

# IDENTIFIKASI ISOLAT FUNGI ENDOFIT LBKURCC43 BERDASAR SEKUENS ITS rDNA DARI UMBI TANAMAN DAHLIA (DAHLIA VARIABILIS)

Sefni Hendris<sup>1</sup>, Titania T. Nugroho<sup>2</sup>, Saryono<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Studi S2 Kimia

<sup>2</sup>Bidang Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau  
Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

sefnihendris@yahoo.co.id

saryono\_ur@yahoo.com

## ABSTRAK

Fungi LBKURCC43 merupakan fungi endofit yang diisolasi dari umbi tanaman dahlia berbunga ungu (*Dahlia variabilis*) di Padang Panjang, Sumatera Barat. Identifikasi secara morfologi isolat tersebut telah dilakukan dan hanya mengidentifikasi pada tingkat genus. Identifikasi secara molekuler dengan menggunakan DNA adalah identifikasi spesies yang lebih tepat digunakan. Sebelum dilakukan analisis filogenetik secara molekuler berdasarkan sekuens DNA ribosomal pada daerah ITS-1 dan ITS-2, dilakukan ekstraksi DNA dan amplikasi PCR ITS rDNA yang baik untuk sekuensing. DNA kromosomal diisolasi menggunakan *kit Wizard Genomic Purification ex Promega Co* (Madison, USA) dari sel miselia berumur tiga hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA berhasil diisolasi dari miselia yang berumur tiga hari sebelum terbentuk spora dan jumlah yang cukup tinggi untuk PCR. DNA kromosomal fungi LBKURCC43 memiliki BM (berat molekul) 10.294 pb. ITS rDNA berhasil diamplifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS4, suhu annealing untuk 44°C dan menghasilkan produk PCR dengan berat molekul 455 pb. Hasil analisis filogenetik daerah ITS-1, ITS-2 dan 5,8S rDNA dari genom fungi LBKURCC43 menunjukkan bahwa spesies dari fungi LBKURCC43 adalah *Hanseniaspora uvarum* dengan kemiripan identitas mencapai 97%.

**Kata Kunci:** Endofit, PCR, ITS, rDNA, *Hanseniaspora uvarum*

## 1. PENDAHULUAN

Mikrob endofit adalah mikrob yang seluruh atau sebagian hidupnya berada di dalam jaringan hidup tanaman inang tanpa menimbulkan gejala yang merugikan bagi tanaman inang itu sendiri. Mikrob seperti kapang, khamir dan bakteri dapat berasosiasi dengan tanaman membantu metabolisme tanaman inang dan menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi (Kumala *et al.*, 2006). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa endofit memberikan keuntungan bagi tanaman inangnya, seperti melindungi dari serangan serangga, patogen dan hewan herbivora (Ding *et al.*, 2011).

Tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) merupakan bunga berumbi yang digunakan sebagai tanaman hias atau bunga potong. Tanaman dahlia dapat digunakan sebagai obat-

obatan manusia karena memiliki potensi dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Ekstrak umbi dahlia diketahui mengandung senyawa fenolik, flavonoid, dan saponin yang memiliki aktivitas antimikroba *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus* (Suryadi, 2007).

Pada penelitian sebelumnya, telah diisolasi jamur endofit dari umbi dahlia berbunga ungu yang berasal dari Padang Panjang, Sumatera Barat diidentifikasi secara morfologi sebagai *Sporothrix sp.* LBKURCC43 (Lorenita, 2013). Subjek berhasil diisolasi dan ditentukan genusnya secara makroskopis dan mikroskopis. Untuk skirining aktivitas antimikroba dan uji fitokimia dari Fungi LBKURCC43 menunjukkan aktivitas antimikroba dengan media produksi Huang *et al.* (2007). LBKURCC 43 menunjukkan adanya aktivitas antibakteri

terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* setelah di inkubasi hingga hari ke-20 dan hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa Fungi LBKURCC43 positif mengandung saponin (Fitriyah, 2013). Senyawa saponin memiliki peran alami dalam tanaman sebagai pelindung terhadap patogen dan hama (Turk, 2005).

Identifikasi fungi LBKURCC43 telah dilakukan secara morfologi berupa warna, diameter koloni, dan pigmen koloni. Hal ini lebih tepat untuk identifikasi hingga tingkat genus, dan belum dapat memberikan kepastian untuk identifikasi pada tingkat spesies. Identifikasi morfologi tersebut belum memberikan kepastian spesies maupun hubungan kekerabatan dengan spesies. Oleh karena itu perlu dilakukan suatu cara identifikasi yang lebih tepat berdasarkan sekuens DNA ribosomal (rDNA) pada daerah ITS (Internal Transcribed Spacer) (Hutapea, 2007). Secara ekstensif metode ini digunakan untuk mengetahui basa-basa nukleotida informasi total genom dalam suatu sel atau organisme (Muslim, 2003). Daerah ITS tersebut harus diampifikasi terlebih dahulu sebelum dilakukan sekuens ITS rDNA untuk identifikasi spesies Fungi. Ada dua daerah ITS rDNA yang bersifat diagnostik yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies fungi, karena memiliki keragaman tinggi. Kedua daerah tersebut adalah ITS-1 dan ITS-2 (Druzhinina dkk., 2005). Verifikasi hasil pemeriksaan morfologi dan identifikasi fungi di tingkat spesies, dapat dilakukan dengan analisis filogenetika menggunakan sekuens ITS-1 dan ITS-2 gen DNA ribosomal (rDNA) lainnya. Dalam kebanyakan kasus, data sekuens dan hubungan filogenetika memungkinkan identifikasi pada tingkat spesies (Wiese dkk. 2011).

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA. Isolasi DNA diperlukan untuk mendapatkan DNA murni yang akan digunakan untuk amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi DNA menggunakan PCR di daerah ITS rDNA dari templat DNA kromosomal diperlukan untuk memudahkan penentuan sekuens DNA ITS tersebut. Hal ini disebabkan bila tidak dilakukan amplifikasi, maka sekuens DNA kromosomal lain akan mengganggu penentuan sekuens ITS rDNA. Daerah ITS rDNA hanya mencakup 0,0002% dari keseluruhan kromosom, jadi bila tidak dilakukan amplifikasi daerah DNA yang akan di sekuens, gangguan sekuens lain terlalu besar.

Penelitian ini akan dilakukan suatu identifikasi yang tepat berdasarkan sekuens DNA ribosomal pada daerah ITS (Internal Transcribed Spacer) yang dilengkapi dengan analisis filogenetik mengenai Fungi tersebut. Wiese dkk (2011) mengatakan bahwa untuk mengidentifikasi spesies Fungi dapat digunakan sekuens daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA-nya.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

Kultur fungi LBKURCC41 dari umbi dahlia berbunga kuning koleksi Laboratorium Biokimia-FMIPA, Universitas Riau yang diisolasi dari umbi *Dahlia variabilis* yang diambil di Padang Luar, Sumatera Barat. Media SDA (Sabouraud 4% dextro agar) keluaran Merck. Litikase keluaran SIGMA-Aldrich Chemical Co.St. Louis, USA(Nomor catalog L-2524), larutan Ethidium Bromide keluaran Bio-rad, 10 mg/ml (Nomor catalog 161-0433), Kit Wizard genomic Purification keluaran Promega, Madison, WI, USA (Nomor catalog A-1120), 1 Kb DNA Ladder keluaran Promega, Madison, WI, USA (Nomor catalog G-5711), sebagai standar DNA. Go Taq<sup>TM</sup> PCR Core system I keluaran Promega,USA (No. Kat. M7660), untuk reaksi amplifikasi DNA. Primer-primer ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, dan ITS5 produksi PT. Sentra Biosains Dinamika, Jakarta sesuai dengan sekuens yang dipublikasi oleh White dkk., (1990), Buffer tris-base, EDTA, CH<sub>3</sub>COOH, HCL, NaOH, bromphenol blue, dan Gel Agarosa.

Kultur fungi LBKURCC 41 dari umbi dahlia berbunga kuning, diremajakan pada media pertumbuhan. Isolasi DNA dilakukan dengan metode kit Wizard genomic yang menggunakan enzim litikase dan bahan-bahan dari Kit Wizard genomic DNA purification (Promega). Hasil ekstrasi DNA kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 0.8% dan pemisahan DNA tersebut difoto dengan menggunakan camera digital Sony Cyber-shot DSC- W610 14,1 megapixels. DNA yang berhasil diisolasi ditentukan berdasarkan pita DNA yang terlihat dan akan dijadikan templat pada amplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Untuk menentukan sekuens daerah ITS-1 dan ITS-2 digunakan primer ITS-4 dan ITS- 5, maka akan dicoba pasangan primer ITS lain yang cocok.

Kecocokan pasangan primer-primer ini dapat dilihat berdasarkan pita DNA yang terlihat pada UV transimulator setelah dielektroforosis dengan gel agarosa 1.2%. Fragmen PCR ini kemudian ditentukan urutan DNA-nya berdasarkan proses sekuensing dengan metode Sanger

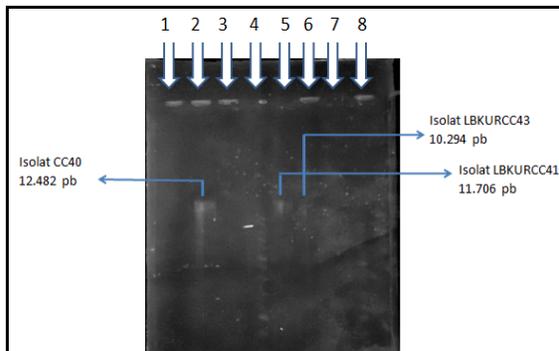
**3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

**a. Isolasi DNA**

Miselium yang terbaik untuk isolasi DNA LBKURCC40 adalah berumur 3 hari (Gambar 1). Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode *kit Wizard ex Promega Corp.* adanya pita DNA tunggal yang terlihat dengan bantuan sinar UV pada gel elektroforosis menunjukkan bahwa adanya pita DNA. Untuk miselium LBKURCC41 waktu yang terbaik untuk dilakukan isolasi DNA adalah berumur 3 hari. Adanya pita berflouresensi dengan ukuran kisaran 10.000 sampai 12.000 pb menandakan DNA LBKURCC41 telah berhasil diisolasi (Gambar 2).

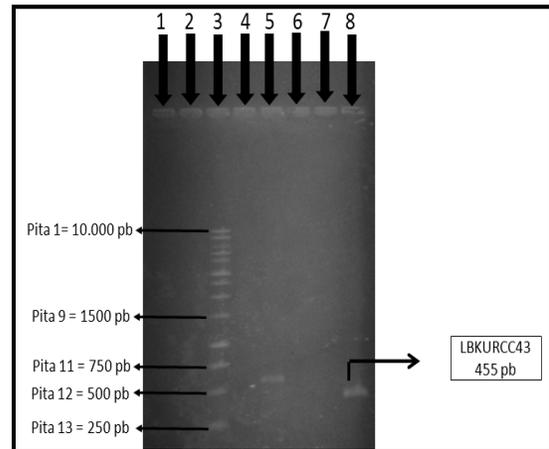


**Gambar. 1** Morfologi koloni isolat fungi endofit LBKURCC43 berumur 3 hari sebelum isolasi DNA.



**Gambar. 2** Hasil elektroforosis isolat DNA LBKURCC40 (jalur 2), LBKURCC41 (jalur 5), LBKURCC43 (jalur 6), dan Standar DNA ladder (jalur 4).

**b. Amplifikasi PCR**



**Gambar. 3** Foto hasil elektroforosis produk amplifikasi PCR DNA Jamur LBKURCC43 pada suhu *annealing* 44°C. Jalur 3: DNA *Ladder*, Jalur 5: DNA LBKURCC63, Jalur 8: Produk amplifikasi rDNA LBKURCC43 pita dengan ukuran 455 pb.

Gambar 3 menunjukkan hasil elektroforosis amplifikasi PCR dengan kombinasi ITS4 dan ITS 5 diperoleh berat molekul berdasarkan persamaan regresi linier diatas, Hasil amplifikasi PCR dielektroforosisi pada gel agarosa 1.2% dan diwarnai dengan Etidium Bromida agar berflouresensi di bawah sinar UV, hasil yang tampak pada gambar 2 (LBKURCC43). Sama halnya dengan penentuan berat molekul pada isolat, hasil amplifikasi PCR diperoleh dengan mengukur jarak migrasi standar. Persamaan regresi yang diperoleh untuk LBKURCC43 adalah  $y = -0,0351x + 4,762$ . Persamaan regresi ini yang akan digunakan dalam menentukan berat molekul sampel hasil PCR maka untuk berat molekul Untuk LBKURCC43 dengan jarak migrasi 59 mm adalah 455 pb.

**c. Pengurutan DNA Produk Amplifikasi PCR**

Identifikasi secara molekuler berdasarkan urutan DNA ribosomal pada daerah ITS (*Internal Transcribe Spacer*) merupakan salah satu usaha untuk mengidentifikasi dan membuka informasi genetik suatu Fungi. Setelah produk amplikasi PCR diperoleh, kemudian produk tersebut ditentukan urutan DNA-nya yaitu pada daerah ITS1 dan ITS2 rDNA menggunakan gabungan primer ITS4 dan ITS5. Penentuan urutan DNA Fungi LBKURCC41

dilakukan dengan menggunakan jasa sekuensing pada Lembaga Sekuensing Eijkman di Jakarta. Data yang diperoleh diverifikasi secara manual mengacu pada spektrogram, dengan membaca puncak-puncak.

Spektrogram hasil sekuensing memiliki 4 warna yaitu merah untuk Timin (T), warna biru untuk Cytosin (C), warna hitam untuk Guanin (G), dan warna hijau untuk Adenin (Lampiran 2). Setelah dilakukan pembacaan secara visual, kemudian hasil pengurutan dicocokkan secara manual dalam arah yang berlawanan dari kedua rantai DNA dengan tujuan verifikasi.

**Gambar. 4** Urutan DNA LBKURCC43 hasil verifikasi pada program Bioedit

Verifikasi untuk daerah ITS-1 rDNA dengan pasangan primer ITS5 dan ITS2, maka ITS5 menjadi forward dan ITS2 menjadi reverse. Pada daerah ITS-2 rDNA, ITS3 menjadi forward dan ITS4 menjadi reverse. Proses ini dilakukan pada ketiga sampel LBKURCC40, LBKURCC41, dan LBKURCC43. Untuk mempermudah proses verifikasi dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak (software) Bioedit. Data-data urutan DNA hasil pairwise alignment pada program Bioedit dapat dilihat masing-masing pada gambar 4.

>Urutan DNA LBKURCC-43 (5' – 3')

```

TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCTCATCGTAGGTGAACCCTGCGGAAGGATCATTAAACATAATATTCTTA
CACAGCTGTTTTTTACAACAAAACAAATCTATCTAAAAACAATTCTTACAAGAAATTCTTAAAACTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCG
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTGTTGAGCGAATACTCC
CTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTGCACGAAAATAATGACGACAGTACTTACAAAACGGTACCGTCAGTA
CACTCATTTTTTTCCTCAAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAATCTAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

```

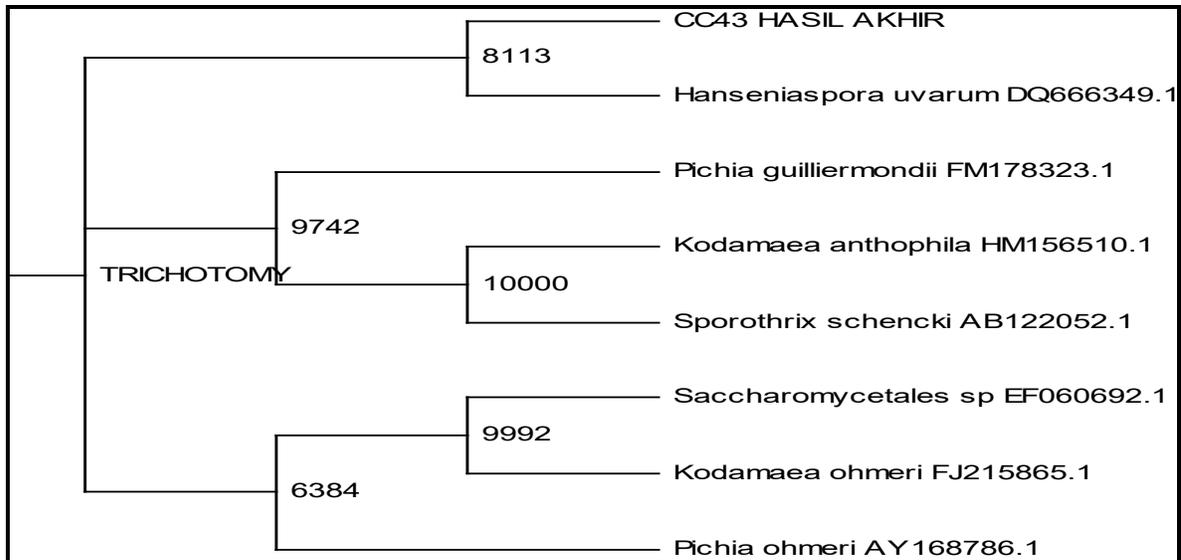
**d. Analisis filogenetik pada sekuens daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA**

Analisis sekuens daerah ITS-1 5,8S rDNA dan ITS-2 LBKURCC40 dibandingkan terhadap daerah yang sama yang dimiliki 7 galur *Saccharomyces*, dan kerabat dekat yang diakses pada data GenBank NCBI (tabel 1), pada

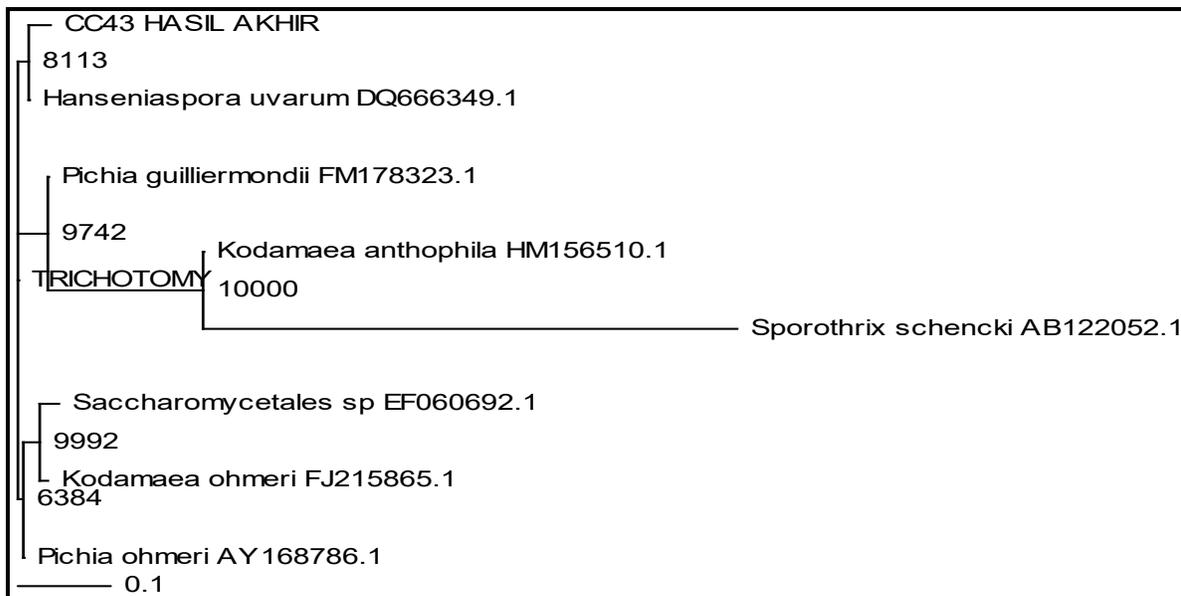
tanggal 29 Agustus 2014. Hasil penyejajaran dengan program Clustal X versi 2.09, generasi pohon *N.J Bootstrapping* ditampilkan software TreeView sebagai pohon dendrogram dan filogram tak berakar yang ditunjukkan di Gambar 4 dan Gambar 5.

**Tabel. 1** Nama spesies, kode akses dan referensi dari basis data Gen Bank NCBI yang digunakan untuk menentukan hubungan filogenetik terhadap jamur LBKURCC43.

Nama spesies	Kode Akses Gen Bank	Strain	Referensi	% Identitas hasil BLAST
<i>Kodamaea ohmeri</i>	FJ215865.1	-		99 %
<i>Pichia ohmeri</i>	AY168786.1	ST-3	Wang.,(2002)	99 %
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DQ666349.1	WZ1	Hiringthugoda dkk.,(2006)	97 %
<i>Pichia guillermondi</i>	FM178323.1	-	Serena, C.,(2009)	99%
<i>Kodamaea anthophila</i>	HM156510.1	CBS 8494	Groenewald dkk.,(2011)	96%
<i>Saccharomy cetales</i>	EF060692.1	LM378	Mahdi dkk.,(2008)	97 %



Gambar. 5 Dendogram Jamur LBKURCC43 dengan 7 galur terdekat berdasarkan sekuens daerah ITS-1 5,8S rDNA dan ITS-2.



Gambar. 6 Hubungan Filogenetik LBKURCC43 dengan 6 galur terdekat, berdasarkan sekuens DNA ITS-1, 5,8S rDNA dan ITS-2.

Gambar 5 jamur LBKURCC43 dibandingkan dengan 7. Dari gambar digolongkan 2 subkluster yaitu:

1. Subkluster A mencakup 2 galur yaitu *Hanseniaspora uvarum* dan jamur LBKURCC43.
2. Subkluster B mencakup *Kodamaea anthophila* dan *Sporothrix schencki*.
3. Subkluster C mencakup 2 galur yaitu *Saccharomyceteles sp* dan *Kodamaea ohmeri*.

Galur sub kluster A memiliki nenek moyang yang sama yaitu *Haseniaspora uvarum* dengan jamur LBKURCC43 sehingga boleh dikatakan memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan angka percabangan 8113. Persentase hasil BLAST pada akses database GenBank menunjukkan homologi yang tinggi antara LBKURCC43 dengan 5 galur yang lainnya adalah berkisar 96% sampai 99%. Hal ini disebabkan oleh kromatogram sekuens DNA pada daerah ITS-1 dan ITS-2 pada jamur

LBKURCC43 terbaca dengan menggunakan ITS5 (forward) maupun ITS4 (reverse). Sedangkan subkluster B merupakan kerabat dekat dari *Kodamaea anthophila* dan *Sporothrix schencki* serta subkluster C merupakan kerabat dekat dari *Saccharomyces sp* dan *Kodamaea ohmeri*.

Penyejajaran jamur LBKURCC43 pada ke-5 galur dengan tes Bootstrap N-J tree dilakukan pengulangan 10000 kali untuk menguji kebenaran percabangan dan pohon filogenetika. Angka percabangan antara jamur LBKURCC43 dengan *Hanseniaspora uvarum* sebesar 8113 pada subkluster B, artinya angka percabangannya berada di atas 50% (cukup tinggi). Jadi galur ini merupakan kerabat yang sangat dekat dan kedua sekuens DNA memiliki kesamaan namun strain berbeda.

Pada saat dilakukannya analisis BLAST menunjukkan kemiripan dengan kelompok khamir yaitu *Hanseniaspora uvarum*. Dimana jamur *Hanseniaspora uvarum* ini dikategorikan khamir dalam filum Ascomycota dan Basidiomycota. Beberapa khamir dilaporkan dapat menghambat patogen tanaman, khususnya patogen yang berada di dalam buah dan sayuran, serta beberapa produk komersial lainnya (Janisiewicz dan Korsten, 2002). Diketahui bahwa *Hanseniaspora uvarum* dapat digunakan untuk mengendalikan berbagai patogen penyebab pembusukan pada jeruk, buah pome, dan tomat (Chalutz & Wilson, 1990).

#### 4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian tentang analisis filogenetik dapat disimpulkan bahwa isolat DNA Fungi endofit LBKURCC43 memiliki 10.294 pb. Daerah rDNA yang mengandung ITS-1, 5.8S rDNA dan ITS-2 dari genom Fungi dapat diamplifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5. Hasil amplifikasi pasangan primer ini diperoleh untuk Fungi LBKURCC43 adalah 455 pb.

Hasil persentasi dengan BLAST pada database GenBank untuk Fungi LBKURCC41 menunjukkan bahwa sekuens DNA diidentifikasi sebagai Fungi *Saccharomyces sp*, yang memiliki kemiripan identifikasi 97%. Pada saat hasil penjejarian dengan ke-7 galur spesies terdekat menunjukkan adanya hubungan filogenetik antar spesies *Hanseniaspora uvarum*, hal ini juga diperlihatkan oleh angka

bootstrapping yang tinggi dengan 10000 kali pengulangan pada tiap percabangannya. Jadi dapat diprediksikan kemungkinan besar kerabat dekat pada masing-masing spesies.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Chalutz, E. and Wilson, C. L. 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis*, 74: 134-137.
- Ding, T., Jing, T., & Zhou, J. 2010. Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Journal Genetics and Molecular Research* 9 (4): 2104-2112
- Druzhinina, I. S., Monika, K.Z., Ismail, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G.J., and Kubicek, C. P. 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49 (2012) 358–368.
- Fitriyah, D. 2013. Penentuan Media Optimum Produksi Senyawa Antimikrob Dari Jamur Endofit Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). Tesis. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., & Sun, M. 2007. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae) main constituents and antioxidant activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:9:1253-1263.
- Janisiewicz, W. J., Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 40: 411-441.
- Kumala, S., Agustina, E., & Wahyudi, P. 2006. Uji aktivitas antimikrobial metabolit sekunder kapang endofit tanaman trengguli (*Cassia fistula* L). *Jurnal Bahan Alam Indonesia* ISSN. 2 (6):46-48.
- Lorenita, M. 2013., Haryani, Y., Puspita, F., Trihartomo, D., Sikumbang, S., 2013. Screening of endophytic fungi from tubers of *Dahlia variabilis*. *Journal of Agricultural Technology*. 9(3): 565-570.

- Muslim, C. 2003. Biologi Molekular Sel. UNIB Press. Bengkulu.
- Suryadi, A.E. 2007. Ekstraksi dan uji aktivitas antimikrob ekstrak umbi dahlia (Dahlia variabilis). Skripsi. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Turk, F.M. 2006. Saponins versus plant fungal pathogens. *Journal of Cell and Molecular Biology* 5:13-17.
- Weiese, J. Ohlendorf, B., Schmaljohann, R., Imhoff, J. S. Phylogenetic Identifacation of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and Identification of therr Secondary Metaboliter. *Marine Drugs*. 9: 516-585. Daya kecambah dan pertumbuhan *Mucuna bracteata* melalui pematihan dormansi dan pemberian zat pengatur tumbuh giberalin (GA3). *Jurnal Online Agroteknologi*. Vol.2, No.2; Hal 630-644.
- Sutopo,.L. 2002. Teknologi Benih. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijya. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Hartutiningsih dan Utami. 1999. Manipulasi KNO<sub>3</sub> dalam upaya meningkatkan perkecambahan biji palem merah (*Chrystotachys iakka Becc*). Prosiding Seminar Nasional Konservasi Flora Nusantara. Balai Pengembangan Kebun Raya. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Bogor
- Mugnisjah,.W.Q dan A. Setiawan. 1990. Produksi Benih. Bumi Aksara dan Pusat Antar Universitas. IPB. Bogor
- Sulaiman,.F dan Gozali,.K 2004. Pengaruh Pematihan dormansi terhadap perkecambahan benih dan pertumbuhan bibit keranji (*Dialium indum L.*) *Jurnal Tanaman Tropika* Vol 7 (2); Hal 78-84.