

IDENTIFIKASI PENANDA RAPD UNTUK PENENTUAN JENIS KELAMIN TANAMAN SALAK (*Salacca zalacca* GART. VOSS.)

Parjanto¹, Sukarti Moeljopawiro², Wayan T. Artama² dan Aziz Purwantoro²

INTISARI

Parjanto, S. Moeljopawiro, W.T. Artama, dan A. Purwantoro. 2006. Identifikasi penanda RAPD untuk penentuan jenis kelamin tanaman salak (*Salacca zalacca* GART. VOSS.) Berkala Ilmiah Biologi 5 (1) : 57 - 63.

Adanya penanda (*marker*) untuk penentuan jenis kelamin pada fase bibit (*vegetatif*) sangat diperlukan guna mendukung studi genetika dan kegiatan pemuliaan salak (*Salacca zalacca*). Tanaman salak bersifat berumah dua (*individu jantan dan betina terpisah*) dan mencapai umur reproduktif lambat (3-4 tahun). Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan penanda jenis kelamin secara molekular dengan teknik RAPD. DNA yang diekstraksi dari daun 5 tanaman salak jantan dan 5 salak betina (yang di tanam di Banguntapan, Yogyakarta) digunakan untuk analisis variasi susunan basa DNA tanaman salak jantan dan betina dengan teknik RAPD. Sebanyak 49 macam primer 10 mer (produksi Operon Technologies, California) digunakan untuk amplifikasi DNA salak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa satu primer, yaitu OPP-08 (dengan sekuen ACATCGCCCA), menghasilkan fragmen DNA 400 pb spesifik pada satu jenis kelamin. Pada tanaman jantan dihasilkan fragmen tersebut, sedangkan pada tanaman betina tidak dihasilkan. Diduga bahwa fragmen DNA 400 bp hasil amplifikasi dengan primer OPP-08 (OPP-08₄₀₀) terkait dengan gen-gen penentu kelamin tanaman salak. Penanda RAPD (OPP-08₄₀₀) tersebut dapat digunakan untuk penentuan jenis kelamin tanaman salak pada fase bibit (*vegetatif*).

Kata kunci: RAPD, penanda molekular, jenis kelamin, salak

ABSTRACT

Parjanto, S. Moeljopawiro, W.T. Artama, and A. Purwantoro. 2006. Identification of a RAPD marker to sex determination in salak (*Salacca zalacca* GART. VOSS.) Berkala Ilmiah Biologi 5 (1) : 57- 63.

Sex identification marker for young seedling of the salak (Salacca zalacca), which a dioecious mode (separate male and female individuals) and the late initial reproductive age (3-4 years), will be an essential tool for genetics and breeding program. The objective of this research was to find the molecular marker to sex determination of salak by RAPD technique. DNA extracted from 5 male and 5 female salak leafes (grown in Banguntapan, Yogyakarta) were used to distinguish the differences of male and female salak DNA by RAPD technique. Forty nine decamer oligonucleotide primers (from Operon Technologies, California) were used to perform DNA amplification. One primer (OPP-08, ACATCGCCCA) producing a 400 bp amplified band was specific for one sex, present only in the male and absent in the female. It was expected that this band (OPP-08₄₀₀) is linked to the gen(s) that control sex determination in salak. The RAPD marker (OPP-08₄₀₀) can be used for sex determination of young seedling salak.

Keywords: RAPD, molekular marker, sex, *Salacca zalacca*

PENDAHULUAN

Tanaman salak (*Salacca zalacca*), salah satu komoditas penting dalam pengembangan hortikultura di Indonesia, pada umumnya bersifat berumah dua. Satu individu tanaman hanya menghasilkan satu macam bunga (*gamet*), jantan atau betina. Tanaman yang seluruh bunganya

merupakan bunga betina disebut tanaman betina, sedangkan yang seluruh bunganya merupakan bunga jantan disebut tanaman jantan. Hasil panen berupa buah salak diperoleh dari tanaman betina, tetapi tanaman jantan tetap diperlukan sebagai penghasil serbuk sari. Tanaman betina yang menghasilkan buah ditanam jauh lebih banyak

¹ Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta

² Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

dibanding tanaman jantan. Jenis kelamin tanaman salak tidak dapat diketahui berdasarkan bentuk vegetatif. Pada tanaman salak asal biji, kelamin dapat diketahui setelah tanaman berbunga, yakni pada umur 3-4 tahun setelah tanam (Mogea, 1973; Tri-Harsono, 1994).

Adanya penanda (*marker*) untuk penentuan jenis kelamin pada fase bibit (fase vegetatif) sangat diperlukan dalam mendukung studi genetika dan kegiatan pemuliaan salak. Jenis kelamin dapat dipandang sebagai sifat penting pada tanaman salak karena nilai ekonomi tanaman ditentukan oleh jenis kelamin. Tanaman salak betina yang menghasilkan buah secara umum mempunyai nilai ekonomi lebih tinggi dibanding tanaman jantan. Pemuliaan salak seringkali lebih diarahkan kepada pembentukan klon-klon betina unggul. Bila jenis kelamin dapat diketahui sejak dini (fase bibit), maka pembentukan populasi dengan jenis kelamin tertentu (betina atau jantan) dapat dilakukan secara lebih efisien, khususnya terhadap populasi hasil perkembangbiakan seksual. Salah satu pendekatan untuk mendapatkan penanda jenis kelamin pada tanaman berumah dua adalah melalui analisis variasi DNA tanaman jantan dan betina dengan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). RAPD merupakan salah satu cara analisis polimorfisme DNA berdasarkan pada perbedaan pola pita DNA (fragmen DNA) yang dapat diamplifikasi melalui proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer acak (Williams *et al.*, 1990). Metode RAPD dapat digunakan untuk identifikasi penanda molekular (DNA) terkait (*linked*) dengan gen pengatur suatu sifat. Penanda RAPD untuk sifat ketahanan/kerentanan kelapa terhadap penyakit gugur buah yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* berhasil diidentifikasi dengan membandingkan polimorfisme DNA antara 5 pohon kelapa GSK (Genjah Salak) yang ekstrim tahan dengan 5 pohon kelapa GSK yang ekstrim rentan (Runtuuwu dkk., 1999). Yanger dan Kruger *cit.* Runtuuwu dkk. (1999) berhasil mengidentifikasi penanda RAPD untuk sifat ketahanan tanaman apel terhadap penyakit kudis, dengan membandingkan polimorfisme DNA tanaman apel yang tahan dengan DNA tanaman yang rentan. Teknologi RAPD mempunyai prospek yang baik untuk mengidentifikasi penanda DNA yang terkait dengan jenis kelamin tanaman, karena jenis kelamin merupakan sifat diskrit, yakni dapat dibedakan dengan tegas antara jantan dan betina.

Penanda RAPD terkait (*linked*) dengan penentuan jenis kelamin telah berhasil diidentifikasi pada beberapa jenis tanaman berumah dua. Mulcahy *et al.*, (1992) berhasil mengidentifikasi penanda RAPD untuk penentuan jenis kelamin tanaman *Silene latifolia*. Hormaza *et al.*, (1994) mendapatkan penanda RAPD berupa fragmen DNA berukuran 945 pb yang digandakan dengan primer OPO-08 (dengan sekuen CCTCCAGTGT) untuk membedakan tanaman *Pistacia vera* jantan dan betina. Polley *et al.*, (1997) juga telah berhasil mengidentifikasi beberapa penanda RAPD terkait dengan penentuan kelamin pada tanaman *Humulus lupulus*.

Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan penanda jenis kelamin tanaman salak secara molekular dengan teknik RAPD.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan tanaman

Tanaman salak (*S. zalacca*) berkelamin jantan dan betina yang berasal dari suatu populasi tanaman campuran (*bulk population*) digunakan untuk analisis variasi DNA dengan teknik RAPD. Populasi tanaman tersebut merupakan koleksi pribadi Ir. Nandariah, MS. yang ditanam di Banguntapan, Yogyakarta. Tanaman-tanaman tersebut berasal dari biji (*seedling*) yang diperoleh dari hasil persilangan antara tetua betina *S. zalacca* cv. pondoh (klonal) dengan beberapa kultivar tetua jantan (komunikasi pribadi dengan Ir. Nandariah, M.S.). Pada penelitian ini digunakan 5 tanaman contoh untuk masing-masing jenis kelamin (5 tanaman jantan dan 5 tanaman betina).

Ekstraksi dan purifikasi DNA

DNA total masing-masing individu tanaman contoh, yakni 5 tanaman jantan dan 5 tanaman betina, diekstraksi secara terpisah. DNA diekstraksi dari daun segar dengan metode CTAB (Murray and Thomson, 1980) yang telah dimodifikasi (Shiraishi & Watanabe, 1995). Sebanyak 100-150 mg daun digerus dalam lumpang porselin yang telah diberi *buffer* CTAB (terdiri atas 1M Tris HCl pH 9,0; 5 M NaCl; 0,5 M EDTA; 10% CTAB; b-mercaptoethanol; dan H₂O murni), kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 65 °C. Setelah inkubasi, kedalam larutan tersebut ditambahkan 800 ml chloroform isoamilalkohol (24:1) dan dicampur dengan dikocok selama 20 menit. Larutan tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm

selama 10 menit. Larutan lapisan atas (*supernatan*) diambil dan dipindahkan ke tabung baru, ditambahkan 20 ml sodium asetat dan 650 ml isopropanol dingin, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit untuk memperoleh endapan (*pelet*) DNA. Pelet dicuci dengan menambahkan 1 ml etanol 70 %. Selanjutnya etanol dihilangkan dengan menyedot cairan tersebut kemudian dikeringkan dengan *vacum* selama 3 menit. DNA kemudian dilarutkan dalam 300 ml H₂O destilasi dan disimpan dalam lemari es pada suhu 4 °C.

Purifikasi DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *GeneClean III kit* (Q-biogene). Kuantitas dan kemurnian DNA diukur dengan alat *GeneQuant* (Pharmacia) pada panjang gelombang 260, 280, dan 320 nm. Kemurnian DNA dapat diketahui berdasarkan rasio penyerapan cahaya atau *optical density* (OD) pada 1260 dan 1280.

Amplifikasi DNA dan elektroforesis

Amplifikasi DNA dilakukan dengan reaksi PCR pada total volume 10 ml untuk setiap tabung PCR. Setiap reaksi PCR berisi 1 ml 10x *Stoffel buffer* (10 mM Tris-HCl pH 8,3 dan 1,0 mM KCl), 0,05 unit *Taq DNA polimerase* *Stoffel fragment* (Applied BioSystem), 3,0 mM Mg Cl₂, 200 mM dNTP, 0,25 mM primer, dan 12,5 ng DNA sampel. Amplifikasi DNA dilakukan dengan alat *GeneAmp PCR system 9600* (Perkin Elmer). Pemanasan pertama pada suhu 94 °C selama 1 menit, kemudian diikuti 45 siklus dengan suhu dan waktu pada setiap siklus adalah 95 °C selama 30 detik, 37 °C selama 30 detik, dan 72 °C selama 90 detik. Setelah 45 siklus selesai kemudian diikuti dengan pemanasan pada suhu 72 °C selama 8 menit.

Tahap pertama, amplifikasi dilakukan menggunakan 4 sampel DNA, yakni 2 jantan dan 2 betina, dengan tujuan menyeleksi primer yang potensial menghasilkan fragment DNA spesifik pada satu jenis kelamin. Amplifikasi tahap pertama menggunakan 49 primer 10 mer yang diproduksi oleh Operon Technologies (Alameda, California). Selanjutnya, primer terpilih digunakan untuk amplifikasi tahap kedua dengan menggunakan 10 sampel DNA, yakni 5 jantan dan 5 betina.

Hasil reaksi PCR divisualisasi melalui elektroforesis pada gel agarose 1,5 % (b/v) dalam buffer TBE 1x dan dialirkan pada tegangan listrik 120 V selama 2 jam. Pemeriksaan produk PCR

dilakukan dengan pengecatan menggunakan etidium bromida dan pemotretan dengan *Fotodyne Image Analyser*.

Analisis polimorfisme DNA

Hasil visualisasi elektroforesis digunakan untuk mengidentifikasi pita-pita (fragmen DNA) spesifik pada satu jenis kelamin. Pita spesifik tersebut adalah pita yang ada pada satu jenis kelamin dan tidak ada pada jenis kelamin yang lain. Jumlah pasangan basa fragmen-fragmen DNA hasil amplifikasi dapat diketahui berdasar jarak migrasi DNA marker 100 bp (*Amresco*).

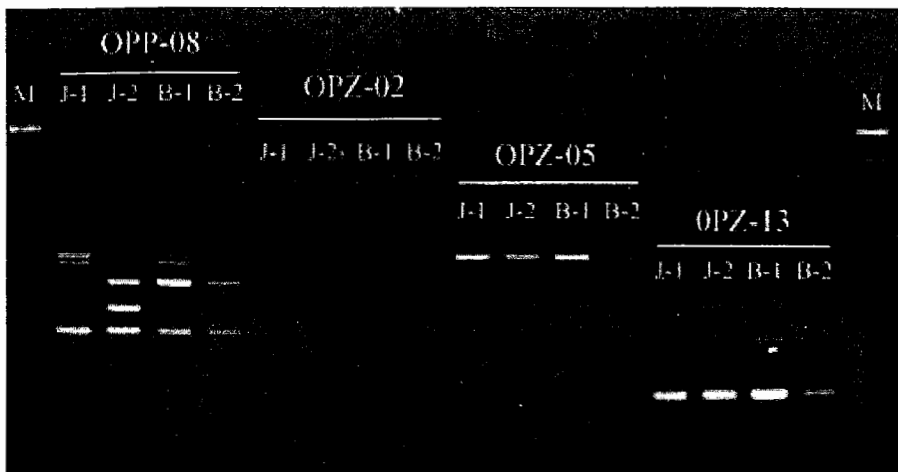
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi pada 4 sampel DNA tanaman salak (2 tanaman jantan dan 2 tanaman betina) menunjukkan bahwa, dari 49 primer acak 10 mer yang digunakan dalam penelitian ini, 48 primer dapat menghasilkan sejumlah fragmen DNA yang tampak sebagai pita/fragmen DNA pada gel agarose. Pada Gambar 1. terlihat hasil amplifikasi dengan beberapa primer (tidak semua gambar hasil amplifikasi dicantumkan dalam laporan ini).

Terlihat pada Gambar 1., amplifikasi dengan primer OPZ-02 tidak menghasilkan pita DNA. Tidak dihasilkannya pita DNA ini kemungkinan disebabkan oleh tidak adanya sekuen komplementer pada DNA genom atau hanya terdapat satu untai (*strand*) yang mengandung sekuen komplementer dengan primer tersebut. Williams *et al.* (1990) mengemukakan bahwa salah satu syarat utama untuk terjadinya amplifikasi DNA dengan satu primer acak adalah apabila primer tersebut mempunyai urutan basa nukleotida yang komplementer dengan kedua untai DNA genom (sebagai DNA cetakan) pada posisi yang berlawanan.

Kemungkinan lain, amplifikasi DNA tidak terjadi apabila komplemen urutan basa nukleotida DNA cetakan terdapat pada jarak yang jauh. Amplifikasi DNA dengan PCR akan terjadi jika komplemen basa primer dengan urutan basa DNA cetakan jaraknya tidak melebihi 5000 pb (Yu *et al., cit.* Nurhaimi-Haris & Darussmin, 1997).

Berdasarkan hasil amplifikasi tahap pertama ini (4 sampel DNA, 2 tanaman jantan dan 2 tanaman betina), teridentifikasi ada 39 primer yang dapat menghasilkan pita (fragmen) DNA polimorfik (Tabel 1.). Metode RAPD mendeteksi polimorfisme urutan nukleotida berdasarkan polimorfisme pita



Gambar 1. Pola pita RAPD tanaman salak (*S. zalacca*) jantan (J1-J2) dan betina (B1-B2) menggunakan primer beberapa primer acak 10 mer. M = penanda DNA 100 pb. Tanda panah menunjukkan fragmen DNA 400 bp hasil amplifikasi dengan OPP-08 (OPP-08₄₀₀) spesifik pada tanaman jantan

DNA hasil amplifikasi PCR. Pada analisis RAPD, pita DNA yang selalu ada pada semua individu (genotipe) yang diuji disebut pita monomorfik, sedangkan pita DNA yang tidak selalu ada pada semua individu (genotipe) disebut pita polimorfik. Terlihat pada Tabel 1., pita polimorfik yang dihasilkan setiap primer berkisar antara 1 – 7 pita.

Adanya pita polimorfik tersebut menunjukkan bahwa terdapat keragaman DNA antar tanaman sampel yang digunakan. Tanaman sampel yang digunakan pada analisis RAPD ini, baik tanaman jantan ataupun betina, adalah tanaman asal biji (hasil perbanyakan seksual), sehingga secara genetik tanaman-tanaman tersebut beragam.

Amplifikasi tahap pertama bertujuan untuk menyeleksi primer yang dapat menghasilkan pita spesifik pada satu jenis kelamin. Dari 49 primer acak 10 mer (produksi Operon Technologies) yang digunakan, terdapat satu primer (OPP-08, dengan sekuen ACATCGCCCA) menghasilkan fragmen DNA spesifik pada satu jenis kelamin. Terlihat pada Gambar 1. bahwa amplifikasi menggunakan primer OPP-08 menghasilkan pita (fragmen) DNA berukuran 400 bp pada tanaman jantan, sedangkan pada tanaman betina tidak dihasilkan pita tersebut. Dengan demikian dapat dikemukakan bahwa ada kemungkinan pita tersebut (fragmen 400 bp hasil amplifikasi dengan OPP-08) berkaitan (*linked*) dengan gen (gen-gen) pengatur jenis kelamin pada tanaman salak berumah dua.

Untuk memastikan bahwa pita/fragmen 400 bp hasil amplifikasi dengan OPP-08 berkaitan

dengan gen (sekelompok gen) pengatur jenis kelamin pada tanaman salak berumah dua, dilakukan amplifikasi tahap kedua, yakni amplifikasi dengan primer OPP-08 pada 5 tanaman salak jantan dan 5 salak betina. Terlihat pada Gambar 2., didapat hasil yang konsisten bahwa amplifikasi menggunakan primer OPP-08 menghasilkan pita (fragmen) DNA berukuran 400 bp pada semua tanaman jantan, sedangkan pada semua tanaman betina tidak dihasilkan pita tersebut.

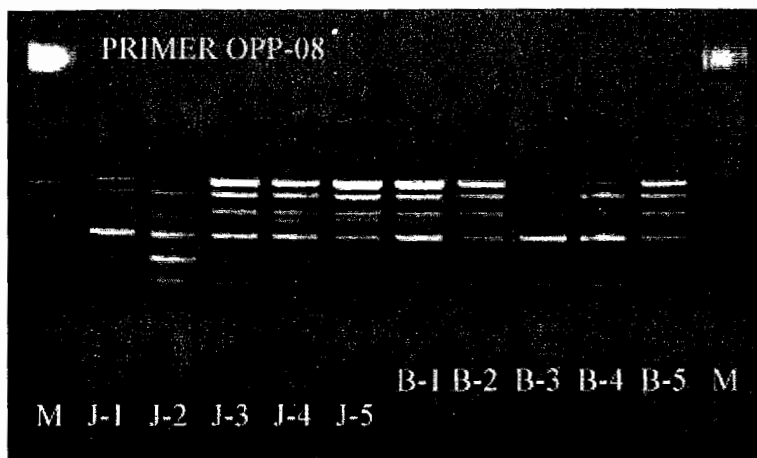
Konsistensi keberadaan pita (fragmen) DNA berukuran 400 bp spesifik pada tanaman jantan tersebut juga terlihat pada hasil amplifikasi (reaksi PCR) ulangan yang dilakukan dengan menggunakan primer OPP-08 (Gambar 3.).

Berdasar hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa fragmen DNA 400 bp hasil amplifikasi dengan OPP-08 berkaitan dengan gen (sekelompok gen) pengatur jenis kelamin pada tanaman salak berumah dua, khususnya kultivar Pondoh. Dengan demikian penanda RAPD (OPP-08₄₀₀) dapat digunakan sebagai penanda untuk penentuan jenis kelamin tanaman salak

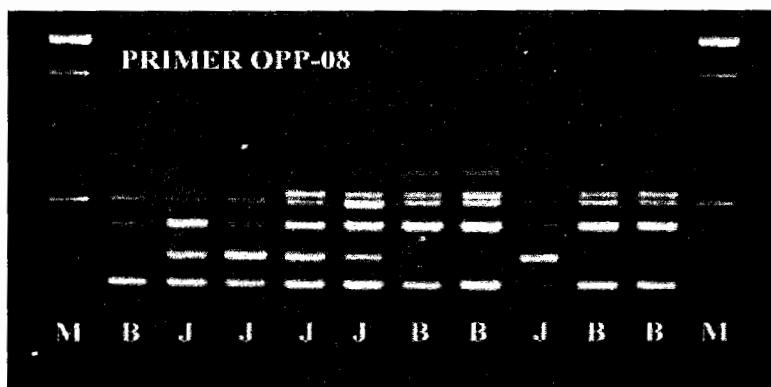
Didapatkannya penanda RAPD terkait dengan kelamin tanaman salak tersebut memungkinkan dilakukan penentuan jenis kelamin tanaman salak pada fase vegetatif (bibit). Sejauh pustaka yang ada, belum pernah dilaporkan adanya penanda molekular untuk membedakan tanaman salak jantan dan betina. Penanda RAPD merupakan penanda genetik (DNA) yang keberadaannya tidak tergantung oleh lingkungan dan fase

Tabel 1. Primer 10 mer (produksi Operon Technologies) yang digunakan dan jumlah pola pita polimorfik yang dihasilkan pada salak (*S. zalacca*)

NO	PRIMER	URUTAN BASA (5'-3')	JUMLAH PITA
1	OPA-03	AGTCAGCCAC	1
2	OPA-04	AATCGGGCTG	0
3	OPA-06	GGTCCCTGAC	6
4	OPA-11	CAATCGCCGT	1
5	OPA-15	TTCCGAACCC	1
6	OPA-16	AGCCAGCGAA	3
7	OPA-17	GACCGCTTGT	5
8	OPA-18	CCAAGCTTCC	0
9	OPA-19	CAAACGTCGG	4
10	OPA-20	GTTGCGATCC	1
11	OPE-11	GAGTCTCAGG	4
12	OPG-02	GGCACTGAGG	0
13	OPG-03	GAGCCCTCCA	1
14	OPG-04	AGCGTGTCTG	2
15	OPG-06	GGGAATTCGG	4
16	OPG-07	CCGATATCCC	1
17	OPG-08	GGGATATCGG	0
18	OPG-09	CCAAGCTTCC	1
19	OPG-10	GGAAAGCTTGG	0
20	OPG-11	TGCCCGTTCGT	0
21	OPG-13	CTCTCCGCCA	1
22	OPJ-09	TGAGCCTCAC	1
23	OPK-01	CATTCGAGCC	5
24	OPK-02	GTCTCCGCAA	5
25	OPK-03	CCAGCTTAGG	3
26	OPK-04	CCGCCCAAAC	0
27	OPK-05	TCTGTCGAGG	0
28	OPK-06	CACCTTTCCC	2
29	OPK-08	GAACACTGGG	1
30	OPK-09	CCCTACCGAC	2
31	OPK-10	GTGCAACGTG	0
32	OPK-12	TGGCCCTCAC	2
33	OPK-14	CCCCTACAC	2
34	OPK-15	CTCCTGCCAA	3
35	OPP-08	ACATCGCCCA	2
36	OPP-13	GGAGTGCTC	4
37	OPS-15	CAGTTCACGG	2
38	OPZ-01	TCTGTGCCAC	1
39	OPZ-02	CCTACGGGGA	1
40	OPZ-04	AGGCTGTGCT	3
41	OPZ-05	TCCCATGCTG	0
42	OPZ-06	GTGCCGTTCA	1
43	OPZ-07	CCAGGAGGAC	1
44	OPZ-08	GGGTGGGTAA	7
45	OPZ-09	CACCCAGTC	4
46	OPZ-10	CCGACAAACC	6
47	OPZ-11	CTCAGTCGCA	1
48	OPZ-12	TCAAACGGGAC	2
49	OPZ-13	GACTAAGCCC	1



Gambar 2. Pola pita RAPD tanaman salak (*S. zalacca*) jantan (J1-J5) dan betina (B1-B5) menggunakan primer OPP-08. M = penanda DNA 100 pb. Tanda panah menunjukkan fragmen DNA 400 bp hasil amplifikasi dengan OPP-08 (OPP-08₄₀₀) spesifik pada tanama jantan



Gambar 3. Penanda RAPD (400 bp) spesifik pada tanaman salak (*S. zalacca*) jantan hasil amplifikasi dengan primer OPP-08 (OPP-08₄₀₀). B = tanaman betina, J = tanaman jantan, M = marker 100 bp.

pertumbuhan tanaman, sehingga dapat digunakan untuk penentuan jenis kelamin tanaman salak pada fase vegetatif (bibit).

Penanda RAPD terkait dengan jenis kelamin tersebut bermanfaat untuk menunjang kegiatan studi genetika dan pemuliaan tanaman salak. Apabila jenis kelamin dapat diketahui sejak dini (fase bibit), maka pembentukan populasi dengan jenis kelamin tertentu (betina atau jantan) dapat dilakukan secara lebih efisien, khususnya terhadap populasi bervariasi hasil perkembangbiakan (rekombinasi) seksual.

Penggunaan penanda RAPD untuk penentuan jenis kelamin mempunyai beberapa keunggulan dibanding penanda molekular lainnya, misalnya penanda RFLP. Teknik RAPD pelaksanaannya lebih mudah, biaya per unit data lebih murah, jumlah DNA sampel yang dibutuhkan sedikit, dan tingkat polimorfisme yang didapatkan lebih tinggi (Demeke & Adams, 1994; Grattapaglia *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1990).

KESIMPULAN

Amplifikasi DNA genom tanaman salak dengan primer acak 10 mer OPP-08 (ACATCGCCCA) menghasilkan fragmen DNA berukuran 400 bp yang bersifat spesifik pada satu jenis kelamin. Pada salak jantan dihasilkan fragmen tersebut, sedangkan pada betina tidak dihasilkan. Diduga bahwa fragmen DNA 400 bp hasil amplifikasi dengan primer OPP-08 terkait dengan gen-gen penentu kelamin tanaman salak. Penanda RAPD berupa fragmen DNA 400 bp hasil amplifikasi dengan primer OPP-08 (OPP-08₄₀₀) dapat digunakan sebagai penanda jenis kelamin untuk membedakan tanaman salak jantan dan betina pada fase bibit (vegetatif), khususnya pada tanaman salak asal biji (*seedling*).

PUSTAKA ACUAN

- Demeke, T. and R.P. Adam. 1994. The Use of PCR-RAPD Analysis in Plant Taxonomy and Evaluation. In : Griffin and Griffin (Editors) *PCR Teknologi Current Innovations*. CRC Press, Tokyo. p. 179 - 192.
- Grattapaglia, D., J. Chaparro, P. Wilcox, S. McCord, D. Werner, H. Amerson, S. McKeand, F. Bridgwater, R. Whetten, D. O'Malley and R. Sederoff. 1992. *Mapping in Woody Plants with RAPD Markers: Application to Breeding in Forestry and Horticulture*. In : *Proceeding of the Symposium Application of RAPD Technology to Plant Breeding*. American Genetic Assoc. Minnesota. p. 37 - 40.
- Hormaza, J. I. , L. Dollo, and V. S. Polito. 1994. Identification of A RAPD Marker Linked to Sex Determination in *Pistacia vera* using Bulk Segregant Analysis. *Theor. Appl. Genet.* 89: 9-13.
- Mogea, J. P. 1973. *Beberapa Aspek Fenologi Salacca edulis Reinwardt*. Thesis Sarjana. Departemen Biologi ITB, Bandung. 67 h.
- Mulcahy, D.L., N.F. Weeden, and S.B. Carroll. 1992. DNA Probe for The Y-Chromosome of *Silene latifolia*, A Dioecious Angiosperm. *Sex Plant Reprod* 5: 86 - 88.
- Murray, M.G., and W.F. Thompson. 1980. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA. *Nuc. Acid. Res.* 8(19): 4321 - 4325.
- Nurhaimi-Haris and A. Darussmin. 1997. RAPD Analysis of Oil Palm Clones with Normal and Abnormal Fruits. *Menara Perkebunan* 65 (2): 64 - 74.
- Polley, A., E. Seigner, dan M.W. Ganal. 1997. Identification of Sex in Hop (*Humulus lupulus*) using Molecular Markers. *Genome* 40 (3): 357 - 361.
- Runtunuwu, S. D., A. Hartana, dan Suharsono. 1999. *Penanda RAPD untuk Penyakit Phytophthora Gugur Buah Pada Kelapa*. Prosiding Seminar Hasil-hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat, 16 September 1999. PAU Ilmu Hayat IPB, Bogor. 126 - 131.
- Sharaishi, S., and A. Watanabe. 1995. Identification of Chloroplast Genome between *Pinus densiflora* SIEB, et ZUCC. and *P. thunbergii* PARL. based on Polimorphism in *rbcl* gene. *J. Jpn. For. Soc.* 77: 429 - 436.
- Tri-Harsono. 1994. *Studi Taksonomi Kultivar Salak (Salacca zalacca var. zalacca)*. Tesis S2. Program Pasca Sarjana IPB, Bogor. 56 h.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531 - 6535.