember (Soeseno *et al.*, 1994), serta dilanjutkan dengan berbagai penelitian lain. Untuk menunjang kegiatan pemuliaan jenis ini lebih lanjut perlu dilaksanakan studi keragaman genetik hutan tanaman *P. merkusii* di Pulau Jawa dengan menggunakan metode analisis isozim.

- Di dalam penelitian ini tujuan yang ingin dicapai adalah untuk :
1. Mengetahui variasi genetik baik di dalam maupun antar populasi hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa.
  2. Mengetahui hubungan genetik antar populasi hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa.

## CARA PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan megagametofit benih *P. merkusii*. Pengunduhan sampel benih dilaksanakan di tiga lokasi yang mewakili hutan tanaman di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur seperti tercantum dalam Tabel 1.

Sistem enzim yang digunakan harus sesuai dengan jenis tanaman dan bahan jaringan megagametofit yang akan diteliti. Sesuai dengan pendapat Kartikawati (1996) yang telah melakukan penelitian analisis genetik terhadap *P. merkusii*, terdapat 3 sistem enzim polimorfik untuk jenis ini yaitu *Esterase* (EST), *Glutamate oxaloacetate transaminase* (GOT), dan *Shikimate dehydrogenase* (ShDH). Dari analisis genetik ini diperoleh 7 lokus polimorfik yang dapat digunakan sebagai penanda genetik, yaitu : *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Got-1*, *Got-2*, *Shd-1*, dan *Shd-2*.

Tabel 1. Deskripsi lokasi asal benih yang dipergunakan dalam penelitian

No	Pertanaman	Jumlah pohon	Lokasi
1	Ht. tanaman di Sumedang (Jawa Barat)	50	Petak 7b, RPH Cijambu, BKPH Manglayang Timur, KPH Sumedang (Th. tanam 1983)
2	Ht. tanaman di Kebasen (Jawa Tengah)	89	Petak 48a, RPH Mandirancan, BKPH Kebasen, KPH Banyumas Timur (Th. tanam 1984)
3	Ht. tanaman di Jember (Jawa Timur)	50	Petak 35, RPH Sumberjati, BKPH Sempolan, KPH Jember (Th. tanam 1957)

Penelitian analisis isozim dilaksanakan dengan menggunakan prosedur kerja elektroforesis gel *polyacrylamide* secara vertikal (*polyacrylamide vertical slab gel electrophoresis*), yang berpedoman pada metode yang dikembangkan oleh David-Ornstein pada tahun 1964 (Na'iem, 1991). Jaringan megagametofit benih *P. merkusii* yang telah dikembang-bahkan digunakan sebagai bahan, kemudian enzim diekstraksi dengan cara ditambahkan *extract buffer* dan ditumbuk hingga homogen, selanjutnya diputar dalam mesin pemutar sentrifugal pada suhu 0°C dengan kecepatan 15.000 rpm selama 20 menit. Larutan bening (*supernatant*) hasil sentrifugasi digunakan sebagai bahan untuk elektroforesis.

Terdapat 2 macam gel *polyacrylamide* yang berbeda kekekatannya yang digunakan proses elektroforesis. *Running gel* terletak di bagian bawah dengan kepekatan 7,5 % dan *spacer gel* di bagian atas dengan kepekatan 3,75 %.

Proses elektroforesis dilakukan pada suhu 4°C, dengan arus listrik 100 mA selama 180-200 menit. Selanjutnya gel diperlakukan dengan larutan pewarna (*staining*) sesuai sistem masing-masing. Pengamatan alel dilakukan berdasarkan data yang diperoleh dari hasil interpretasi pola berkas (*banding patterns*) gel. Alel ditentukan dengan perhitungan nilai  $R_f$  (*Relative value to the Bromophenol blue front*) pada masing-masing zone dan lokus. Parameter yang diukur untuk mengetahui besarnya keragaman genetik, yaitu :

1. Variasi genetik di dalam dan antar populasi sesuai Liengsiri *et al.* (1990) dihitung melalui proporsi (persentase) lokus-lokus yang polimorfik (PI), frekuensi alel dan rata-rata jumlah alel masing-masing lokus ( $N_a$ ), serta heterozigositas harapan/*expected heterozygosity* ( $H_e$ ), Nilai heterozigositas harapan dihitung dengan rumus:

$$H_e = (1 - \sum_i p_i^2)$$

Keterangan:

$p_i$  = frekuensi alel ke-i

2. Jarak genetik (*genetic distance*) untuk mengetahui keeratan hubungan genetik antar populasi yang oleh Nei (1987) dihitung dengan rumus:

$$D = -\log_e I$$

Sedangkan nilai I diperoleh dari perhitungan :

$$I = \sum_i x_i y_i / \sqrt{(\sum_i x_i^2 \sum_i y_i^2)}$$

Keterangan :

D = jarak genetik antara populasi x dan y

I = identitas genetik normal untuk populasi x dan y

$x_i y_i$  = perkalian frekuensi alel ke-i pada populasi x dan y

$x_i^2$  = kuadrat frekuensi alel ke-i pada populasi x

$y_i^2$  = kuadrat frekuensi alel ke-i pada populasi y

Nilai signifikansi hasil perhitungan jarak genetik antar populasi tersebut di atas perlu diketahui dengan menggunakan pengujian 2 menurut Nei (1987) :

$$c^2 = 2 n_x n_y \sum_i [(x_i - y_i)^2 / (n_x x_i + n_y y_i)]$$

Keterangan :

$n_x$  = jumlah sampel pada populasi x

$n_y$  = jumlah sampel pada populasi y

$x_i$  = frekuensi alel ke-i pada populasi x

$y_i$  = frekuensi alel ke-i pada populasi y

Untuk mengetahui gambaran hubungan genetik antar populasi, maka perlu disusun dendrogram. Oleh karena itu dilanjutkan perhitungan analisis kelompok (*cluster analysis*) seperti dijelaskan Nei (1987) berdasarkan metode jarak rata-rata (*unweighted pair-group method with arithmetic mean / UPGMA*).

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### Variasi Genetik

Di dalam analisis genetik terhadap *P. merkusii* oleh Kartikawati (1996) telah diamati alel-alel yang terdapat pada jenis ini dengan menggunakan 8 sistem enzim, selanjutnya dalam penelitian ini ditemukan tambahan beberapa alel polimorfik seperti tercantum pada Tabel 2.

Berdasarkan pengamatan pola berkas pada seluruh nomor pohon dari ketiga sistem enzim polimorfik yang diteliti, selanjutnya dihitung frekuensi alel dan heterozigositas harapan ( $H_e$ ) untuk masing-masing lokus seperti disajikan pada Tabel 3.

Tabel 2. Jumlah alel dan kedudukan Rf untuk setiap sistem enzim pada jenis *P. merkusii*

Sistem	Zone	Lokus	Jumlah alel	Rf masing-masing alel (%)				
				a	b	c	d	o
ACP	<i>Acp-1</i>	-	1	16	-	-	-	-
	<i>Acp-2</i>	-	1	42-45	-	-	-	-
DIA	<i>Dia-1</i>	-	1	19	-	-	-	-
	<i>Dia-2</i>	-	1	37	-	-	-	-
	<i>Dia-3</i>	-	1	44-65	-	-	-	-
EST	<i>Est-1</i>	-	1	36-40	-	-	-	-
	<i>Est-2</i>	<i>Est-1</i>	3	56	59	62	-	-
	<i>Est-3</i>	<i>Est-2</i>	3	72	(74)	(76)	-	-
	<i>Est-4</i>	-	1	77	-	-	-	-
	<i>Est-5</i>	<i>Est-3</i>	2	85	88	-	-	-
GDH	<i>Gdh-1</i>	-	1	14	-	-	-	-
G2DH	<i>G2dh-1</i>	-	1	24	-	-	-	-
	<i>G2dh-2</i>	-	1	35	-	-	-	-
GOT	<i>Got-1</i>	<i>Got-1</i>	4	14	16	19	(22)	-
	<i>Got-2</i>	<i>Got-2</i>	2	23	28	-	-	-
	<i>Got-3</i>	-	1	36	-	-	-	-
LAP	<i>Lap-1</i>	-	1	37	-	-	-	-
ShDH	<i>Shd-1</i>	<i>Shd-1</i>	2	30	34	-	-	-
	<i>Shd-2</i>	<i>Shd-2</i>	5	39	42	(45)	-	(null)

Sumber = Kartikawati (1996)

( ) = Alel baru yang ditemukan pada penelitian ini

Persebaran frekuensi alel yang kurang lebih sama di antara ketiga populasi hutan tanaman menunjukkan kecilnya variasi genetik di antara populasi-populasi tersebut. Untuk melihat lebih jauh perbandingan tingkat variasi genetik di antara ketiga populasi yang diuji selanjutnya dihitung persentase lokus-lokus polimorfik (PI), rata-rata jumlah alel setiap lokus ( $N_a$ ), serta heterozigositas harapan ( $H_e$ ) pada setiap populasi hutan tanaman tercantum pada Tabel 4 dengan nilai yang kurang lebih sama. Dapat dikemukakan bahwa antar semua populasi yang diuji terdapat variasi yang kecil.

Tabel 3. Frekuensi alel dan heterozigositas harapan setiap lokus pada populasi hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa

Lokus	Alel	Frekuensi Alel		
		Ht Tanaman di Sumedang	Ht tanaman di Kebasen	Ht tanaman di Jember
<i>Est-1</i>	<i>a</i>	0,000	0,000	0,000
	<i>b</i>	0,051	0,028	0,030
	<i>c</i>	0,949	0,972	0,970
	He	0,097	0,054	0,058
<i>Est-2</i>	<i>a</i>	0,000	0,011	0,010
	<i>b</i>	0,970	0,921	0,950
	<i>c</i>	0,030	0,068	0,040
	He	0,058	0,147	0,096
<i>Est-3</i>	<i>a</i>	0,520	0,494	0,470
	<i>b</i>	0,480	0,506	0,530
	He	0,499	0,500	0,498
<i>Got-1</i>	<i>a</i>	0,020	0,017	0,060
	<i>b</i>	0,250	0,304	0,330
	<i>c</i>	0,680	0,640	0,590
	<i>d</i>	0,050	0,039	0,020
	He	0,472	0,496	0,539
<i>Got-2</i>	<i>a</i>	0,104	0,017	0,09
	<i>b</i>	0,896	0,983	0,91
	He	0,186	0,033	0,164
<i>Shd-1</i>	<i>a</i>	0,000	0,000	0,000
	<i>b</i>	1,000	1,000	1,000
	He	0,000	0,000	0,000
<i>Shd-2</i>	<i>a</i>	0,510	0,421	0,540
	<i>b</i>	0,490	0,523	0,460
	<i>c</i>	0,000	0,039	0,000
	<i>o</i>	0,000	0,017	0,000
	He	0,500	0,547	0,497

Tabel 4. Perbandingan tingkat variasi genetik populasi hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa

Pertanaman	Lokus Polimorfik (%)	Rata-rata Jumlah Alel/ Lokus	Heterozigositas Harapan (He)
Ht. Tanaman di Sumedang	85,7	2,143	0,259
Ht. Tanaman di Kebasen	85,7	2,429	0,254
Ht. Tanaman di Jember	85,7	2,286	0,265
Rata-rata	85,7	2,286	0,259

Apabila dibandingkan dengan beberapa jenis *Pinus* yang telah diteliti keragamannya, *P. merkusii* di Pulau Jawa menunjukkan nilai heterozigositas harapan yang termasuk moderat/menengah sebagaimana disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil penelitian studi variasi genetik pada beberapa jenis *Pinus*

Jenis	Heterozigositas harapan ( $H_e$ )	Sumber
<i>P. contorta</i> ssp. <i>latifolia</i>	0,154	Yeh (1979)
<i>P. densiflora</i>	0,314	Na'iem (1991)
<i>P. kesiya</i>	0,169	Boyle <i>et al.</i> (1991)
<i>P. monticola</i>	0,180	Steinhoff <i>et al.</i> (1983)
<i>P. pungens</i>	0,204	Gibson dan Hamrick (1991)
<i>P. rigida</i>	0,146	Guries dan Ledig (1982)
<i>P. thunbergii</i>	0,279	Shiraisi <i>et al.</i> (1988)
<i>P. merkusii</i>	0,259	Indrioko (1996)

### Hubungan Genetik

Dengan data frekuensi alel kemudian dihitung jarak genetik berdasarkan *Nei's genetic distance* untuk mengamati hubungan di antara seluruh populasi yang diuji. Hasil perhitungan jarak genetik dapat disimak pada Tabel 6.

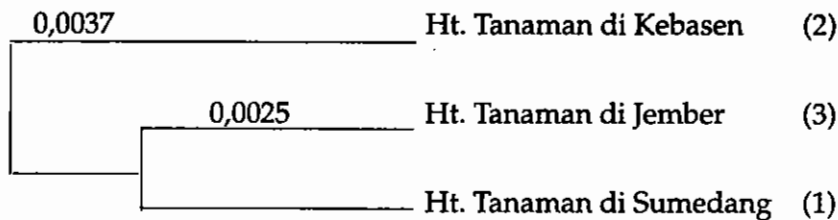
Tabel 6. Jarak genetik di antara populasi hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa

Pertanaman	Ht. Tanaman di Sumedang (1)	Ht. Tanaman di Kebasen
Ht. Tanaman di Sumedang (1)	-	
Ht. Tanaman di Kebasen (2)	0,0036 ns *)	-
Ht. Tanaman di Jember (3)	0,0025 ns *	0,0037 ns *)

\*) : tidak berbeda nyata pada  $\alpha = 0,01$

Tampak bahwa di antara semua populasi yang diuji terdapat kecilnya perbedaan genetik. Hal ini dicerminkan dengan nilai jarak genetik yang rendah. Pengujian 2 memperlihatkan bahwa semua jarak genetik di antara hutan tanaman tidak berbeda nyata.

Untuk mengetahui lebih lanjut mengenai pola hubungan genetik di antara semua populasi selanjutnya dilakukan analisis kelompok (*cluster analysis*) berdasarkan metode jarak rata-rata. Dendrogram yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil analisis kelompok di antara hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa.

Berdasarkan Gambar 1 tersebut di atas, dapat dikemukakan bahwa meskipun dengan analisis kelompok diperoleh adanya pengelompokan, yaitu hutan tanaman di Sumedang dan Jember di satu pihak serta hutan tanaman di Kebasen di pihak lain, namun di antara semua populasi hutan tanaman yang ada memiliki hubungan genetik yang erat. Oleh karena hasil pengujian 2 pada Tabel 6 menunjukkan semua jarak genetik di antara hutan tanaman tidak berbeda nyata, maka hasil pengelompokan pada Gambar 1 di atas tidak menunjukkan adanya sub-sub populasi di antara hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa.

Hubungan genetik yang erat pada hutan tanaman di Sumedang, Kebasen, dan Jember mengandung pengertian bahwa sumber benih yang dulu digunakan untuk menanam hutan diduga memiliki variasi genetik yang terbatas. Dengan kata lain benih yang digunakan dahulu diduga bersumber dari areal produksi benih yang berasal dari tegakan tertentu dan terbatas luasannya, sehingga basis genetik (*genetic base*) yang dimiliki cukup sempit.

Basis genetik yang sempit ini dapat menyebabkan terjadinya efek silang dalam (*inbreeding depression*). Kawin kerabat secara perlahan-lahan menyeleksi individu-individu dengan genotip buruk, kemudian lambat laun jumlahnya menurun dan akhirnya hilang dari populasi. Sebaliknya genotip yang ada dalam individu pada suatu populasi akan diwariskan kepada generasi berikutnya berarti memiliki keunggulan, yang selanjutnya genotip ini akan tetap bertahan dan menyebar di dalam populasi.

Apabila dikaji berdasarkan sejarah persebarannya, basis genetik hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa yang cukup sempit ini disebabkan oleh sumber benih yang digunakan untuk introduksi pertama kali dari Sumatra hanya berasal dari populasi persebaran alami yang terbatas pula basis genetiknya. Hamzah dalam Satjapradja (1983) menjelaskan bahwa *P. merkusii* di Jawa diintroduksi hanya dari provenans Aceh, sedangkan di Pulau Sumatra sendiri terdapat tiga provenans *P. merkusii*, yaitu Aceh, Tapanuli, dan Kerinci (Cooling, 1968).

Untuk mengkaji lebih lanjut sejauh mana peran basis genetik yang dimiliki pertanaman *P. merkusii* yang ada di Pulau Jawa untuk program pemuliaan lebih lanjut, perlu dibandingkan dengan jenis *P. merkusii* yang berada pada persebaran alaminya. Studi keragaman genetik perlu



dilaksanakan untuk mengetahui besarnya variasi genetik di dalam dan antar populasi *P. merkusii* pada persebaran alaminya. Hal ini penting karena di samping untuk mengetahui asal-usul jenis *P. merkusii* yang berada di Pulau Jawa, sekaligus juga dapat digunakan untuk menentukan strategi pemuliaan (*breeding*) dan konservasi genetik *P. merkusii* di masa mendatang.

Strategi pemuliaan memerlukan informasi mengenai variasi genetik *P. merkusii* pada persebaran alaminya. Hal ini sangat penting terutama apabila diketahui bahwa di antara populasi *P. merkusii* pada persebaran alami bila dibandingkan dengan hutan tanaman menunjukkan perbedaan keragaman genetik yang besar. Dengan demikian di dalam strategi pemuliaan jenis ini lebih lanjut harus melibatkan penggunaan sumber benih yang berasal dari seluruh provenans yang ada.

Konservasi genetik perlu dilakukan demi menjaga keragaman genetik yang dimiliki untuk penggunaan dan adaptasi terhadap kebutuhan pada masa mendatang yang sekarang mungkin belum diketahui (Zobel dan Talbert, 1984). Melalui metode analisis isozim, berbagai informasi yang berkaitan erat dengan kegiatan konservasi

genetik, antara lain persebaran variasi genetik di dalam dan antar populasi, informasi genetik benih yang dikoleksi (Adams, 1983), serta pemantauan hilangnya variasi genetik dalam populasi yang dikelola dalam usaha konservasi genetik baik secara *ex-situ* maupun *in-situ* (Hamrick *et al.*, 1991).

## KESIMPULAN

Berdasarkan atas hasil penelitian, analisis hasil, serta pembahasan dapat dikemukakan kesimpulan sebagai berikut :

1. Analisis isozim dengan menggunakan sistem enzim EST, GOT, dan ShDH yang dilakukan terhadap hutan tanaman *P. merkusii* di Pulau Jawa menunjukkan variasi genetik yang kecil antar populasi yang diuji. Terdapat 85,7% lokus polimorfik, setiap lokus rata-rata terdapat 2,25 alel, dan heterozigositas harapan ( $H_e$ ) sebesar 0,259. Namun bila dibandingkan dengan jenis yang lain, *P. merkusii* di Jawa memiliki variasi genetik yang moderat.
2. Hubungan genetik *P. merkusii* di Pulau Jawa di antara hutan tanaman dekat karena memiliki basis genetik yang cukup sempit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adams, W.T., 1983, Application of Isozymes in Tree Breeding, dalam S.D. Tanksley, and T.J. Orton (eds) : *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, pp. 381-400, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Cooling, E.N.G., 1968, *Pinus merkusii*, Commonwealth Forestry Institute, Department of Forestry, University of Oxford.

- Gardner, E.J., M.J. Simmons, D.P. Snustad, 1991, *Principles of Genetics*, Eighth Edition, John Wiley & Sons, New York.
- Hamrick, J.L., M.J.W. Godt, D.A. Murawski. M.D. Loveless, 1991, *Correlations Between Species Traits and Allozyme Diversity : Implications for Conservation Biology*, dalam D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds): *Genetics and Conservation of Rare Plants*, pp. 76-86, Oxford University Press, New York.
- Kartikawati, N.K., 1996, *Pewarisan Pola Berkas Jaringan Megagametofit Pinus merkusii Jungh. et de Vriese dengan Menggunakan Metode Isozim*, Skripsi S1, Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Liengsiri, C., C. Piewlang, T.J.B. Boyle, 1990, *Starch Gel Electrophoresis of Tropical Trees, A Manual*, ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre, Muak Lek, Saraburi.
- Na'iem, M., 1991, *Inheritance and Linkage of Allozyme of Megagametophyte of Japanese Red Pine Plus-Tree Clones Selected from Natural Stands in Japan*, PhD Thesis, Divison of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba.
- Nei, M., 1987, *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York.
- Satjapradja, O., 1983, *Evaluasi Lahan Tegakan Pinus*, *Simposium Pengusahaan Hutan Pinus*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Hasil Hutan dan Perum Perhutani, 27-28 Juli 1983, Jakarta.
- Soeseno, O.H., E.B. Hardiyanto, M. Na'iem, 1994, *Sejarah Pembangunan Kebun benih Pinus merkusii di Jawa*, Kerjasama Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada dan Perum Perhutani, Yogyakarta.
- Zobel, B. and J. Talbert, 1984, *Applied Forest Tree Improvement*, John Wiley & Sons, New York.