//

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
FAKULTAS KEHUTANAN INSTITUT PERTANIAN BOGOR
DEPARTEMEN HASIL HUTAN

Kampus IPB Darmaga PO BOX 168 Bogor 16001 Alamat Kawat FAHUTAN Bogor
Phone : (0251) 621285, Fax : (0251) 621256 - 621 285, E-mail : dhh@ipb.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 26 /K13.5.3/TU/2007

Yang bertandatangan dibawah ini Departemen Hasil Hutan Fakultas Kehutanan IPB, menerangkan bahwa Hasil Penelitian/Karya Ilmiah dengan Judul "**Pengembanan Metode Penanda Genetika Molekuler Untuk Lacak Balak (Studi Kasus pada Jati)**"

Penulis :
Dr.Ir.Iskandar Z Siregar, MSc
Dr.Ir. Ulfah Z Siregar, MAgr
Dr. Lina Karlinasari, S.Hut., MSc.F.
Tedy Yunanto, S.Hut.

Penerbit :
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat IPB (LPPM-IPB)

sebagai Laporan Akhir Penelitian dalam rangka Hibah Bersaing XIV tahun 2006 sebagaimana terlampir, telah tercatat dan tersimpan di Perpustakaan Departemen Hasil Hutan Fakultas Kehutanan IPB.

Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, 30 APR 2007
Ketua,

a.n. Dr.Ir. Dede Hermawan, MSc
NIP. 131 950 984

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN HIBAH BERSAING

A. Judul Penelitian : Pengembangan Metode Penanda Genetika Molekuler untuk Lacak Balak (Studi kasus pada Jati)

B. Ketua Peneliti :
   a. Nama Lengkap & Gelar : Dr. Ir. Iskandar Z. Siregar, M.For.Sc.
   b. Jenis Kelamin : Laki-laki
   c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata Tk.I/IIId/131878498
   d. Bidang Keahlian : Genetika Hutan & Pemuliaan Pohon
   e. Fakultas/Departemen : Kehutanan/Silvikultur
   f. Perguruan Tinggi : Institut Pertanian Bogor

C. Tim Peneliti

Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Dept.	Perguruan Tinggi
1. Dr. Ir. Iskandar Z. Siregar	Genetika Hutan dan Pemuliaan Pohon	Silvikultur	IPB
2. Dr. Ir. Ulfah J. Siregar	Genetika Molekuler	Silvikultur	IPB
3. Lina Karlinasari, S.Hut, M.Sc	Teknologi Kayu	Hasil Hutan	IPB
4. Tedi Yunanto, S.Hut	Teknik Analisis DNA	Silvikultur	IPB

D. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
   Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 (Tiga) Tahun
   Biaya total yang diusulkan : Rp. 146.091.000,-
   Biaya yang disetujui Tahun 2006 : Rp. 33.000.000,-

Bogor, 30 Oktober 2006
Ketua Peneliti,

Dr. Iskandar Z. Siregar
NIP. 131 878 498

Mengetahui
Dekan,

Prof. Dr. Cecep Kusmana
NIP. 131 430 799

Menyetujui
Kepala Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat
Institut Pertanian Bogor

Prof. Dr. Ir. H. Rizal Syarief S., DESS
NIP. 130 367 108

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN HIBAH BERSAING

A. Judul Penelitian : Pengembangan Metode Penanda Genetika Molekuler untuk Lacak Balak (Studi kasus pada Jati)

B. Ketua Peneliti :
- a. Nama Lengkap & Gelar : Dr. Ir. Iskandar Z. Siregar, M.For.Sc.
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata Tk.I/IIId/131878498
- d. Bidang Keahlian : Genetika Hutan & Pemuliaan Pohon
- e. Fakultas/Departemen : Kehutanan/Silvikultur
- f. Perguruan Tinggi : Institut Pertanian Bogor

C. Tim Peneliti

Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Dept.	Perguruan Tinggi
1. Dr. Ir. Iskandar Z. Siregar	Genetika Hutan dan Pemuliaan Pohon	Silvikultur	IPB
2. Dr. Ir. Ulfah J. Siregar	Genetika Molekuler	Silvikultur	IPB
3. Lina Karlinasari, S.Hut, M.Sc	Teknologi Kayu	Hasil Hutan	IPB
4. Tedi Yunanto, S.Hut	Teknik Analisis DNA	Silvikultur	IPB

D. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
- Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 (Tiga) Tahun
- Biaya total yang diusulkan : Rp. 146.091.000,-
- Biaya yang disetujui Tahun 2006 : Rp. 33.000.000,-

Bogor, 30 Oktober 2006
Ketua Peneliti,

Dr. Iskandar Z. Siregar
NIP. 131 878 498

Mengetahui
Dekan

Prof. Dr. Cecep Kusmana
NIP. 131 430 799

Menyetujui
Kepala Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat
Institut Pertanian Bogor

Prof. Dr. Ir. H. Rizal Syarief S., DESS
NIP. 130 367 108

Penggunaan metode penanda genetika untuk bidang kehutanan di Indonesia umumnya masih diarahkan untuk tujuan konservasi genetik dan pemuliaaan pohon. Penggunaan untuk tujuan lain seperti untuk melacak asal-usul kayu dalam rangka sertifikasi lacal balak (*chain of custody*) sejauh pengetahuan peneliti belum pernah dilakukan di Indonesia. Contoh jenis kayu yang sedang menuju proses sertifikasi ekolabel di Indonesia adalah Jati karena harganya yang mahal, permintaannya yang tinggi baik domestik maupun internasional serta adanya tuntutan konsumen produk Jati yang ramah lingkungan. Penggunaan penanda molekuler seperti DNA merupakan salah satu metode baru yang dapat dikembangkan dan diterapkan di masa datang untuk sertifikasi lacak balak atau tujuan lain. Penelitian yang direncan selama tiga tahun ini, pada tahun pertama (Tahun I) bertujuan untuk menduga Keragaman DNA Jati melalui survey genetik Jati di Jawa berdasarkan penanda *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms* (PCR-RFLPs) dan *random amplifification of polymorphic DNA* (RAPD). Pada Tahun I, pengambilan contoh bahan tanaman berupa daun dan potongan kayu secara representatif dilakukan pada sentra hutan tanaman Jati yang tumbuh di sembilan lokasi di Jawa, yaitu Ciamis, Banten, Indramayu, Cepu, Kendal, Randublatung, Kebonharjo, Bojonegoro dan Ngawi. Hasil analisis DNA yang dilakukan di Laboratorium Silvikultur, Fakultas Kehutanan IPB menunjukkan keragaman cpDNA Jati Jawa yang rendah, dimana kombinasi amplifikasi dengan primer *trnLF* dan restriksi dengan enzim *AluI* menghasilkan dua haplotipe Jati (haplotipe I dan haplotipe 2). Haplotipe 1 merupakan haplotipe dominan dengan frekuensi berkisar 80%-100%. Keragam cpDNA yang rendah yang diperoleh dari penelitian ini belum dapat dijadikan sebagai kunci diagnostik untuk menentukan asal-usul individu. Selain itu, analisis gerombol cpDNA belum mendapatkan pola pengelompokkan yang spesifik, dimana wilayah Jati masih bercampur seperti Jati KPH Banten, KPH Cepu, KPH Randublatung, KPH Bojonegoro, KPH Ngawi, KPH Kebonharjo, dan Jati Muna sebagai pembanding yang membentuk kelompok pertama, dan kemudian membentuk kelompok besar dengan gerombol Jati KPH Ciamis, KPH Indramayu, dan KPH Kendal. Di lain pihak, keragaman DNA Jati di Jawa berdasarkan analisis RAPD menunjukkan pola pengelompokkan yang lebih jelas, dimana Jati Jawa Barat-Banten (KPH Ciamis, Banten dan Indramayu) membentuk gerombol tersendiri dan dapat dipisahkan secara jelas dengan Jati Jawa Tengah dan Jawa Timur. Pola pengelompokkan seperti ini dapat dijadikan sebagai awal pencarian penanda diagnostik. Secara umum Jati Jawa Barat-Banten memiliki keragaman DNA yang lebih tinggi (h=0.15-0.27) dibanding dengan Jati Jawa Tengah dan Jawa Timur (h=0.06-0.16). Diduga populasi Jati Jawa Barat-Banten dibangun dari sumber benih yang berbeda dengan Jati Jawa Tengah dan Jawa Timur serta mengalami proses evolusi yang lebih dinamis. Oleh karena itu, pendugaan asal-usul kayu dan bahan tanaman dari daerah Jawa Barat-Banten adalah mungkin untuk dilakukan.

Genetic tools in forestry are usually used to support program on genetic conservation and tree breeding. Another use of genetic tools for inferring the wood origin has not been carried out in Indonesia. This activity is known as chain of custody (CoC) procedure in wood industry. Teak has been selected in this reseacrh due its high prices and demand as well as growing consumer demand for environmentally friendly product. The use of genetic marker to track teak timber origin or other purposes is hoped based on this research to become operational in the near future. The objective of the first year research which is part of the three year research plan was to estimate DNA variation at marker loci detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLPs) and random amplifification of polymorphic DNA (RAPD). In the first year, focus of activities was to collect randomly materials such as leaves and wood pieces from nine centers of teak plantations/forest management unit (FMU) throughout Java, namely FMU Ciamis, FMU Banten, FMU Indramayu, FMU Cepu, FMU Kendal, FMU Randublatung, FMU Kebonharjo, FMU Bojonegoro dan FMU Ngawi. Results showed that cpDNA variation of teak in Java was very low as detected by combination of universal primer *trnLF* for cpDNA amplification and enzyme restriction *AluI*. There were only two haplotypes in which haplotype 1 (two fragment sizes) showed dominant frequencies compared to haplotype 2 (three fragment sizes). In polymorphic population, the frequency of haplotype 2 was around 80%. However, cpDNA variation observed based on haplotype frequencies and cluster analysis can not yet be used as diagnostic marker in this research. On the other hand, DNA variation based on RAPD showed better grouping of population in which teak populastion in West Java-Banten has clustered together and clearly separated from population of Central Java and East Java. Such clustering can be used as initial searching for diagnotic marker. In general, teak in West Java revealed higher DNA varation (h=0.15-0.27) than that of Central and East Java (h=0.06-0.16). It seems that plantation population of teak in West Java-Banten was established from different seed sources and still undergoing more dynamic evolutionary processes. Therefore, inferring origin of timber or planting materials from West Java-Banten population is possible to be carried out.

PRAKATA

Laporan Akhir berjudul "Pengembangan Metode Penanda Genetika Molekuler untuk Lacak Balak (Studi kasus pada Jati)" ini disusun untuk memenuhi salah satu butir Kerjasama Penelitian antara LPPM IPB dengan Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi dengan Nomor Kontrak: 317/SP3/PP/DP2M/2006 Tanggal 1 Pebruari 2006

Laporan Akhir ini berisi hasil penelitian yang telah dilakukan dari April hingga Akhir Oktober 2006. Penelitian lapangan berupa pengambilan contoh uji dilakukan di areal kerja Perum Perhutani Unit I Jawa Tengah, Unit II Jawa Timur dan Unit III Jawa Barat-Banten. Adapun penelitian laboratorium berupa analisis DNA dengan teknik PCR-RFLP dan RAPD sebagian besar dilakukan di Laboratorium Silvikultur Fakultas Kehutanan IPB.

Semoga laporan ini dapat memberikan gambaran mengenai temuan-temuan yang bermanfaat dalam rangka penyusunan basis data variasi genetik Jati di Jawa untuk berbagai keperluan diantaranya adalah untuk kegiatan penelusuran asal-usul bahan tanaman maupun kayu dan produk olahannya. Akhirnya ucapan terima kasih kami sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian hingga tersusunnya laporan ini.

Bogor, Oktober 2006

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

DAFTAR LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

I. PENDAHULUAN

Penggunaan metode penanda genetika untuk bidang kehutanan di Indonesia umumnya masih diarahkan untuk mendukung kegiatan konservasi genetik dan pemuliaaan pohon dari jenis-jenis unggulan. Penggunaan untuk tujuan lain seperti untuk melacak asal-usul kayu sejauh pengetahuan peneliti belum pernah dilakukan di negeri ini. Sertifikasi lacak balak (*chain of custody*) merup salah satu kegiatan utama sertifikasi ekolabel untuk memantau aliran kayu dari hutan ke pabrik. Contoh jenis kayu yang sedang menuju proses sertifikasi ekolabel di Indonesia adalah Jati karena harganya yang mahal, permintaannya yang tinggi baik domestik maupun internasional serta adanya tuntutan konsumen produk Jati yang ramah lingkungan. Sertifikasi lacak balak menuntut adanya suatu prosedur dokumentasi aliran kayu yang dapat diandalkan. Akan tetapi prosedur dokumentasi ini belum dilengkapi dengan metode pembuktian yang akurat untuk memecahkan kasus asal-usul kayu yang meragukan. Penggunaan penanda molekuler seperti DNA merupakan salah satu metode baru yang dapat dikembangkan dan diterapkan di masa datang untuk sertifikasi lacak balak atau tujuan lain. Penelitian yang direncan selama tiga tahun ini, pada tahun pertama (Tahun I) bertujuan untuk menduga Keragaman DNA Jati melalui survey Keragaman genetik berdasarkan penanda *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms* (PCR-RFLPs) dan *random amplifification of polymorphic DNA* (RAPD) (Tahun I).

Pada Tahun I, pengambilan contoh bahan tanaman secara representatif dilakukan pada hutan tanaman Jati yang tumbuh di sembilan lokasi di Jawa, yaitu Ciamis, Banten, Indramayu, Cepu, Kendal, Randublatung, Kebonharjo, Bojonegoro dan Ngawi. Ke sembilan lokasi tanaman Jati tersebut merupakan sentra-sentra tanaman Jati yang dikelola oleh Perum Perhutani.

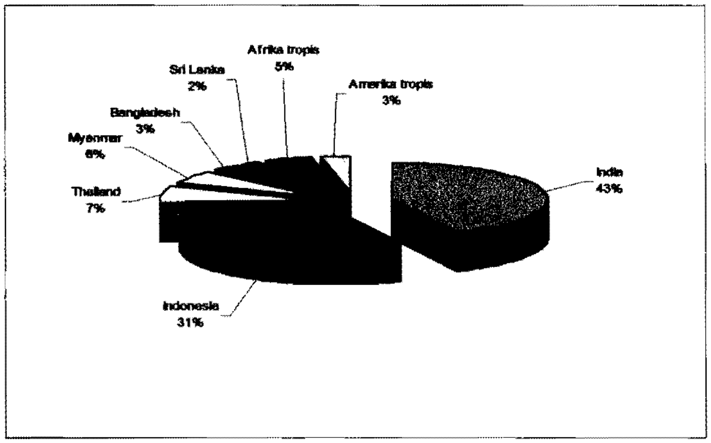
Analisis DNA dilakukan di Laboratorium Silvikultur, Fakultas Kehutanan IPB. Selain itu, penelitian ini juga mengeksplorasi metode ekstraksi DNA dari kayu yang sesuai, karena hal ini merup pra-syarat aplikabilitasnya di lapangan (Tahun II). Hasil penelitian di laboratorium tersebut selanjutnya diaplikasikan untuk pembuktian kasus lacak balak di lapangan serta dievalusi kemungkinannya untuk diadopsi secara legal dalam pemberantasan penebangan ilegal (Tahun III). Diharapkan hasil yang diperoleh nantinya dapat dijadikan sebagai salah satu rujukan untuk membantu pengumpulan basis data asal-usul kayu secara luas dari jenis-jenis pohon tropis komersil lainnya seperti meranti, merbau, ramin dll. Selain untuk tujuan pendugaan asal usul kayu, data yang diperoleh sangat bermanfaat untuk keperluan penyusunan program konservasi sumberdaya genetik dan pemuliaan tanaman hutan.

II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE SATU

Tujuan umum penelitian adalah untuk mengetahui aplikabilitas metode penanda genetik dalam melacak asal usul kayu untuk keperluan sertifikasi lacak balak (*chain of custody*). Penelitian ini mengambil obyek pohon dan kayu Jati karena peranan Indonesia sebagai salah satu produsen utama Jati dunia. Selain bernilai tinggi, suplai Jati di pasaran domestik maupun internasional terbatas. Dalam perdagangan antar negara, tuntutan masyarakat konsumen atas produk kayu dan hasil olahannya yang dipanen dari hutan Jati yang dikelola secara lestari semakin lama semakin meningkat. Sehingga kegiatan sertifikasi asal usul kayu atau lebih dikenal dengan sertifikasi lacak balak (*chain of custody, CoC*) perlu dilengkapi dengan metode baru yang akurat untuk dapat memonitor dan memverifikas perger kayu Jati dari hutan ke tempat penimbunan hingga ke konsumen akhir. Jika metode ini dapat diterapkan, maka penggunaannya selain untuk mendukung sertifikasi hutan juga untuk pembuktian pada kasus kejahatan hutan seperti, penebangan ilegal. Untuk memenuhi harapan di atas, penelitian tahun pertama dirancang dengan tujuan khusus untuk menghimpun basis data Keragaman genetik Jati di Jawa berdasarkan penanda DNA, khususnya PCR-RFLP untuk cpDNA dan RAPD untuk DNA total Jati.

3.1. Jati sebagai Produk Unggulan Indonesia

Saat ini Jati ditanam di sekurangnya 36 negara tropis baik di benua Asia, Afrika dan Amerika dengan luas mencapai sekitar 5,7 juta ha atau 3% dari hutan tanaman dunia. Sekitar 97% dari luasan tersebut berada di Asia seperti India, Indonesia, Myanmar, Thailand dll (Bhat & Ma, 2004). Secara lebih terperinci, distribusi global Jati disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Distribusi global hutan tanaman Jati menurut negara/wilayah

Data tersebut di atas menempatkan Indonesia sebagai salah satu pemain penting dalam bisnis kayu Jati dunia. Posisi tersebut harus tetap dipertahankan atau bahkan dapat ditingkatkan, sehingga Indonesia masih dapat memanfaatkan daya tarik Jati karena harganya yang tinggi, khususnya kayu Jati yang berasal dari hutan tanaman dengan rotasi tradisional yang lama (80 tahun).

Saat ini kebutuhan kayu Jati dalam negeri diperkir mencapai 1,5 juta m^3, sementara kemampuan lestari hutan Jati milik Perum Perhutani di Jawa yang ada sekitar 0,6 juta m^3. Pada tahun 2010 kebutuhan ini diperkir meningkat hingga 5,1 juta m^3 (Pasaribu, 2002). Sehingga kecenderungan ke depannya, kebutuhan tersebut harus dapat dipenuhi dari hutan Jati rakyat, pengganti kayu Jati seperi mangium ataupun dari hutan Jati Perum Perhutani rotasi pendek (20-40 tahun). Secara tradisional kayu Jati rotasi lama (>80 tahun) nantinya hanya berada pada lokasi-lokasi tertentu di setiap Kesatuan

Pemangkuan Hutan yang ada di Jawa Tengah dan Jawa Timur. Kayu Jati rotasi lama yang diproduksi umumnya untuk tujuan ekspor, khususnya kayu Jati dengan kelas GF (*Garden Furniture*) yang dapat mencapai harga Rp. 20 juta per m^3. Di negara-negara tujuan ekspornya, terutama di Eropa, kayu Jati yang berasal dari hutan yang dikelola secara lestari (*sustainable forest management*, SFM) merup produk yang sangat diinginkan oleh konsumen walaupun dijual dengan harga mahal. Di masa datang bukan tidak mungkin bahwa hanya kayu Jati dan produk olahannya dengan sertifikat SFM dan CoC atau sertifikat ekolabel saja yang bisa masuk ke pasar Eropa atau Negara maju lainnya. Oleh karena itu mau tidak mau Perum Perhutani harus juga mempersiapkan hutan Jatinya yang tersebar di Jawa untuk dapat disertifikasi agar nilai tambah dari kayu berkualitas tersebut dapat lebih tinggi lagi (*premium price*). Sertifikasi yang dilakukan mencakup sertifikasi unit manajemen hutan (sertifikasi SFM), dalam hal ini Kesatuan Pemangkuan Hutan (KPH) dan sertifikasi lacak balak atau aliran kayu dari hutan hingga kayu tersebut diolah (sertifikasi CoC).

3.2. Keragaman DNA sebagai kunci diagnostik

Dasar untuk mengenali asal usul kayu atau produk kayu Jati dengan metode penanda genetika adalah adanya perbedaan Keragaman genetik secara geografis atau diferensiasi genetik populasi Jati di Jawa. Hal ini mungkin mengingat Jati sudah dibudiday di Jawa lebih dari satu abad lamanya. Sehingga penelitian diarahkan untuk mengetahui Keragaman genetik Jati secara geografis dalam rangka menyusun basis data Keragaman genetik Jati yang tumbuh di seluruh Pulau Jawa, khususnya Jawa Barat-Banten, Jawa Tengah dan Jawa Timur. Jika terdapat perbedaan Keragaman genetik antar lokasi Jati yang konsisten, maka metode penanda genetik tersebut cocok dipakai untuk alat diagnostik.

Survey genetik Jati dapat dilakukan dengan mengambil contoh tanaman Jati yang tumbuh di berbagai lokasi dan berumur cukup tua. Umumnya bagian tanaman yang diambil untuk keperluan survey genetik adalah daun, benih atau kambium Jati. Metode ekstraksi DNA serta analisis genetiknya khususnya dari daun dan benih sudah pernah dilakukan untuk Jati (Finkeldey, 2001, Nanan dkk., 2001; Pancoro, 2004).

Secara biologis selain daun, benih dan kambium Jati, bagian lainnya seperti kayu juga menyimpan materi genetik berupa DNA, baik yang ditemukan di inti sel, mitokondria ataupun kloroplas. Secara khusus pada sebagian besar jenis tanaman kehutanan dari kelompok daun lebar termasuk Jati, DNA kloroplas (cpDNA)nya diwariskan hanya oleh pihak ibu (*maternally inherited*). Sebagai konsekuensinya, jika kita menganalisis cpDNA suatu individu pohon, maka secara tidak langsung kita juga menganalisis sebagian dari cpDNA pohon induknya. Dengan kata lain, genom cpDNA tersebut bersifat lebih "immobil" dibanding genom DNA lainnya. Karena sebagian besar benih tanaman berukuran besar dan secara alami jatuh disekitar pohon induknya, maka cpDNA untuk suatu daerah cenderung seragam dan tidak banyak Keragamannya. Tambahan lainnya adalah sifat konservatif dari cpDNA, dimana sangat sedikit sekali bermutasi untuk memunculkan keragaman cpDNA, dalam hal ini terbentuknya haplotipe cpDNA yang baru.

3.3. Alat Genetika untuk Pengungkapan Kejahatan Kehutanan

Kejahatan kehutanan (*forestry crimes*) merup salah satu isu panas (*burning issue*) yang terjadi di banyak negara berkembang terlebih-lebih di Indonesia. Contoh salah satu kejahatan kehutanan yang sangat penting adalah pencurian kayu melalui penebangan ilegal yang dilakukan pelaku kriminal untuk mendapatkan keuntungan yang besar dalam waktu singkat. Kerugian akibat penebangan ilegal pernah ditaksir mencapai Rp. 80 Milyar per hari. Produk kayu ilegal yang diperjualbelikan tersebut secara otomatis masuk dalam kategori perdagangan liar (*illegal trading*) dan jika diekspor ke luar negeri walaupun secara resmi masih dapat dikategorikan sebagai penyelundupan kayu (*timber smuggling*).

Dalam kurun waktu sepuluh tahun terakhir ini banyak sekali pemberitaan di lapangan yang mengindikasikan kejadian penebangan liar, dimana kayu yang sebenarnya berasal dari daerah "X" diakui oleh pemiliknya berasal dari daerah "Y", karena si pemilik mempunyai Surat Keterangan Sahnya Hasil Hutan (SKSHH) yang dikeluarkan oleh instansi berwenang di daerah "Y" tersebut. Mekanisme dan prosedur dokumentasi asal-asul kayu sebenarnya telah berkembang dengan baik, tetapi dalam pelaksanaannya tidak berjalan dengan sempurna. Disana-sini masih terjadi penyimpangan seperti penjualan dokumen SKSHH ataupun permintaan khusus SKSHH secara kolusi. Sehingga banyak sekali kayu-kayu ilegal dengan dokumen asli menjadi legal dan pelakunya bebas tidak terjerat hukum untuk melanjutkan praktek-praktek ilegalnya. Untuk efektifitas usaha pemberantasan penebangan ilegal, pihak penegak hukum seharusnya dapat menggun berbagai metode pembuktian lain yang lebih akurat dan spesifik selain melakukan telaah dokumen. Salah satu yang mungkin digun adalah metode penanda genetika molekuler. Di bidang kedokteran, metode ini telah digun secara luas untuk mengungkap berbagai kasus kejahatan.

3.4. Keragaman genetik

Informasi genetik suatu organisme tidak berubah sepanjang hidupnya. Umur suatu organisme terbatas, tetapi setiap organisme berpotensi untuk mentransmisi informasi genetik ke keturunannya. Bagaimanapun, rekombinasi gen-gen jantan dan betina menghasilkan genotip baru. Konsekuensinya, dinamika struktur genetik tidak dapat diamati pada tingkat organisme tunggal tetapi membutuhkan perbandingan struktur genetik populasi. Penelitian sistem genetik suatu spesies seringkali berdasarkan pengamatan struktur genetik dalam suatu populasi tunggal atau beberapa populasi (Finkeldey 2003). Karakteristik genetik populasi dapat berubah, dipengaruhi oleh proses perpindahan gen dari generasi ke generasi. Menurut Finkeldey (2003), proses-proses yang mengubah struktur genetik populasi atau penyebab evolusi disebut faktor evolusioner, yang meliputi mutasi, aliran gen, hanyutan genetik, seleksi dan sistem perkawinan.

Dalam populasi kawin acak yang besar tanpa ada seleksi, mutasi dan migrasi, maka frekuensi gen dan genotipe konstan dari generasi ke generasi. Populasi tersebut dikat berada dalam kondisi keseimbangan Hardy-Weinberg (Falconer 1989). Syarat-syarat lain agar kondisi keseimbangan Hardy-Weinberg tercapai adalah ukuran populasi harus besar, meiosis normal dan tidak ada penghanyutan genetik yang dapat terjadi pada populasi ukuran kecil (Hartana 1992; Crowder 1997). Di alam, perbedaan-perbedaan individu dalam suatu populasi selalu dijumpai. Keragaman tersebut ada yang bisa diwariskan yang disebut keragaman genetik, tetapi ada juga yang disebabkan oleh faktor lingkungan, sehingga tidak dapat diwariskan. Keragaman genetik merup hal yang sangat penting bagi kelangsungan hidup populasi dan keberadaannya merup suatu karakteristik umum dari sebagian besar spesies (Hattemer 1991). Menurut Siregar (2000), 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.

3.5. Keragaman morfologi dan genetik Jati di Indonesia

Jati menunjukkan karakter yang berKeragaman baik dalam populasi maupun antar populasi. Berdasarkan penamp luarnya, terdapat beberapa perbedaan morfologi bentuk pohon, batang dan sifat kayu. Perbedaan tersebut masih dipelajari apakah karena perbedaan varietas, ras lahan, serangan penyakit atau adanya pola adaptasi yang berbeda antar individu dalam populasi. Karakter Jati yang berKeragaman menurut sifat kayu dan bentuk pohonnya yaitu dikenal adanya Jati lengo, Jati sungu hitam, Jati werut, Jati doreng, Jati kembang, Jati kapur, dan sebagainya. Menurut batangnya, Jati dibed menjadi Jati ri (knobel), Jati pring, Jati gembol, dan Jati kijong. Berdasarkan penamp bentuk batangnya Jati dibed menjadi Jati belimbing, Jati knobel, Jati boleng dan Jati mulus. Oleh karena itu, karakteristik pada Jati dapat digun untuk membangun dasar genetik yang luas bagi kepentingan program pemuliaan (Mahfudz *et al.* 2004).

Pendugaan Keragaman genetik Jati telah dilakukan oleh beberapa peneliti dengan menggun berbagai metode dari yang paling sederhana seperti isoenzim hingga penanda RAPD, Mikrosatelit, dan SCAR. Beberapa aplikasi penanda isozim pada Jati antara lain telah dilakukan oleh Kertadikara (1996) yang menginventarisasi keragaman genetik pada 18 enzim gen lokus tanpa analisis formal genetik dari fenotip isozim yang diteliti dari 9 provenans yang berbeda pada habitat alami dan buatannya, Widyatmoko (1996) mengidentifikasi klon Jati di Cepu pada 116 pohon plus dari bank klon dan KBK berdasarkan 13 lokus dari 9 sistem enzim dan Dewi (2003) mengidentifikasi keturunan pada 10 klon Jati di Padangan.

Sedangkan penggunaan penanda RAPD dan mikrosatelit dilakukan untuk melihat Keragaman genetik pohon plus Jati yang dimiliki Perum Perhutani (Widiyanto dkk., 2000). Informasi Keragaman genetik dalam bentuk dendogram pohon plus Jati selanjutnya digun sebagai dasar untuk hibridisasi Jati. Penggunaan penanda SCAR juga pernah dilakukan untuk identifikasi klon Jati Perum Perhutani (Siswamartana & Wibowo, 2003).

IV. METODE PENELITIAN

Penelitian Tahun I difokuskan pada pengambilan contoh uji berupa bahan tanaman daun dan potongan kecil kayu dari 9 lokasi di Jawa. Pada tahun ini juga dilakukan ekstraksi DNA serta analisis Keragaman cpDNA dengan teknik *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms* (PCR-RFLPs) atau DNA total dengan teknik *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) dalam rangka menyusun basis data Keragaman DNA beberapa populasi hutan tanaman Jati di Jawa. Selain itu, analisis awal kimia kayu dari sembilan lokasi dengan menggunakan contoh komposit juga dilakukan untuk mendukung hasil-hasil analisis DNA.

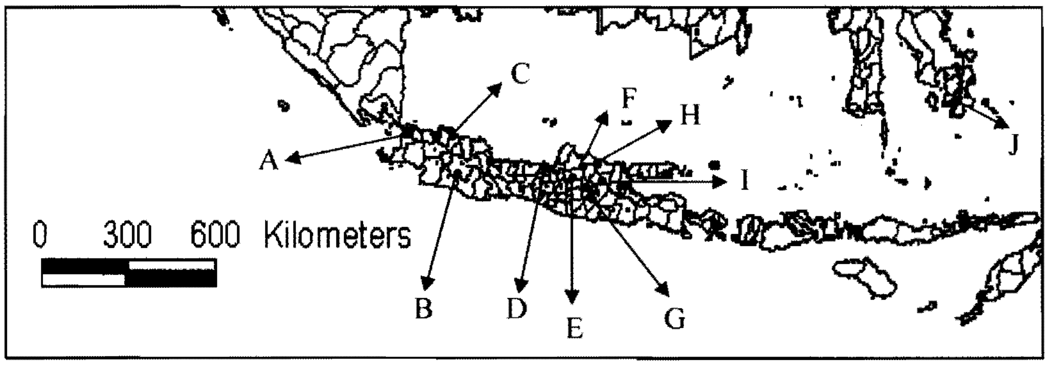
4.1. Pengambilan contoh bahan tanaman dan kayu

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun Jati yang berasal dari hutan tanaman atau areal produksi benih (APB) milik Kesatuan Pemangkuan Hutan (KPH) Perum Perhutani yang masih produktif di Jawa, yaitu Jawa Barat-Banten, Jawa Tengah dan Jawa Timur. Selain daun jati, diambil pula contoh uji berupa piringan kayu pada lokasi tebangan di setiap KPH. KPH Perum Perhutani yang dipilih sebagai populasi adalah i) Perum Perhutani Unit I Jawa Tengah: KPH Cepu, KPH Kendal, KPH Kebonharjo dan KPH Randublatung, ii) Perum Perhutani Unit II Jawa Timur: KPH Bojonegoro dan KPH Ngawi dan iii) Perum Perhutani Unit III Jawa Barat-Banten: KPH Banten, KPH Indramayu dan KPH Ciamis (Tabel 1). Selain di Jawa, koleksi DNA Jati yang berasal dari Muna (Sulawesi Tenggara) juga digunakan sebagai pelengkap analisis. Gambar 2 menyajikan perkiraan lokasi pengambilan contoh uji di Jawa dan Muna.

Tabel 1. Rincian pengambilan contoh uji baik daun mupun kayu pada hutan tanaman Jati di Jawa dari berbagai kelas umur.

No.	Lokasi	Kelas Umur (KU)	Jumlah contoh		Letak geografis	Ketinggian (dpl)
			daun	Kayu		
1	KPH Banten	KU IV (30-40 th)	5	5	06'36'37.4"S - 105'45'44.9"E	69 m
2	KPH Indramayu	KU IV (30-40 th)	5	5	06'36'49.0"S - 107'58'54.5"E	95 m
3	KPH Ciamis	KU IV (30-40 th)	5	5	07'20'20.3"S - 108'31'45.2"E	100 m
4	KPH Cepu	KU IV (30-40 th)	5	5	07'02'53.1"S - 111'32'00.8"E	169 m
5	KPH Randublatung	KU IV (30-40 th)	5	5	07'06'04.7"S - 111'26'06.7"E	128 m
6	KPH Kendal	KU V (50-60 th)	5	5	07'01'19.6"S - 110'15'51.9"E	116 m
7	KPH Bojonegoro	KU IV (30-40 th)	5	5	07'19'22.1"S - 111'47'26.1"E	173 m
8	KPH Ngawi	KU VI (60-70 th)	5	5	07'20'38.3"S - 111'18'22.9"E	176 m
9	KPH Kebonharjo	KU VII (70-80 th)	5	5	06'49'41.8"S - 111'36'02.9"E	196 m

Catatan:
KPH= Kesatuan Pemangkuan Hutan
dpl= dari permukaan laut



Gambar 2. Lokasi pengambilan contoh uji Jati di Jawa

(Keterangan: A=Banten, B=Ciamis, C=Indramayu, D=Kendal, E=Randublatung, F=Cepu, G=Ngawi, H=Kebonharjo, I=Bojonegoro, J=Muna)

Sebanyak 5 individu pohon dipilih secara acak dari Areal Produksi Benih (APB) untuk diambil daun mudanya sebagai contoh uji guna keperluan analisis DNA. Jumlah tersebut didasarkan atas sifat cpDNA yang konservatif, sehingga dianggap sudah cukup mewakili populasi cpDNA pada suatu lokasi (Gillet, 1999). Daun tersebut selanjutnya dikeringkan dengan silica gel dalam plastik klip dengan perbandingan 1 bagian daun dan 5 bagian silica gel. Teknik perawatan contoh uji dari lapangan ini telah dilakukan secara rutin dengan cukup berhasil sejak tahun 2002 di Laboratorium Silvikultur Fakultas Kehutanan IPB khususnya untuk jenis-jenis meranti (*Shorea* spp.). Total contoh daun adalah 9 lokasi x 5 individu/lokasi = 45 contoh.

Selain data Keragaman genetik, dilakukan juga analisis awal untuk sifat kimia kayu dengan jumlah contoh uji sesuai keperluan. Untuk tujuan ini contoh kecil kayu berupa piringan diambil secara acak dari 5 pohon yang baru ditebang di masing-masing KPH. Total contoh kecil kayu adalah 9 lokasi x 5 contoh kecil = 45 contoh.

4.2. Analisis Keragaman DNA

Pendugaan Keragaman DNA dilakukan dengan menggunakan teknik PCR-RFLP dan RAPD dengan bahan dan alat seperti tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Alat dan bahan teknik RAPD dan PCR-RFLP

<table>
<tr><th rowspan="2">Analisis</th><th colspan="3">Tahapan Pekerjaan</th></tr>
<tr><th>Ekstraksi</th><th>PCR</th><th>Restriksi</th></tr>
<tr><td>RAPD</td><td rowspan="2">**Alat** : sarung tangan, tube 1.5 ml, mortar pestel, mikro pipet, tips, rak tube, *vortex*, sentrifugasi, *waterbath*, *freezer*, desikator.

Bahan : Nitrogen cair, buffer ekstrak, PVP 2%, Chloroform IAA, phenol, isopropanol dingin, NaCl, Etanol 95%, buffer TE.

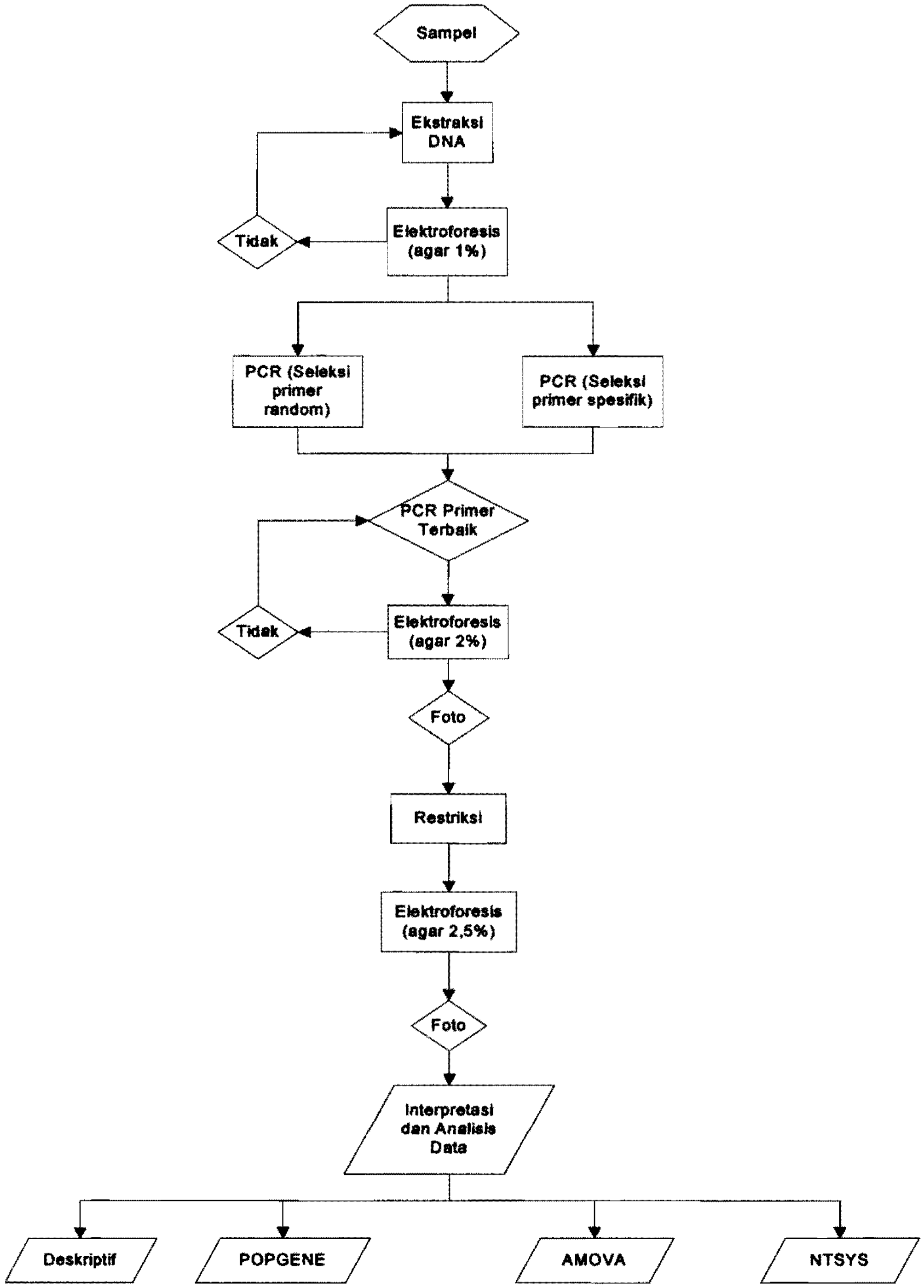
Visualisasi DNA : *microwave*, mikropipet, tips, sentrifugasi, bak elektroforesis, cetakan agar, tempat pencampur DNA, *UV transilluminator*, alat foto DNA, *agarose*, buffer TAE, *blue juice*, DNA, EtBr</td><td>**Alat** : tube 0.2 ml, mikro pipet, tips, sentrifugasi, mesin PCR

Bahan: DNA, *aquabidest*, H_2O, primer random (OPO-4, OPY-18, OPY-20), *Taq polymerase*</td><td>Tidak ada</td></tr>
<tr><td>PCR-RFLP</td><td>**Alat** : tube 0.2 ml, mikro pipet, tips, sentrifugasi, mesin PCR

Bahan: DNA, *aquabidest*, H_2O, primer spesifik *trnLF*, *Taq polymerase*</td><td>**Alat** : tips, mikropipet, tube 0.2ml, sentrifugasi, *waterbath*

Bahan : DNA, buffer enzim, H_2O, enzim restriksi *AluI*</td></tr>
</table>

Secara umum, prosedur penelitian untuk teknik RAPD dan PCR-RFLP dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Bagan prosedur teknik RAPD dan PCR-RFLP

4.2.1. Ekstraksi dan Isolasi DNA

Ekstraksi dan isolasi DNA dari daun kering Jati dilakukan dengan metode CTAB yang dimodifikasi untuk mendapatkan DNA yang cukup murni. Prosedur ini sudah rutin dilakukan pada Jati dengan hasil yang baik dan konsisten. Secara rinci prosedur ekstraksi DNA dilakukan sebagai berikut:

Sampel daun (2 cm x 2 cm) disiapkan, kemudian digerus dengan menggunakan nitrogen cair di dalam pestel yang bersih. Hasil gerusan selanjutnya dipindahkan ke dalam tube 1.5 ml, kemudian ditambahkan 500-700 mikro liter larutan buffer ekstrak dan 100 mikro liter PVP 2%, kemudian divortex. Selanjutnya dilakukan inkubasi di dalam *waterbath* selama 45 menit - 1 jam, dimana pada setiap 15 menit sekali dibolak-balikan pada suhu 65°C. Sampel kemudian diangkat dan dinginkan selama kira-kira 15 menit, lalu ditambahkan Cloroform IAA 500 mikro liter dan phenol 10 mikro liter, kemudian dikocok.

Sentrifugasi kemudian dilakukan pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya, supernatan diambil dan pindahkan ke tube baru, lalu ditambahkan Cloroform IAA lagi 500 mikro liter dan phenol 10 mikro liter, dan dikocok. Sentrifugasi dilakukan kembali pada 13.000 rpm selama 2 menit. Kemudian supernatan diambil dan pindahkan ke tube baru, lalu tambahkan isopropanol dingin 500 mikro liter dan NaCl 300 mikro liter dan dikocok. Selanjutnya disimpan dalam *freezer* selama 45 menit-1 jam. Sentrifugasi dilakukan kembali pada 13.000 rpm selama 2 menit, selanjutnya cairan dibuang dand disusahakan pellet DNA jangan sampai ikut terbuang. Tambahkan etanol 100% sebanyak 300 mikro liter. Sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit, buang cairan, pellet DNA jangan terbuang. Tambahkan etanol 100% sebanyak 300 mikro liter. Sentrifugasi lanjutan dilakukan lagi pada 13.000 rpm selama 2 menit, dan cairan dibuang serta diusahakan agar pellet DNA tidak ikut pula terbuang. Pellet DNA yang dihasilkan disimpan dalam desikator selama 15 menit dan ditambahkan TE 20 mikro liter kemudian dicampur dan disentrifugasi kembali.

4.2.2. Pengujian kualitas DNA

Selama pellet DNA dikeringkan di dalam desikator, disiapkan agar 1%, dimana untuk 15 ml buffer TAE dicampurkan dengan 0.15 g agarose (untuk

8-12 lubang/sumur), dan untuk 33 ml buffer TAE dicampurkan dengan 0.33 g agarose (untuk 17-25 lubang/sumur). Campuran agar 1% tersebut dikocok dan dipanaskan di dalam *microwave* sampai tercampur semua dan disesuaikan suhunya di atas *stirer*. Selanjutnya disiapkan bak elektroforesis dan agar dituangkan ke dalam cetakan jika sudah tidak terlalu panas. Ditunggu sampai padat dan disimpan di dalam bak elektroforesis yang berisi buffer TAE.

Tiga mikro liter Blue Juice 10x dan 4 mikro liter DNA dicampurkan dan dimasukkan ke dalam lubang-lubang di dalam agarose dengan menggunakan pipet mikro. Bak elektroforesis ditutup dan dialiri listrik dengan tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Pewarnaan dilakukan dengan Ethium bromida 1% dan dicampurkan dengan aquades, selanjutnya pita DNA hasil ekstraksi dilihat pada *UV transilluminator.*

4.2.3. Proses amplifikasi DNA dengan teknik PCR

Proses PCR ini menggunakan 4 komponen utama yang dicampurkan ke dalam tube 0.2 ml. Komponen yang diperlukan untuk teknik RAPD yaitu seperti tercantum pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi bahan untuk reaksi PCR pada teknik RAPD

No.	Nama Bahan	1 sampel reaksi	X sample reaksi
1	H_2O	2 mikro liter	X x 2 mikro liter
2	*HotStar Mix*	7.5 mikro liter	X x 7.5 mikro liter
3	Primer	2 mikro liter	X x 2 mikro liter
4	Cetakan DNA	2 mikro liter	X x 2 mikro liter

Sedangkan pada teknik PCR-RFLP digunakan komponen yang sama, namun perbedaan terletak pada penggunaan primer-nya (Tabel 4).

Tabel 4. Komposisi bahan untuk reaksi PCR pada teknik PCR-RFLP

No.	Nama Bahan	1 sampel reaksi	X sample reaksi
1	H_2O	1.9 mikro liter	X x 1.9 mikro liter
2	*HotStar Mix*	7.5 mikro liter	X x 7.5 mikro liter
3	Primer *reversed*	1.8 mikro liter	X x 1.8 mikro liter
4	Primer *forward*	1.8 mikro liter	X x 1.8 mikro liter
5	Cetakan DNA	2 mikro liter	X x 2 mikro liter

Seleksi primer dilakukan untuk mencari primer acak yang menghasilkan penanda polimorfik, karena tidak semua primer nukleotida dapat menghasilkan produk amplifikasi (primer positif) dan dari primer positif tidak semuanya menghasilkan fragmen DNA polimorfik. Pada kegiatan ini dilakukan survei terhadap 35 primer, yaitu primer dari golongan OPO dan OPY yang diproduksi oleh *Operon Technology* (Tabel 5).

Tabel 5. Urutan basa nukleotida 35 primer (*Operon Technology*).

No.	Primer	Urutan Basa	No.	Primer	Urutan Basa
1.	OPO-01	5' GGCACGTAAG '3	1.	OPY-01	5' GGTGGCATCT '3
2.	OPO-02	5' ACGTAGCGTG '3	2.	OPY-02	5' CATCGCCGCA '3
3.	OPO-04	5' AAGTCCGCTC '3	3.	OPY-03	5' ACAGCCTGCT '3
4.	OPO-05	5' CCCAGTCACT '3	4.	OPY-04	5' GGCTGCAATG '3
5.	OPO-06	5' CCACGGGAAG '3	5.	OPY-05	5' AGCCGTGGAA '3
6.	OPO-07	5' CAGCACTGAC '3	6.	OPY-06	5' AAGGCTCACC '3
7.	OPO-08	5' CCTCCAGTGT '3	7.	OPY-08	5' AGGCAGAGCA '3
8.	OPO-09	5' TCCCACGCAA '3	8.	OPY-09	5' GTGACCGAGT '3
9.	OPO-10	5' TCAGAGCGCC '3	9.	OPY-11	5' AGACGATGGG '3
10.	OPO-11	5' GACAGGAGGT '3	10.	OPY-12	5' AAGCCTGCGA '3
11.	OPO-12	5' CAGTGCTGTG '3	11.	OPY-13	5' CACAGCGACA '3
12.	OPO-13	5' GTCAGAGTCC '3	12.	OPY-14	5' GGTCGATCTG '3
13.	OPO-14	5' AGCATGGCTC '3	13.	OPY-15	5' AGTCGCCCTT '3
14.	OPO-15	5' TGGCGTCCTT '3	14.	OPY-16	5' GGGCCAATGT '3
15.	OPO-16	5' TCGGCGGTTC '3	15.	OPY-17	5' GACGTGGTGA '3
16.	OPO-18	5' CTCGCTATCC '3	16.	OPY-18	5' GTGGAGTCAG '3
17.	OPO-19	5' GGTGCACGTT '3	17.	OPY-20	5' AGCCGTGGAA '3
18.	OPO-20	5' ACACACGCTG '3			

Sedangkan pada teknik PCR-RFLP dilakukan seleksi primer terhadap 2 primer spesifik yaitu *trnLF* dan *rbcL*34 (Tabel 6). Setelah dilakukan seleksi primer, tahapan selanjutnya adalah seleksi enzim restriksi yaitu terhadap *Alu* I, *Hinf* I, *Msp* I, dan *Hind* III (Tabel 7).

Tabel 6. Urutan basa primer *trnLF* dan *rbcL34* (Indrioko 2005)

Primer	Urutan basa
trnLF	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'
rbcL34	5'-TGTCACCAAAAACAGAGACT-3' 5'-TTCCATACTTCACAAGCAGC-3'

Tabel 7. Situs pemotongan enzim restriksi (Resmisari 2006)

Nama	Sumber	Situs pemotongan
Alu I	*Anthrobacter loteus*	AG↓CT TC↑GA
Hinf I	*Haemophilus influenzae*	G↓ANTC CTNA↑G
Msp I	*Moraxella* sp.	C↓CGG GGC↑C
Hind III	*Haemophilus influenzae*	A↓AGCT TCGA↑G

DNA hasil proses ekstraksi sebelum dilakukan proses amplifikasi PCR harus dilakukan pengenceran dengan menggunakan *aquabidest*. Besarnya perbandingan antara DNA dengan *aquabidest* tergantung dari tebal dan tipisnya DNA genomik hasil ekstraksi.

Baik pada teknik RAPD maupun PCR-RFLP, proses PCR melalui 3 tahapan penting yaitu *denaturation, annealing,* dan *extension.* Namun dibutuhkan suhu yang berbeda-beda tergantung pada teknik yang digunakan dan juga primer yang digunakan (Tabel 8 dan 9).

Tabel 8. Tahapan-tahapan dalam proses PCR untuk teknik RAPD

Tahapan	Suhu	Waktu	Jumlah Siklus
Pre-denaturation	95°C	15 menit	1
Denaturation *Annealing* *Extension*	95°C 37°C 72°C	1 menit 2 menit 2 menit	35
Final Extension	72°C	10 menit	1

Tabel 9. Tahapan-tahapan dalam proses PCR untuk teknik PCR-RFLP

Tahapan	Suhu	Waktu	Jumlah Siklus
Pre-denaturation	95°C	15 menit	1
Denaturation	94°C	1 menit	
Annealing	56°C (*trnLF* dan *rbcL*34) 50°C (primer lain)	1 menit	35
Extension	72°C	2 menit	
Final Extension	72°C	10 menit	1

Proses PCR dilakukan dengan menggunakan primer hasil dari seleksi. Hasil proses PCR kemudian dianalisis dengan melakukan elektroforesis menggunakan 2,0 % gel *agarose* dalam larutan buffer 1 x TE dan *distaining* didalam larutan Ethidium Bromide.

4.2.3. Restriksi DNA

Proses restriksi ini khusus dilakukan pada teknik PCR-RFLP. Komponen yang dibutuhkan yaitu H_2O, enzim restriksi, buffer enzim, dan produk PCR (Tabel 10).

Tabel 10. Komposisi bahan-bahan untuk proses restriksi

Komponen	1 sampel (µL)	X x 1 sampel (µL)
H_2O	5	X x 5
Buffer RE	1.2	X x 1.2
DNA	5	X x 5
Enzim restriksi	0.5	0.5

Komposisi bahan-bahan tersebut dicampurkan ke dalam tube 0.2 ml, lalu diinkubasi ke dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama sedikitnya 3 jam dan paling lama semalam. Hasil inkubasi tersebut kemudian diuji kuantitas DNA-nya melalui elektroforesis dengan menggunakan 2.5% gel agarose dan direndam pada larutan EtBr (*staining*), kemudian difoto.

4.3. Analisis Sifat Kimia Kayu

Analisis kimia kayu Jati yang dilakukan merupakan analisis awal untuk mendukung data yang diperoleh dari analisis genetik dan untuk memberikan gambaran analisis pada penelitian Tahun kedua (Tahun II). Sifat kimia kayu Jati yang dianalisis di antara populasi dengan menggunakan contoh komposit adalah kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin.

Bahan kimia yang digunakan untuk analisis komponen kimia kayu yaitu C_2H_5PH (ethanol), C_6H_6 (benzene), NaOH, $NaClO_2$, CH_3COOH, Na_2SO_3, H_2SO_4, HCl, $AgNO_3$, dan aqua destilata. Sedangkan alat yang dibunakan dalam penelitian ini adalah *hammer mill*, saringan elektrik, *shoklet ekstraktor*, desikator, *water bath*, *erlenmeyer glass*, *beaker glass*,cawan porselen, kertas saring, kertas *whatman*, kertas lakmus, *alumunium foil*, pipet, oven, timbangan, golok, dan *cutter*.

4.3.1.Persiapan Bahan

Persiapan sampel dilakukan berdasarkan standar Tappi T 257 cm-85. Sampel diambil dari bagian pangkal berupa lempengan kayu setebal kurang lebih 10 cm. Selanjutnya sampel dibuat serpih ukuran kecil (seperti batang korek api), dikering udarakan dan digiling menjadi serbuk dengan menggunakan *hammer mill* kemudian diayak untuk mendapatkan ukuran 40-60 mesh.

4.3.2. Kadar Air Serbuk

Pengukuran kadar air dilakukan dengan menggunakan standar Tappi T264 om-88. Penentuan kadar air serbuk diawali dengan pemansan cawan porselen dalam oven bersuhu 105+3oC hingga beratnya konstan. Serbuk kayu sebanyak 1-2 gram dimasukkan ke dalam cawan kemudian ditim (Bo). Berat kering tanur (BKT) serbuk diperoleh melalui penimbangan serbuk kayu yang telah dipanaskan dalm oven bersuhu 105+3oC hingga beratnya konstan.

Kadar air dihitung berdasarkan rumus:

$$Kadar\ Air = \frac{Bo - BKT}{BKT} x100\%$$

4.3.3. Kadar Holoselulosa

Metode ini dimaksudkan untuk mengetahi sejumlah zat yang tertinggal setelah kayu bebas ekstraktif didelignifikasi. Prosedur dilakukan berdasarkan standar Tappi T 9 wd-75, yaitu sbb.:

1. Serbuk ± 2 gram (a gram) yang telah bebas ekstraktif dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* 300 ml.
2. Kemudian ditambahkan 150 ml air destilata, 1 gram $NaClO_2$, dan 0,3 ml asam asetat glasial.
3. Sampel dipanaskan pada suhu 80°C selama 5 jam dan setiap jam ditambahkan 1 gram $NaClO_2$ dan 0,3 ml asam asetat glasial.
4. Kemudian disaring dan dicuci dengan air panas sampai filtrat tidak berwarna.
5. Pengeringan dilakukan pada oven bersuhu 103 ± 2°C lalu ditimbang sampai beratnya konstan (b gram).

Kadar holoselulosa dihitung berdasarkan rumus:

$$Holoselulosa(\%) = \frac{b}{a} x 100\%$$

4.3.4. Kadar Selulosa

Metode ini dimaksudkan untuk mengetahui sejumlah zat yang tertinggal setelah hemiselulosa diekstrak dari holoselulosa yang diperoleh sebelumnya. Prosedur ini dilakukan berdasarkan standar Tappi T 17 m-55.

1. Serbuk ± 2,5 gram (a gram) yang sudah bebas ekstraktif dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* 500 ml.
2. Kemudian ditambahkan 400 ml air panas lalu dipanaskan di atas waterbath bersuhu 80°C selama 2 jam, disaring lalu dikering udarakan.
3. *Erlenmeyer* 300 ml disiapkan, lalu serbuk yang sudah kering udara tadi dimasukkan kemudian ditambahkan 125 ml HNO_3 3,5%, setelah itu dipanaskan di atas water bath bersuhu 80°C selama 12 jam.
4. Serbuk kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring sampai bebas asam dan dikering udarakan.
5. Sampel yang sudah kering udara kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer lalu ditambahkan 125 ml $NaOH + Na_2SO_3$ (20 gram + 20 gram dalam 1 liter larutan). Setelah itu dipanaskan di atas waterbath bersuhu 50°C selama 2 jam.
6. Setelah itu serbuk disaring dengan menggunakan kertas saring sampai bebas basa dan dikelantang dengan $NaClO_2$ 10% lalu dicuci hingga filtrat tidak berwarna.

7. Kemudia ditambahkan 100 ml CH_3COOH 10% dan dicuci hingga sampel bebas asam
8. Pengeringan dilakukan pada oven bersuhu 103 ± 2°C lalu ditimbang sampai beratnya konstan (b gram)

Kadar selulosa dihitung berdasarkan rumus:

$$Selulosa(\%) = \frac{b}{a} x100\%$$

4.3.5. Kadar Hemiselulosa

Kadar hemiselulosa diperoleh dengan mengurangi kadar holoselulosa dengan kadar selulosanya, yaitu:

Kadar Hemiselulosa (%) = Holoselulosa (%) - Selulosa (%)

4.3.5 Kadar Lignin

Metode ini dimaksudkan untuk mengetahui sejumlah lignin yang tertinggal atau tidak terlarut dalam larutan H2SO4 72%. Prosedur ini dilakukan berdasarkan standar Tappi T 13 wd-74.

1. Serbuk bebas ekstraktif sebanyak 1 gram (a gram) dimasukkan ke dalam beaker glass 100 ml. Kemudian ditambahkan 15 ml H2SO4 72% sambil diaduk pada suhu ruangan sekurang-kurangnya 1 menit dan ditutup dengan aluminium foil.
2. Lalu didiamkan selama 2 jam, suhu dijaga agar tetap dengan cara mendinginkan bagian luar gelas dengan es dan diaduk sesekali.
3. Sementara itu 300 ml air disiapkan di dalam erlenmeyer 1000 ml yang sebelumnya telah ditandai pada volume 575 ml.
4. Setelah itu sampel dipindahkan ke erlenmeyer 1000 ml tadi, cuci dan larutkan sampel dengan air dan dilarutkan dalanm air hingga konsentrasinya menjadi 3% (volume total 575 ml).
5. Kemudian dipanaskan selma 4 jam dengan suhu 100oC dan diusahakan agar volume tetap dnegan menambahkan air panas sewaktu-waktu.
6. Lalu didiamkan selama semalam agar bahan yang tidak larut mengendap.

7. Setelah itu, sampel disaring dan dicuci dengan air panas sampai bebas asam.
8. Pengeringan dilakukan pada oven bersuhu 103 $\pm$ 2°C lalu ditimbang sampai beratnya konstan (b gram)

Kadar lignin dihitung berdasarkan rumus:

$$Lignin(\%) = \frac{b}{a} x100\%$$

4.3.6. Kelarutan dalam Air Panas

Metode ini dimaksudkan untuk melarutkan zat-zat ekstraktif seperti tanin, gula, gum atau zat warna dalam kayu, serta pati. Prosedur dilakukan berdasarkan standar Tappi 207 om-88.

1. Serbuk kayu sebanyak 2 gram diekstrak dengan 100 ml air panas yang dimaksukkan dalam *erlenmeyer* 300 ml yang ditutup.
2. Kemudian dipanaskan di atas *water bath* $\pm$ 3 jam dengan suhu 100°C dan setiap 15 menit diaduk.
3. Setelah itu disaring dan dicuci dengan air panas sampai filtrat tidak berwarna.
4. Pengeringan dilakukan pada oven bersuhu 103$\pm$2°C lalu ditimbang sampai beratnya konstan.

Kadar zat ekstraktif dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$Kelaru\tan(\%) = \frac{BKTsemula - BKTsetelah\ ekstraksi}{BKTsemula} x100\%$$

Dimana: BKT = berat kering tanur (gram)

4.3.7. Kelarutan dalam Air Dingin

Metode ini dimaksudkan untuk melarutkan zat-zat ekstraktif seperti tanin, gula, gum atau zat warna dalam kayu. Prosedur dilakukan berdasarkan standar Tappi 207 om-88.

1. Serbuk kayu sebanyak 2 gram diekstrak dengan 300 ml air dingin dalam *erlenmeyer* 500 ml yang ditutup. Ini dilakukan selama 2 hari (48 jam).

2. Setelah itu serbuk disaring dan dicuci dengan air dingin sampai filtrat tidak berwarna.
3. Pengeringan dilakukan pada oven bersuhu 103±2°C lalu ditimbang sampai beratnya konstan.

Kadar zat ekstraktif dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$Kelarutan(\%) = \frac{BKTsemula - BKTsetelah\ ekstraksi}{BKTsemula} x100\%$$

Dimana: BKT = berat kering tanur (gram)

4.3.8. Kelarutan Kayu dalam Ethanol-Benzene

Metode ini digunakan untuk menentukan sejumlah zat yang terlarut, berupa material non volatil. Prosedur dilakukan berdasarkan standar Tappi 207 om-88.

1. Serbuk kayu sebanyak 10 gram diekstraksi dengan larutan ethanol-benzen (1:2) sebanyak 300 ml dalam alat shoklet ekstraktor selama 6 hingga 8 jam.
2. Setelah itu serbuk disaring dan dicuci dengan ethanol selama 4 jam lalu diangin-anginkan di udara.
3. Pengeringan dilakukan pada oven bersuhu 103±2°C lalu ditimbang sampai beratnya konstan.

Kadar zat ekstraktif dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$Kelarutan(\%) = \frac{BKTsemula - BKTsetelah\ ekstraksi}{BKTsemula} x100\%$$

Dimana: BKT = berat kering tanur (gram)

Secara rinci jumlah seluruh analisis genetik dan kimia yang dilakukan disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Rincian kegiatan laboratorium untuk analisis Keragaman DNA dan analisis kimia kayu

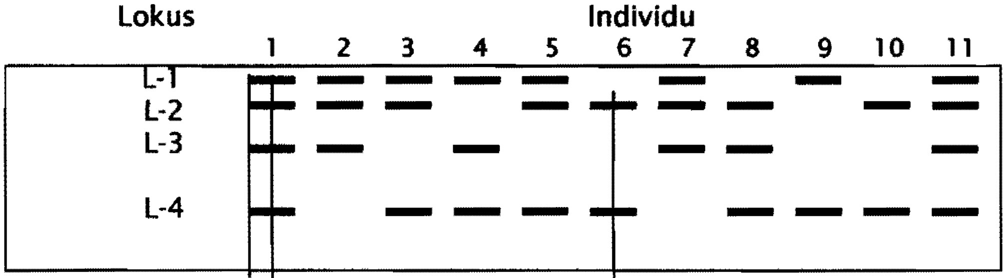
No.	Jenis analisis	Metode	Jumlah sampel	Total reaksi
1.	Ekstraksi DNA daun	CTAB modifikasi (1x)	45	45
2	cpDNA daun	PCR-RFLP; 2 primer x 4 enzim restriksi (8x)	45	360
3	DNA inti daun	RAPD; 3 primer (3x)	45	135
4	Analisis kimia kayu*)	TAPPI; 7 analisis (7x)	9	54

Catatan: *) Hanya satu contoh (komposit) untuk masing-masing lokasi

4.4. Analisis data

4.4.1. RAPD

Hasil PCR yang telah dielektroforesis difoto dan dianalisis dengan melakukan skoring pola pita yang muncul. Pola pita yang muncul (positif) diberi nilai 1 dan pola pita yang tidak muncul (negatif) diberi nilai 0. Hasil perhitungan kemudian dianalisis untuk mengetahui frekuensi dan keragaman dalam jenis dan antar populasi dengan menggunakan *software* POPGENE Versi 1.31. Pendugaan hubungan kekerabatan dilakukan berdasarkan jumlah pita polimorfik yang dimiliki bersama (Nei and Lei 1979 *dalam* Yunanto 2006), sedangkan pengelompokan kerabat berdasarkan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group with Arithmatic Average*) (Nei 1973 *dalam Yunanto* 2006) dengan *software* NTSYS Ver 2.0 (Rohlf 1998). Proses skoring dapat dilihat pada Gambar 4.

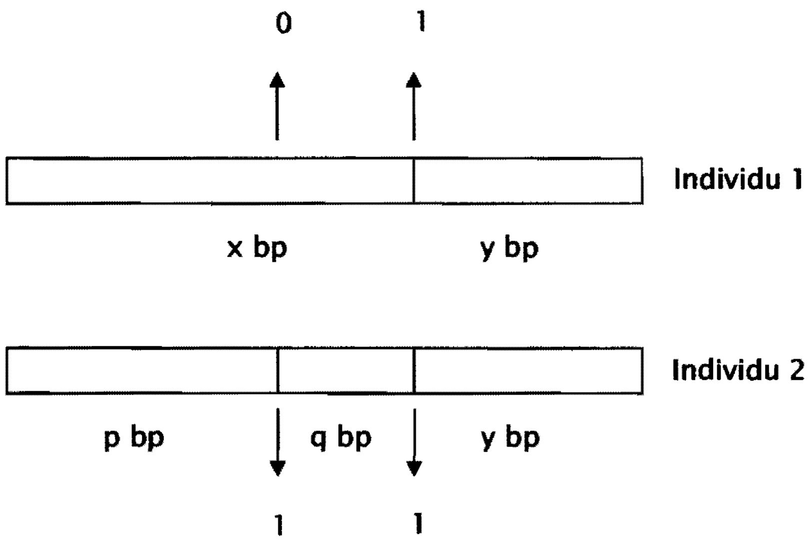


Lokus	Individu										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
L-1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
L-2	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
L-3	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
L-4	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1

Gambar 4. Cara penilaian pita dengan sistem skoring (1 = ada pita, 0 = tidak ada pita) (Yunanto 2006)

4.4.2. PCR-RFLP

Analisis data yang digunakan yaitu hasil interpretasi situs restriksi (Gambar 5). Situs restriksi yang muncul (positif) diberi nilai 1 (satu) dan yang tidak muncul (negatif) diberi nilai 0 (nol).



Gambar 5. Cara penilaian situs restriksi dengan sistem skoring

Hasil perhitungan kemudian dianalisis untuk mengetahui frekuensi dan keragaman *haplotype* dalam populasi, antar populasi, dan antar grup (AMOVA - *Analysis of Molecular Variance*) dengan menggunakan *software*

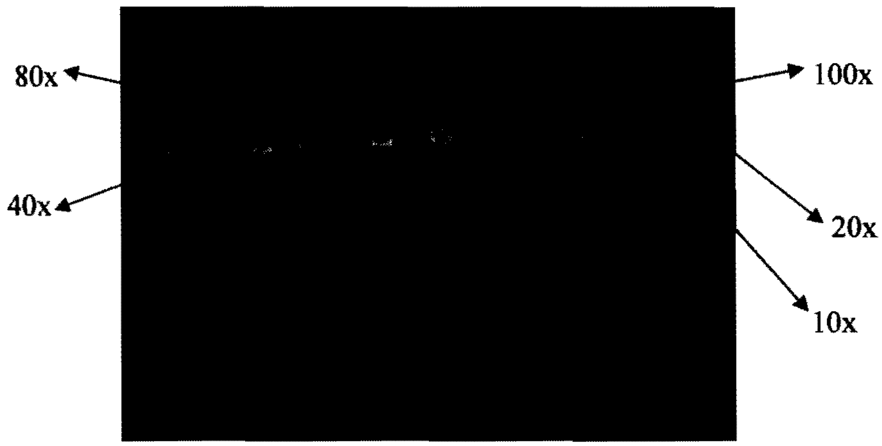
ARLEQUIN Ver 3.01. Situs restriksi digunakan juga untuk melihat kemiripan antar *haplotype*, perhitungan jarak genetik menggunakan POPGENE32, dan untuk melihat dendrogramnya dengan menggunakan metoda UPGMA (*Unweighted Pair Group with Arithmatic Average*).

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Optimasi Ekstraksi DNA dan Seleksi Primer

5.1.1. Ekstraksi dan Isolasi DNA

Kualitas DNA hasil ekstraksi dilakukan secara visual untuk menentukan perbandingan pengenceran DNA untuk tahap selanjutnya, yaitu tahapan PCR.



Gambar 6. Contoh hasil ekstraksi DNA beserta pengenceran yang dianjurkan untuk proses PCR

Contoh hasil ekstraksi DNA disajikan pada Gambar 6 dimana terdapat berbagai ketebalan pita DNA. Pengenceran selanjutnya dapat dilakukan untuk dapat memperoleh DNA yang lebih bersih dan murni. Pita DNA yang tebal mengindikasikan bahwa hasil ekstraksi tersebut sangat kotor. Hasil ekstraksi yang kotor ini masih mengandung phenol yang tinggi, chloroform, dan alkohol. Selain itu, hasil yang kotor tersebut masih mengandung kontaminasi protein, polisakarida, dan RNA. Berdasarkan pengamatan secara visual, pita DNA yang tebal (kotor) memerlukan perbandingan pengenceran yang lebih besar yaitu 100x (99 µL *aquabidest* : 1 µL DNA). Pengenceran selanjutnya mengikuti tingkatan ketebalan pita DNA. Pita DNA yang paling tipis menggunakan perbandingan pengenceran 10x (9 µL *aquabidest* : 1 µL DNA), karena kualitas DNA-nya termasuk bagus (tidak terlalu kotor).

5.1.2. Seleksi Primer

5.1.2.1. PCR-RFLP

Seleksi primer pada teknik PCR-RFLP dilakukan dengan kombinasi perlakuan dua primer spesifik yaitu *trnLF* dan *rbcL*34 dengan empat enzim restriksi (Alu I, Hinf I, Msp I dan Hind III). Seleksi primer didasarkan atas polimorfisme DNA yang diamati. Hasil uji polimorfisme dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil uji polimorfisme kombinasi primer dan enzim restriksi

Primer	Enzim restriksi			
	Alu I	*Hinf* I	*Msp* I	*Hind* III
trnLF	+	-	-	-
*rbcL*34	-	-	-	-

Keterangan: (-) monomorfik
(+) polimorfik

Hasil pengamatan polimorfisme DNA melalui pemotongan dengan 4 enzim restriksi menunjukkan bahwa hampir di semua perlakuan mempunyai pola pita yang sama (monomorfik). Pola pita yang polimorfik hanya ditemukan pada kombinasi amplifikasi dengan primer *trnLF* dan pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi *Alu* I yang mengenali situs AG↓CT dan menghasilkan dua tipe pemotongan, yaitu menjadi 2 potongan dan 3 potongan. Keragaman pemotongan oleh enzim restriksi pada cpDNA ini disebut sebagai haplotipe (*haplotype*).

5.1.2.2. RAPD

Seleksi primer pada teknik RAPD yang dilakukan pada 35 primer produksi *Operon Technology* didasarkan pada hasil amplifikasi konsisten dan dapat dibaca. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa sebagian besar primer dapat teramplifikasi, akan tetapi kualitasnya beragam antara baik dan tidak baik. Rekapitulasi hasil seleksi primer dapat dilihat pada Tabel 13. Hasil seleksi primer menunjukkan bahwa terdapat 3 primer yang mampu menghasilkan produk amplifikasi yang konsisten beserta polimorfismenya, yaitu primer OPO-13, OPY-02, dan OPY-09. Selanjutnya ketiga primer ini digunakan untuk analisis keragaman di dalam dan antar populasi.

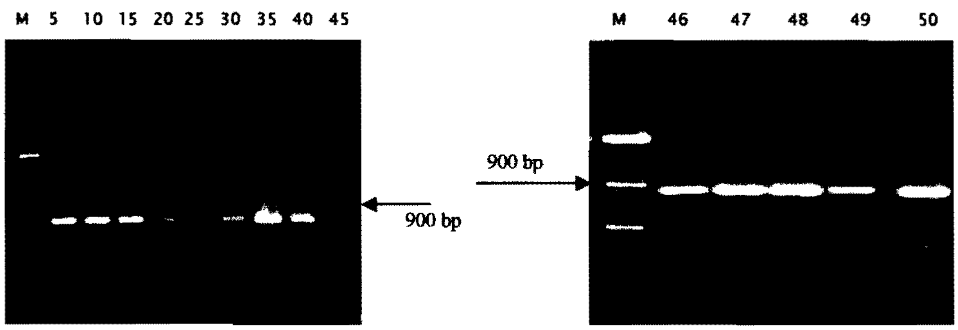
Tabel 13. Kualitas pita primer pada analisis RAPD

No.	Primer	Kualitas pita	No.	Primer	Kualitas pita
1	OPO-1	-	19	OPY-1	*
2	OPO-2	*	20	OPY-2	**
3	OPO-4	**	21	OPY-3	-
4	OPO-5	**	22	OPY-4	**
5	OPO-6	*	23	OPY-5	*
6	OPO-7	*	24	OPY-6	*
7	OPO-8	-	25	OPY-8	-
8	OPO-9	*	26	OPY-9	**
9	OPO-10	*	27	OPY-11	*
10	OPO-11	*	28	OPY-12	*
11	OPO-12	*	29	OPY-13	*
12	OPO-13	**	30	OPY-14	**
13	OPO-14	**	31	OPY-15	*
14	OPO-15	**	32	OPY-16	*
15	OPO-16	*	33	OPY-17	**
16	OPO-18	**	34	OPY-18	**
17	OPO-19	**	35	OPY-20	**
18	OPO-20	**			

Keterangan: (-) tidak teramplifikasi; (*) teramplifikasi kurang jelas; (**) teramplifikasi jelas

5.1.3. Keragaman cpDNA berdasarkan PCR-RFLP

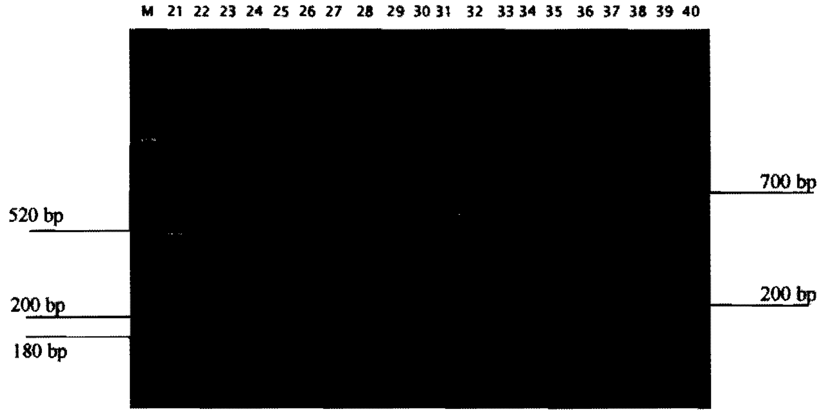
Dari hasil PCR dengan primer *trnLF* didapatkan satu pita, yang merupakan jumlah *base pair* (bp) total dari primer *trnLF* untuk tanaman. Primer yang digunakan untuk teknik PCR-RFLP merupakan primer yang universal, sehingga didapatkan pita (*band*) dengan jumlah *base pair* total yang sama, yaitu sekitar 900 bp (Gambar 7).



Gambar 7. Contoh hasil PCR dengan primer *trnLF* pada berbagai contoh uji

(Keterangan: M=marker; No. 5 = Banten; 10 = Ciamis; 15 = Indramayu; 20 = Cepu; 25 = Randublatung; 30 = Kendal; 35 = Bojonegoro; 40 = Ngawi; 46-50= Muna)

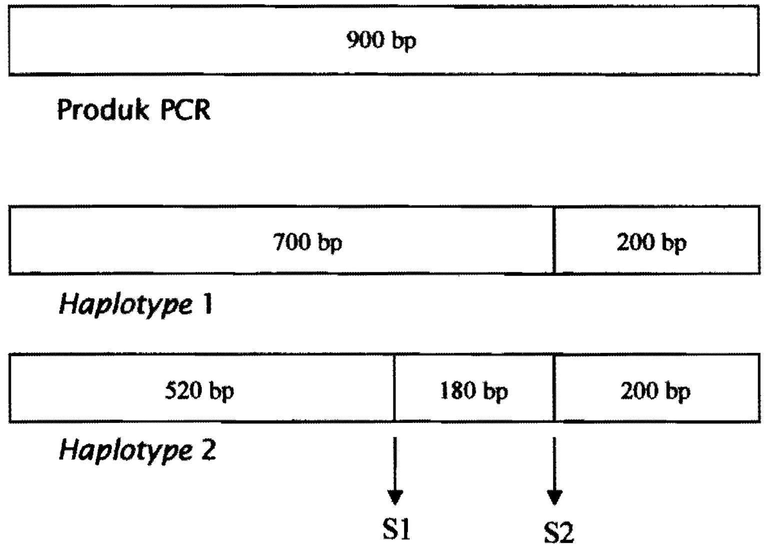
Pada penelitian ini, enzim restriksi yang digunakan adalah *AluI*. Enzim restriksi ini memotong pada situs tertentu. Situs yang dipotong untuk enzim restriksi *AluI* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil restriksi PCR *trnLF* dengan *AluI*

(Keterangan: M=marker; 1-5=Jati Banten; 6-10=Jati Ciamis; 11-15=Jati Indramayu; 16-20=Jati Cepu; 21-25=Jati Randublatung; 26-30=Jati Kendal; 31-35=Jati Bojonegoro; 36-40=Jati Ngawi).

Dari hasil pemotongan PCR *trnLF* dengan enzim restriksi *AluI*, dapat dilihat bahwa terdapat 2 *haplotype* (pola pita pemotongan). *Haplotype* yang pertama terbagi menjadi 2 potong (Gambar 12, sampel nomor 1-5, 7-10, 12-25, dan 27-50), yaitu pada 700 bp dan 200 bp. Jika dijumlahkan maka hasilnya sama dengan jumlah *base pair* total pada hasil PCR, yaitu 900 bp. Sedangkan *haplotype* yang kedua juga terbagi menjadi 3 potong, namun pada *base pair* yang berbeda, yaitu 520 bp, 200 bp, dan 180 bp. *Haplotype* yang kedua diamati pada sampel nomor 6, 11, dan 26, yaitu Jati yang berasal dari Ciamis, Indramayu, dan Kendal. Analisis fragmen dari kedua *haplotype* dapat dilihat pada Gambar 9. Hasil pemberian skor seluruh individu disajikan pada Lampiran 1.



Gambar 9. Analisis fragmen pada PCR-RFLP

Keragaman pola pita tersebut hanya didapatkan pada tiga sampel saja (sampel nomor 6, 11, dan 26) dari 50 sampel yang diujicobakan yang berasal dari 10 populasi (Banten, Ciamis, Indramayu, Cepu, Randublatung, Kendal, Bojonegoro, Ngawi, Kebonharjo, dan Muna). Hal tersebut menunjukkan bahwa keragaman DNA kloroplas sangatlah rendah, tidak banyak mengalami perubahan. Menurut McClean (1997), DNA kloroplas pada tumbuhan menunjukkan sifat konservatif yang besar dibandingkan dengan DNA mitokondria. Sifat genetis DNA kloroplas di antara semua tumbuhan tingkat tinggi sangat penting untuk dikonservasi karena banyak gen dalam DNA kloroplas memiliki kode protein yang berguna dalam keterlibatannya dalam proses fotosintesis.

Pada penelitian ini, ada bebeapa hasil pemotongan terlihat tidak sempurna (*partial digestion*). Menurut Gresshoff (1997), salah satu kelemahan teknik RFLP yaitu membutuhkan jumlah DNA yang besar dan berkualitas tinggi (murni). Jika jumlah DNA tidak cukup besar dan tidak cukup murni maka pemotongan yang tidak sempurna itu dapat terjadi. Hal ini didukung oleh penelitian Ahokas (1993) yang menyebutkan bahwa untuk menghindari pemotongan tidak sempurna (*partial digestion*) diperlukan adanya tahapan purifikasi DNA agar DNA menjadi murni dan menghasilkan kualitas pemotongan yang lebih baik. Perbedaan pemotongan sebelum dan sesudah purifikasi dapat juga dipengaruhi oleh kontaminasi DNA. Tahapan lain yang juga mempengaruhi yaitu ekstraksi phenol dan pencucian ethanol (Ahokas 1993). Pemotongan yang melalui tahapan ini akan menampilkan hasil yang normal

5.1.3.1. Keragaman cpDNA (PCR-RFLP) dalam Populasi

Tabel 14 menunjukkan hasil dari pemotongan cpDNA dengan menggunakan *trnLF-Alu* I yang teridentifikasi berdasarkan PCR-RFLP pada 50 sampel di 10 populasi yang menghasilkan 2 *haplotype.*

Tabel 14. *Haplotype* yang dijumpai pada 50 sampel Jati Jawa dan Muna

Tipe *haplotype*	***trnLF-Alu* I**	
	S1	S2
1	0	1
2	1	1

Perbedaan situs restriksi (S1 atau S2) dapat diasumsikan sebagai kejadian mutasi titik (*point mutation*) yang menyebabkan berubahnya urutan DNA sehingga tidak dikenali oleh enzim (Resmisari 2006). Pada *haplotype* pertama terpotong menjadi 700 bp dan 200 bp, sedangkan *haplotype* kedua terpotong menjadi 520 bp, 180 bp, dan 200 bp. Dari tipe pemotongan tersebut dapat dilihat bahwa *haplotype* kedua berasal dari *haplotype* pertama yang telah mengalami mutasi titik, yaitu 700 bp pada *haplotype* pertama terpotong menjadi 520 bp dan 180 bp pada *haplotype* kedua.

Tabel 15. Frekuensi haplotype dari 10 populasi

Haplotype	**Bt**	**Ci**	**In**	**Ce**	**Rd**	**Kn**	**Bj**	**Ng**	**Kb**	**Mn**
1	1.0	0.8	0.8	1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0
2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0

Keterangan: Bt (Banten), Ci (Ciamis), In (Indramayu), Ce (Cepu), Rd (Randublatung), Kn (Kendal), Bj (Bojonegoro), Ng (Ngawi), Kb (Kebonharjo), Mn (Muna)

Pada Tabel 15 dapat dilihat bahwa *haplotype* 1 merupakan *haplotype* yang dominan, sedangkan *haplotype* 2 hanya terdapat pada populasi Ciamis, Indramayu, dan Kendal. Hal ini menunjukkan adanya keragaman dalam populasi di ketiga populasi tersebut yang ditunjukkan dari adanya keragaman situs pemotongan.

Keragaman *haplotype* di dalam populasi yang terdeteksi cukup rendah. Hal ini menunjukkan bahwa cpDNA sangat konservatif. Sifat konservatif ini terjadi karena cpDNA hanya diturunkan oleh induk betina saja dan tidak mengalami rekombinasi, sehingga aliran gen berupa migrasi benih dan mutasi yang terjadi sangat rendah (Resmisari 2006).

5.1.3.2. Keragaman cpDNA (PCR-RFLP) antar Populasi

Berdasarkan data keragaman situs restriksi kemudian dilakukan analisis Keragaman molekuler (AMOVA, *Analysis of Molecular Variance*) untuk melihat keragaman dengan memasukkan data pada software ARLEQUIN 3.01. Hasil perhitungan pada Tabel 16.

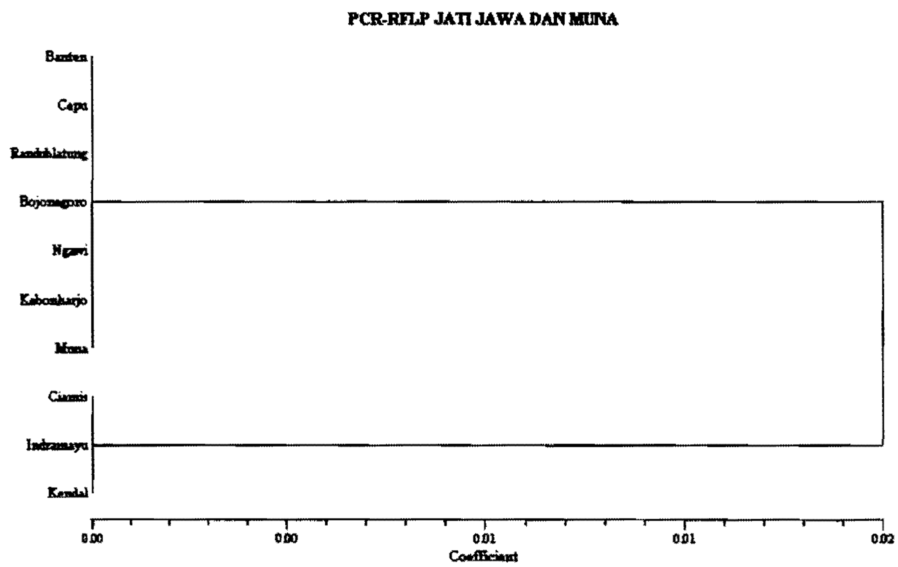
Tabel 16. Hasil perhitungan AMOVA

Sumber ragam	db	Jumlah kuadrat	Komponen ragam	% ragam	Indeks fiksasi	P
Antar pulau	1	0.020	-0.00333	-6.10	F_{CT}=-0.06098	0.30401^{ns}
Antar populasi dalam pulau	8	0.400	-0.00200	-3.66	F_{SC}=-0.03448	0.23363^{ns}
Dalam populasi	40	2.400	0.06000	109.76	F_{ST}=-0.09756	0.23851^{ns}
Total	49	2.820	0.05467	-	-	-

Keterangan: Derajat bebas (db), korelasi random pairs allel didapat dari nilai relatif grup dengan seluruh populasi (F_{CT}), korelasi random pairs allel didapat dari nilai relatif populasi dengan seluruh grup (F_{SC}), korelasi random pairs allel didapat dari nilai relatif populasi dengan seluruh populasi (F_{ST}), tidak berbeda nyata (ns)

Keragaman antar pulau, antar populasi dalam pulau, dan dalam populasi memberikan hasil yang tidak berbeda nyata. Hasil analisis ragam molekuler menunjukkan bahwa ragam dalam populasi menyumbangkan persentase ragam tertinggi (109.76%), kemudian diikuti dengan persentase ragam pada level antar populasi dalam pulau (-3.66%) dan antar pulau (-6.10%). Nilai negatif mengindikasikan tiap-tiap sampel tidak berbeda.

Pengelompokan genetik didasarkan pada jarak genetik. Jarak genetik digunakan untuk mengukur perbedaan struktur genetik antar dua populasi. Semakin kecil jarak genetik, semakin dekat kekerabatan genetiknya. Sebaliknya, semakin besar jarak genetik, maka semakin jauh kekerabatan genetiknya. Pengukuran jarak genetik dilakukan dengan bantuan software POPGENE32. Jarak genetik disajikan pada Lampiran. Dendrogram jarak genetik dapat dilihat pada Gambar 10.



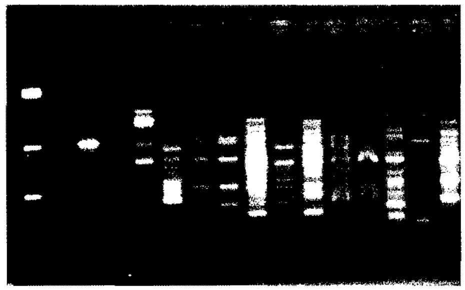
Gambar 10. Dendrogram jarak genetik pada teknik PCR-RFLP

Dari dendrogram tersebut dapat dilihat bahwa populasi Jati Banten, Cepu, Randublatung, Bojonegoro, Ngawi, Kebonharjo, dan Muna membentuk satu kelompok (klaster) yaitu kelompok pertama. Kelompok pertama tersebut bersatu membentuk kelompok besar dengan Jati dari populasi Ciamis, Indramayu, dan Kendal.

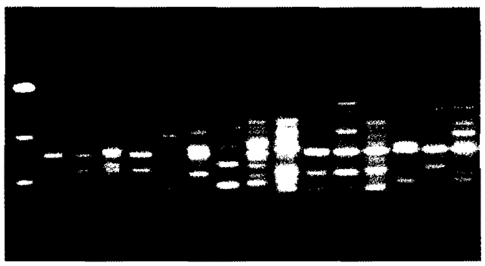
5.1.4. Keragaman DNA berdasarkan RAPD

Analisis RAPD hanya dilakukan pada populasi di Jawa tanpa mengikutsertakan populasi Muna agar analisisnya menjadi lebih terfokus. Contoh hasil RAPD dengan salah satu primer terseleksi yaitu OPY-09 disajikan pada Gambar 11. Adapun hasil pemberian skor pola pita DNA untuk ketiga primer disajikan pada Lampiran 2, 3 dan 4.

(a)



(b)



(c)

Gambar 11. Contoh hasil RAPD menggunakan primer OPY-09 pada populasi Jawa Barat (a), Jawa Tengah (b) dan Jawa Timur (c)

Berdasarkan Gambar 9 terlihat adanya suatu perbedaan pola pita yang cukup berbeda menurut asal populasi. Hal tersebut mengindikasikan adanya pola pita yang khas untuk masing-masing daerah.

5.1.4.1. Keragaman DNA (RAPD) dalam Populasi

Hasil analisis RAPD menunjukkan keragaman genetik seperti tercantum pada Tabel 17.

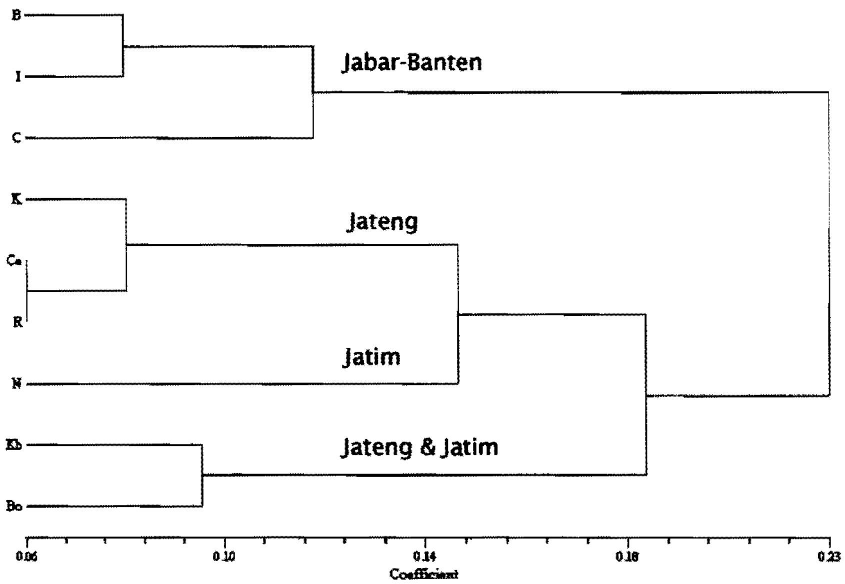
Tabel 17. Variabilitas genetik dalam populasi jati di jawa

No	Populasi	N	*PPL*	*na*	*ne*	*h*
1	KPH Banten	5	38.81	1.3881	1.3143	0.1711
2	KPH Indramayu	5	59.70	1.5970	1.5277	0.2753
3	KPH Ciamis	5	32.84	1.3284	1.2933	0.1540
4	KPH Kendal	5	40.30	1.4030	1.2883	0.1586
5	KPH Cepu	5	38.81	1.3881	1.2902	0.1565
6	KPH Randublatung	5	22.39	1.2239	1.1671	0.0920
7	KPH Kebonharjo	5	34.33	1.3433	1.2334	0.1308
8	KPH Bojonegoro	5	35.82	1.3582	1.2285	0.1302
9	KPH Ngawi	5	19.40	1.1940	1.0979	0.0614

Keterangan:
PPL= Percentage of Polymorphic Loci
na = Observed number of alleles
ne = Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]
h = Nei's (1973) gene diversity

Populasi Jati KPH Indramayu menunjukkan nilai-nilai variabilitas genetik yang tertinggi, yaitu: PPL=59.79%; na=1.5970; ne=1.5277; h=0.2753, sedangkan populasi Jati KPH Ngawi menunjukkan nilai-nilai variabilitas genetik yang terendah yaitu: PPL=19.40%; na=1.1940; ne=1.0979; h=0.0614. Nilai yang dicatat oleh populasi lainnya berada pada kisaran kedua populasi di atas, dimana nilai tersebut secara umum tidak jauh berbeda dengan hasil-hasil penelitian terdahulu, dimana nilai *h* berkisar diantara nilai 0.2000 (20%).

Kemampuan suatu jenis pohon hutan untuk beradaptasi pada berbagai kondisi lingkungan sangat tergantung pada keragaman genetik dan multiplisitas individual pohon dalam populasi (Gregorius, 1989 *dalam* Hosius *et al.*, 2000). Penetapan pola struktur dan variasi distribusi genetik di dalam dan antar populasi akan memberikan informasi dasar bagi kepentingan penetapan aktivitas pemuliaan pohon di masa datang dan upaya melakukan konservasi sumberdaya genetik serta penelusuran asal usul bahan tanaman.



Gambar 12. Pengelompokkan populasi jati berdasarkan analisis RAPD

(Keterangan: B=Banten; I=Indramayu; C=Ciamis; K=Kendal; Ce=Cepu; R=Randublatung; Kb=Kebonharjo; Bo=Bojonegoro; N=Ngawi)

Keragaman genetik suatu jenis dapat diduga melalui nilai heterosigositas harapan pada keseimbangan HARDY-WEINBERG (H_e) hasil survey genetik pada lokus-lokus yang polimorfik. Pendugaan keragaman genetik Jati yang telah dilakukan menghasilkan nilai *h* mencakup hasil studi yang dilakukan Widyatmoko (1996) sebesar 0,199 (berdasarkan 7 lokus polimorfik isozim). Dibandingkan dengan nilai H_e pada tumbuhan berkayu di hutan tropis sebesar 0,191, maka Jati termasuk jenis yang memiliki keragaman genetik sedang (Hamrick *et al.*, 1992 *dalam* Finkeldey, 1998). Namun Kertadikara dan Prat (1995) melakukan penelitian terhadap berbagai provenans Jati (Indonesia, India, Thailand dan Afrika) dan menghasilkan keragaman genetik yang cukup tinggi sebesar 0,347.

5.1.4.2. Keragaman DNA (RAPD) antar Populasi

Analisis gerombol untuk mengetahui pola pengelempokan populasi berdasarkan kesamaan DNA yang dimiliki disajikan seperti dendogram pada Gambar 12. Hasil dendrogram tersebut menununjukkan pengelompokkan yang sangat jelas menurut wilayah dalam hal ini provinsi dimana populasi tersebut berada.

Hasil pengelompokkan memperlihatkan ada tiga gerombol, dimana Jati asal Jawa Barat-Banten tetap membentuk gerombol yang sama, sedangkan Jati Jawa Tengah dan Jawa Timur bersama-sama membentuk satu gerombol lain. Khusus di jawa Tengah, Jati KPH Kendal, Cepu dan Randublatung memiliki keragaman genetik yang tidak terlalu berbeda, sedangkan Jati KPH Ngawi, lebih mirip struktur genetiknya dengan Jawa Tengah. Jati KPH kebonharjo dan Bojonegoro memeliki struktur genetik yang berdekatan dan terpisah dari gerombol Jati jawa Tengah lainnya.

Pengelompokan populasi Jati genetik merupakan informasi penting sebagai bahan pertimbangan dilakukannya upaya pemuliaan di masa mendatang. Faktor aliran gen akan berpengaruh terhadap struktur dan variasi genetik populasi. Pola variasi genetik suatu jenis ditentukan oleh sistem perkawinan yang terjadi dan akan mempengaruhi struktur genetik dan dinamika populasi dalam jenis tersebut (Allard, 1975; Tigerstedt, 1984; Muona, 1990 *dalam* Kundu, 1999). Dengan mengetahui proses-proses perkawinan yang terjadi pada suatu jenis akan bermanfaat bagi efektifitas konservasi sumberdaya genetik dan optimalisasi upaya pemuliaan genetik jenis yang bersangkutan.

Sistem perkawinan pada Jati telah lebih dahulu dipelajari oleh Hedegart (1976) dan Kertadikara dan Prat (1995). Kedua penelitian tersebut melaporkan bahwa Jati merupakan jenis yang menyerbuk silang (allogami) dan ditemukan tingkat *selfing* yang sangat rendah (sekitar 2 %). Analisis yang dilakukan pada populasi keturunan di KBK juga menunjukkan hal yang sama dengan rata-rata tingkat *selfing* sekitar 3 % dimana klon D memiliki nilai tertinggi sebesar 18 %. Berdasarkan hasil tersebut maka alasan utama terjadinya defisit heterosigositas pada populasi keturunan bukan disebabkan oleh derajat *selfing*, karena defisit heterosigositas dapat terjadi bila derajat *selfing* tinggi.

Sebagai jenis yang menyerbuk silang, transfer polen pada Jati memerlukan agen penyerbuk yang menurut Hedegart (1973) dibantu oleh serangga berupa lebah dan kupu-kupu. Sehingga penjelasan yang paling mungkin untuk menerangkan fenomena defisit heterosigositas di KBK Jati Padangan adalah adanya keterbatasan gerak polinator yang berasosiasi dengan variasi iklim mikro, seperti pengamatan Mathew *et al.* (1987). Hal ini cenderung akan meningkatkan perkawinan antar individu-individu pohon bertetangga dekat yang kemungkinan besar berkerabat. Perkawinan antar kerabat ini yang akhirnya akan menyumbang pada terjadinya defisit heterosigositas (Kertadikara dan Prat, 1996). Persilangan antar individu yang berkerabat pada tanaman yang penyerbukannya dibantu serangga cenderung tinggi, seperti dilaporkan Loveless dan Hamrick (1984) *dalam* Shapcott (1994).

5.1.5. Analisis Awal Komponen Kimia Kayu Jati

Komponen kimia utama kayu terdiri dari komponen-komponen makromolekul yang berupa selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Selain itu kayu juga tersusun atas zat-zat dengan berat molekul tendah, diantaranya zat ekstraktif dan zat mineral. Meskipun hanya teredapat dalam jumlah kecil, namun zat-zat dengan berat molekul rendah ini berpengaruh terhadap sifat dan pengolahan kayu. Ekstraktif merupakan bagian kecil dari komponen kayu yang larut dalam pelarut-pelarut organik netra atau air. Ekstraktif ini dipandang sebagai senyawa kayu yang tidak struktural, karena hampir seluruhnya terbentuk dari senyawa-senyawa ekstraseluler dan berat molekul rendah.

Hasil analisa komponen kimia kayu struktural dan nonstruktural pada kayu Jati dari berbagai daerah disajikan pada Tabel 18. Secara umum dapat disampaikan bahwa sifat-sifat kayu, termasuk sifat kimia kayu, berbeda antar jenis kayu, dalam satu jenis, bahkan dalam satu pohon. Faktor lingkungan tempat tumbuh dan genetis kayu merupakan salah satu yang ikur berperan memunculkan perbedaan-perbedaan tersebut. Menurut Browning (1963) dalam Fengel dan Wegener (1995), terdapat perbedaan komposisi kimia dalam kayu di beberapa tempat atau bagian dari suatu pohon. Secara umum, kayu gubal terutama *softwood* mengandung lebih banyak lignin, selulosa, dan ekstraktif dibandingkan kayu teras, sedangkan pada beberapa *hardwood* jumlah lignin, selulosa dan ekstraktif pada kayu gubal dan kayu teras tidak menunjukkan adanya perbedaan yang mencolok. Kayu akhir memiliki selulosa lebih tinggi dan kadar lignin yang lebih rendah dibandingkan kayu awal.

Kandungan komponen kimia menunjukkan bahwa selulosa merupakan senyawa dominan, diikuti oleh hemiselulosa, serta lignin. Tabel 19. menyajikan Kandungan komponen kimia kayu untuk kayu *hardwood* dan *softwood*.

Tabel 19. Kandungan komponen kimia kayu

Tipe kayu	Komponen kimia kayu (% berat kering)		
	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
Hardwood	40-44	15-35	18-25
Softwood40-44	40-44	20-32	25-35

Sumber: Kollmann dan Cote (1968)

Tabel 18. Hasil analisa komponen kimia kayu struktural dan non struktural pada kayu Jati

No	Daerah	Kode	Kadar Air (%)	Komponen Kimia Struktural				Komponen Komia Non Struktural		
				Kadar Holoselulosa (%)	Kadar Hemiselulosa (%)	Kadar Selulosa (%)	Kadar Lignin (%)	Kelarutan Air Panas (%)	Kelarutan Air Dingin (%)	Kelarutan Ethanol Benzena (%)
1.	Jawa Barat	B	9.34	69.96	31.46	38.20	26.71	6.76	2.23	3.98
2.		CS	8.14	75.88	26.10	49.78	39.93	8.20	3.61	6.70
3.		IM	7.58	76.57	29.46	47.11	28.97	9.06	3.48	9.40
4.	Jawa Tengah	K	9.25	68.99	31.12	37.87	26.23	5.12	1.74	4.78
5.		KH	9.83	72.36	24.15	48.21	27.71	7.97	2.03	6.98
6.		C	10.22	72.55	22.83	49.72	27.89	7.86	2.86	7.05
7.		RB	9.11	70.41	26.78	43.63	25.89	7.47	2.49	6.97
8.	Jawa Timur	BN	9.75	72.91	22.46	50.05	26.14	8.74	3.44	8.64
9.		NI	10.28	69.32	30.81	38.51	29.36	5.99	1.81	6.38

Keterangan:
B : Banten
CS : Ciamis
IM : Imdramayu
K : Kendal
KH : Kebonharjo
C : Cepu
RB : Randublatung
BN : Bojonegoro
NI : Ngawi

Sementara itu klasifikasi komponen kimia kayu Indonesia disajikan pada Tabel 20.

Tabel 20. Klasifikasi komponen kimia kayu Indonesia

Komponen kimia (%)	Kelas komponen (%)		
	Tinggi	Sedang	Rendah
Kayu daun lebar (*Hardwood*)			
• Selulosa	>45	40-45	<40
• Lignin	>33	18-33	<18
• Pentosan	>24	21-24	<21
• Zat ekstraktif	>4	2-4	<2
• Abu	>6	0,2-6	<0,2
Kayu daunjarum (*Softwood*)			
• Selulosa	>44	41-44	<41
• Lignin	>32	28-32	<28
• Pentosan	>13	8-13	<8
• Zat ekstraktif	>7	5-7	<5
• Abu	>0,89	0,89	<0,89

Sumber: Ditjen Kehutanan (1976) dalam Wardany (2002)

Berdasarkan klasifikasi komponen kimia kayu Indonesia di atas, maka hasil penelitian terhadap kayu jati yang berasal dari beberapa daerah di Jawa menunjukkan bahwa kandungan selulosa untuk daerah Banten (Jawa Barat), Kendal (Jawa Tengah), dan Ngawi (Jawa Timur) termasuk cukup rendah; dan daerah Randublatung (Jawa Tengah) termasuk kategori sedang. Sementara daerah lain termasuk memiliki kandungan selulosa yang tinggi. Untuk kandungan lignin, seluruh daerah kecuali daerah Ciamis (Jawa Barat) termasuk memiliki kandungan lignin yang sedang. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya untuk daerah Ciamis, Bojonegoro, dan Ngawi, seperti yang disampaikan pada Tabel 21.

Tabel 21. Komponen kimia struktural kayu Jati di 3 daerah

Komponen kimia	Wilayah		
	KPH Ciamis*	KPH Bojonegoro**	KPH Ngawi***
Holoselulosa (%)	72,90	73,87	76,45
Hemiselulosa (%)	23,68	27,57	32,53
Selulosa (%)	49,23	46,30	43,92
Lignin (%)	28,76	25,03	26,41

Sumber: * (Tsabit, 2005), ** (Ramadhani, 2005), *** (Handayani, 2005)

Secara umum hasil analisis komponen kimia non struktural kayu Jati yang diteliti dengan hasil penelitian sebelumnya untuk 3 daerah (Ciamis, Bojonegoro, dan Ngawi) tidak terlalu berbeda, kecuali untuk komponen kelarutan air dingin daerah Bojonegoro yang cukup rendah. Tabel 22. menyajikan hasil penelitian sebelumya untuk komponen kimia non struktural jati di 3 daerah (Ciamis, Bojonegoro, dan Ngawi).

Tabel 22. Komponen kimia non struktural kayu Jati di 3 daerah

Komponen Kimia	Wilayah		
	KPH Ciamis*	KPH Bojonegoro**	KPH Ngawi***
Ekstraktif dalam Kelarutan air panas (%)	6,21	7,76	4,29
Ekstraktif dalam Kelarutan air dingin (%)	2,60	7,04	2,64
Ekstraktif dalam Ethanol-benzen (%)	4,78[a]	7,82[a]	-
	8,63[b]	10,86[b]	6,81[b]

Sumber: * (Tsabit, 2005), ** (Ramadhani, 2005), *** (Handayani, 2005)
Keterangan: [a] kayu gubal, [b] kayu teras

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Keragaman cpDNA Jati di Jawa dan Muna sangat rendah, dimana kombinasi amplifikasi dengan primer *trnLF* dan restriksi dengan enzim *AluI* menghasilkan dua haplotipe Jati (haplotipe I dan haplotipe 2). Haplotipe 1 merupakan haplotipe dominan dengan frekuensi berkisar 80% di dalam populasi yang polimorfik dan 100% di dalam populasi monomorfik. Keragam cpDNA yang rendah yang diperoleh dari penelitian ini belum dapat dijadikan kunci diagnostik untuk menentuka asal-usul individu, dimana analisis ragam molekuler pada teknik PCR-RFLP menunjukkan bahwa ragam dalam populasi masih menyumbangkan persentase ragam tertinggi. Analisis gerombol cpDNA belum mendapatkan pola pengelompokkan yang spesifik, dimana wilayah Jati masih bercampur seperti Jati KPH Banten, KPH Cepu, KPH Randublatung, KPH Bojonegoro, KPH Ngawi, KPH Kebonharjo, dan Munä yang membentuk kelompok pertama,

dan kemudian membentuk kelompok besar dengan gerombol Jati KPH Ciamis, KPH Indramayu, dan KPH Kendal.

2. Keragaman DNA Jati di Jawa berdasarkan analisis RAPD sudah mampu memberikan pola pengelompokkan yang lebih jelas, dimana Jati Jawa Barat-Banten (KPH Ciamis, Banten dan Indramayu) membentuk gerombol tersendiri dan dapap dipisahkan secara jelas dengan Jati Jawa Tengah dan Jawa Timur. Pola pengelompokkan seperti ini dapat dijadikan sebagai awal pencarian penanda diagnostik. Secara umum Jati Jawa Barat-Banten memiliki keragaman DNA yang lebih tinggi (h=0.15-0.27)dibanding dengan Jati Jawa Tengah dan Jawa Timur (h=0.06-0.16). Diduga populasi Jati Jawa Barat-Banten dibangun dari sumber benih yang berbeda dengan Jati Jawa Tengah dan Jawa Timur serta mengalami proses evolusi yang lebih dinamis.

3. Hasil penelitian awal terhadap sifat kimia kayu jati yang berasal dari beberapa daerah di Jawa menunjukkan bahwa kandungan selulosa untuk daerah Banten (Jawa Barat), Kendal (Jawa Tengah), dan Ngawi (Jawa Timur) termasuk cukup rendah; dan daerah Randublatung (Jawa Tengah) termasuk kategori sedang. Sementara daerah lain termasuk memiliki kandungan selulosa yang tinggi. Untuk kandungan lignin, seluruh daerah kecuali daerah Ciamis (Jawa Barat) termasuk memiliki kandungan lignin yang sedang.

5.2. Saran

Saran dari penelitian ini adalah bahwa informasi yang diperoleh dari survey genetik secara luas di Jawa dapat dijadikan sebagai rujukan dalam perencanaan pengelolaan sumberdaya genetik Jati oleh Perum Perhutani.

I. RENCANA PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA

A. Tujuan Khusus

Secara biologis selain daun, benih dan kambium jati, bagian lainnya seperti kayu juga menyimpan materi genetik berupa DNA. Hasil penelitian Tahun I menunjukkan kemungkinan penggunaan penanda RAPD untuk penyusunan basis data DNA populasi Jati di Jawa, dimana perbedaan antara wilayah dapat diduga dengan lebih jelas. Permasalahan selanjutnya pada penelitian tahap selanjutnya adalah apakah basis data variasi DNA yang ada di kayu jati maupun produk olahannya dapat diekstraksi untuk keperluan analisa genetik dan evalusi asal-usul kayu tersebut. Selain itu apakah sifat kimia kayu Jati secara lebih rinci dapat dieksplorasi dan selanjutnya dapat digunakan untuk membedakan pengaruh lokasi dimana kayu Jati tumbuh. Berdasarkan pertimbangan di atas, maka tujuan khusus yang akan dicapai pada penelitian Tahun ke II adalah untuk:

i) Mengeksplorasi penanda diagnostik yang konsisten dengan menggunakan penanda genetik yang lain seperti mikrosatelit cpDNA dan DNA total.
ii) Mengetahui metode ekstraksi dan isolasi DNA yang sesuai dari bahan berupa kayu Jati dan atau produk olahannya.
iii) Mengetahui perbedaan kandungan kimia kayu Jati yang lebih rinci berdasarkan metode NIR (*near infra red*).

B. Metode

Eksplorasi penanda diagnostik

Eksplorasi penanda diagnostik akan dilakukan dengan menggunakan penanda genetik lain yaitu mikrosatelit cpDNA dan DNA total. Primer mikrosatelit yang digunakan adalah primer universal untuk cpDNA dan primer spesifik untuk DNA total. Tiga primer universal berupa *concencus chloroplast microsatellite primers* (ccmp) (Weising dan Gardner, 1999) akan diuji polimorfismenya pada DNA yang telah diisolasi dari sembilan populasi. Selain itu tiga primer spesifik untuk Jati (Palupi, 2006) juga akan diuji kembali dan digunakan untuk eksplorasi penanda diagnostik.

Ekstraksi dan Isolasi DNA dari kayu dan produk olahan

Ekstraksi dan isolasi DNA dari kayu jati akan menggunakan metode yang digunakan pada jenis lain (Csaikl et al., 1998; Sperisen et al., 2000; Deguilloux et al. 2002).

Analisis NIR (*near infra red*)

Analisis komponen kimia dengan NIR merupakan suatu metode analitik yang masih baru dan saat ini baru berkembang. Metode NIR dipakai karena memiliki beberapa keunggulan seperti: berkecepatan tinggi, teliti, dan sederhana. Untuk analisis komponen kimia kayu, metode NIR akan mengikuti prosedur baku (Huaqiang, 2006), yaitu: i) persiapan contoh uji, ii) pengukuran desturiktif *di* laboratorium (data penelitian Tahun I), iii) pemindaian NIR, iv) analisis multivariat, v) Kalibrasi model dan vi) Pendugaan sifat kimia kayu.

Untuk keperluan ketiga kegiatan di atas, maka volume reaksi yang akan dilakukan disajikan pada Tabel 23. Kegiatan akan dilakukan di Laboratorium di Fakultas Kehutanan dan Fakultas Teknologi Pertanian IPB.

Tabel 23. Rincian kegiatan laboratorium untuk analisis keragaman mikrosatelt, ekstraksi dan isolasi DNA kayu serta analisis kimia kayu dengan metode NIR

No.	Jenis analisis	Metode	Jumlah sampel	Total reaksi
1.	cpDNA daun	cpSSR; 3 primer (3x)	45	135
	DNA total	cpSSR; 3 primer spesifik (3x)	45	135
2.	Isolasi DNA kayu	Qiagen modifikasi; 2 produk; 4 posisi contoh (8x)	18	144
3.	Kimia kayu	NIR; 3 region (3x)	9	27

B. Jadwal Kerja

Rincian kegiatan penelitian Tahun II disajikan seperti pada Tabel 24.

Tabel 24. Rencana kegiatan dan tata waktu pelaksanaan penelitian tahun II (2007)

No	Kegiatan	Tahun 2007						
		Apr	Mei	Jun	Jul	Agu	Sep	Okt
1	Persiapan Alat dan Bahan	x	x					
2	Analisis mikrosatelit		x	x	x	x	x	
3	Ekstraksi & Isolasi DNA kayu		x	x	x	x	x	
4	Analisis NIR		x	x	x	x	x	
5	Pengolahan Data			x	x	x	x	
6	Penulisan Laporan							x

DAFTAR PUSTAKA

Ahokas A. 1993. Searching for DNA Introgressed from Wheat and for Wheat-like Grain Proteins in A Rice x Wheat Hybridization Derivative. [Jurnal]. Finland: Plant Breeding Institute.

Bhat, K.M. and O. Ma. 2004. Teak growers unite. Tropical Forest Update (14-1): 3-5

Csaikl, U.M., Bastian, H., Brettschneider, R., Gauch, S., Meir, A., Schauerte, M., Scholz, F., Sperisen, C., Vornam, B., and Ziegenhagen, B. (1998). Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 69-86.

Crowder LV. 1997. Genetika Tumbuhan. Kusdiarti L, Soetarso, penerjemah; Soetarso, editor. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari: Plants Genetics.

Deguilloux, M.-F., M.-H. Pemonge and R. J. Petit (2002). Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. The Royal Society **269**: 1039-1046.

Dewi SP. 2003. Pendugaan keragaman genetik serta sistem perkawinan (mating system) di kebun benih klon Jati (Tectona grandis Linn.f.) [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Falconer DS. 1989. Introduction to Quantitative Genetics Third Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Finkeldey R. 1999. Genetische Untersuchungen zur Reproduktion von Teak (Tectona grandis L.f.) in Thailand. Habilitationsschrift bei der Fakultaet fuer Forstwissenschaften und Waldoekologie der Georg-August-Universitaet Goettingen.

Finkeldey R. 2003. An Introduction to Tropical Forest Genetics. Gottingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding.

Gillet, EM. 1998. GSED: Genetic Structures from Electrophoresis Data-version 1.1. Germany: Institut für Forstpflanzenzüchtung Universität Gottingen.

Gillet, EM. 1999. Minimum sample size for sampling genetic marker distributions in Gillet, E.M. (Ed.): Which DNA Marker for Which Purpose?. Institut fuer Forstgenetik and Forstpflanzenzuechtung, Universitaet Goettingen.

Godoy, J. A., and P. Jordano (2001). Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. Mol. Ecol. **10**: 2275-2283.

Gresshoff P. M. 1997. *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews.* New York: Wiley-Liss.

Hamrick, J. L., and M. J. W. Godt (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Phil. Trans. Royal Soc. London, Ser. B. 351: 1291-1298.

Hartana A. 1992. Genetika Tumbuhan. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat IPB.

Hattemer HH. 1991. Measuring genetic variation. Di dalam: Muller-Starck G, Ziehe M, editor. Genetic Variation in European Populations of Forest Trees. Frankfurt am Main: Sauerlander Verlag

Huaqiang, Y. 2006. Predicting air-dry density of three softwood species by the near infra red (NIR) spectroscopy. Research Institute of Wood Industry. Chinese Academy of Forestry.

Indrioko S. 2005. Chloroplast DNA Variation in Indonesian Dipterocarpaceae Phylogenetic, Taxonomic, and Population Genetic Aspects. Goettingen: Cuvillier Verlag.

Kertadikara AWS. 1996. Struktur genetik dan sistem perkawinan pada beberapa populasi Jati (Tectona grandis L.f.). Di dalam: Prosiding Seminar Nasional Penerapan Prinsip-prinsip Pemuliaan Pohon dalam Pengelolaan Hutan Tanaman Industri; Yogyakarta, 27 Maret 1996. hlm 191-203.

Linhart YB, Mitton JB, Sturgeon KB, Davis ML. 1981. Genetic variation in space and time a population of ponderosa pine. Heredity 46:407-426.

Mahfudz, Fauzi MA, Yuliah, Herawan T, Prastyono, Supriyanto H. 2004. Sekilas Tentang Jati (Tectona grandis). Yogyakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan.

Palupi, ER. 2006. Genetic, biotic and physiological factors in seed producion of teak (tectona grandis L.f): A case study in clonal seed orchard in East java. PhD thesis. Graduate school, Bogor Agricultural University, Bogor.

Pasaribu, H. 2002. Sambutan Kepala Badan Litbang Kehutanan. Disampaikan pada Acara Diskusi Penyediaan Bibit Unggul Jati di P3BPTH. Yogyakarta.

Resmisari R. S. 2006. Variasi DNA Kloroplas *Shorea leprosula* di Indonesia dengan Penanda PCR-RFLP. [Tesis]. Bogor; Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

Rowel, R.M. 2005. Handbook of wood chemistry and wood composite. CRC Press. USA.

Siswamartana, S. dan A. Wibowo. 2003. Resume Hasil-Hasil Penelitian Perum Perhutani 1998-2003. Pusbang SDH Perum Perhutani. Cepu

Siregar IZ. 2000. Genetic Aspects of the Reproductive System of Pinus merkusii Jugh et de Vriese in Indonesia. Gottingen: Cuvillier Verlag. 147 hlm.

Sperisen, C., Gugerli, F., Büchler, U., and Mátyás, G. (2000). Comparison of two rapid DNA extraction protocols for gymnosperms for application in population genetic and phylogenetic studies. *Forest Genetics* 7: 133-136.

Weising K, Gardener RC. 1999. A set of Conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genome of dicotyledonous Angiosperms. *Genome.* 42 : 9 - 19

Widianto, A.N, A. Pancoro, D. Sasmitamihardja, M.R. Moeis, A. Pingkan. 2000. Laporan Akhir Penelitian. Bioteknologi Tanaman Hutan: Analisis Keragaman Genetik dan Rekayasa Genetik Pohon Jati. Lembaga Penelitian IPB. Bandung.

Widyatmoko AYPBC. 1996. Identifikasi klon Jati berdasarkan marker isozyme. Ekspose Hasil-hasil Penelitian dan Pengembangan Pemuliaan Benih Tanaman Hutan; Yogyakarta, 28 Maret 1996. Yogyakarta. hlm 241-257.

Yeh, F.C., Rongcai, Y and Boyle, T. 1997. POPGENE version 1.2 : Microsoft window-based software for population genetic analysis. A Quick User's Guide. A Joint Project Development of University of Alberta and CIFOR.

Lampiran 1. Hasil skoring pola pita cpDNA Jati berdasarkan PCR-RFLP dari 9 populasi berdasarkan primer trnLF dan enzim restriksi AluI

Lokus	Banten					Ciamis					Indramayu					Cepu					Randublatung				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lokus	Kendal					Bojonegoro					Ngawi					Kebonharjo					Muna				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran 1. Hasil skoring pola pita cpDNA Jati berdasarkan PCR-RFLP dari 9 populasi berdasarkan primer trnLF dan enzim restriksi AluI

Lokus	Banten					Ciamis					Indramayu					Cepu					Randublatung				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lokus	Kendal					Bojonegoro					Ngawi					Kebonharjo					Muna				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran 2. Hasil skoring pola pita DNA Jati berdasarkan RAPD dari 9 populasi berdasarkan primer OPO-13.

Lks	Banten					Indramayu					Ciamis					Kendal				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
4	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
5	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
6	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
7	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
8	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
9	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
10	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
11	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
14	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
15	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
16	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
17	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
18	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lks	Cepu					Randublatung					Kebonharjo					Bojonegoro					Ngawi				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
13	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
14	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
15	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
16	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran 3. Hasil skoring pola pita DNA Jati berdasarkan RAPD dari 9 populasi berdasarkan primer OPY-02.

Lks	Banten					Indramayu					Ciamis					Kendal					Cepu					Randublatung					Kebonharjo					Bojonegoro					Ngawi				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
6	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
7	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
8	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
9	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
10	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
18	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran 4. Hasil skoring pola pita DNA Jati berdasarkan RAPD dari 9 populasi berdasarkan primer OPY-09

Lks	Banten					Indramayu					Ciamis					Kendal					Cepu					Randublatung					Kebonharjo					Bojonegoro					Ngawi				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0