

PEMANFAATAN TEKNIK RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) UNTUK PENGELOMPOKAN SECARA GENETIK PLASMA NUTFAH JAMBU METE (*Anacardium occidentale* L.)

Enny Randriani, Cici Tresniawati dan Syafaruddin

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
Jalan Raya Pakuwon km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357
balittri@gmail.com

(Diajukan tanggal 25 Nopember 2011, diterima tanggal 15 Februari 2012)

ABSTRAK

Budidaya jambu mete di Indonesia selama ini belum menggunakan varietas unggul sehingga mengakibatkan rendahnya produksi, yaitu sekitar 493 kg/ha/tahun. Peningkatan genetik terkendala oleh kurangnya informasi tentang variabilitas genetik jambu mete. Dalam merakit suatu varietas unggul diperlukan variabilitas genetik yang luas dari plasma nutfah yang tersedia. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui tingkat kekerabatan dan keragaman genetik koleksi plasma nutfah jambu mete berdasarkan profil pita DNA menggunakan teknik RAPD. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, Bogor mulai bulan Mei-November 2010. Materi genetik yang digunakan adalah JN26, Oniki1, Oniki2, Oniki3, Kodi4, NDR31, Nigeria P9, Nigeria P2, JN7, Srilanka, Mojokerto, Pamotan, Karimun, Larantuka, BO2, SM9, JT21 dengan menggunakan 25 primer. Adapun kegiatannya meliputi pengumpulan materi koleksi plasma nutfah jambu mete (17 akses). Dilanjutkan kegiatan di Laboratorium dengan tahapan-tahapan kegiatan, seperti ekstraksi dan purifikasi DNA, *loading* dan *running* produk PCR dan analisis RAPD serta analisis data. Hasil penelitian menunjukkan dari dua puluh lima primer PCR-RAPD yang digunakan untuk mengamplifikasi sebanyak 17 sampel jambu mete, terdapat 24 primer yang memberikan pita DNA, 21 di antaranya polimorfisme dan tiga primer menunjukkan monomorfis. Hasil analisis kekerabatan 17 sampel jambu mete dengan program NTSys 2.1 menunjukkan bahwa terdapat variasi genetik yang cukup tinggi. Pada koefisien 88%, 17 jambu mete tersebut mengelompok menjadi lima, kelompok yang pertama terdiri dari delapan individu (Oniki1, Kodi4, JN26, NDR31, Srilanka, Mojokerto, Karimun, dan JT21), kelompok dua terdiri dari lima individu (Nigeria P9, B02, Nigeria P2, JN7, Pamotan), kelompok tiga terdiri dari dua individu (SM9, dan Larantuka), kelompok empat terdiri dari satu individu (Oniki3), dan kelompok lima terdiri dari satu individu (Oniki2).

Kata Kunci : Jambu mete, variabilitas genetik, varietas unggul, RAPD

ABSTRACT

*Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique on grouping cashew (*Anacardium occidentale* L.) germplasm. Many cashew plantations in Indonesia do not use superior variety. As a result, national cashew production is only 493 kg/ha/year. Genetic improvement is limited by the lack of information of genetic variability of germplasm. Wide genetic variability in cashew germplasms is necessary to produce superior variety. The purpose of this study was to evaluate the genetic variation and relationship of among cashew germplasms based on band pattern of DNA by using RAPD technique. The experiment was conducted at Molecular Biology Laboratory of BB-Biogen, Bogor since May till November 2009. Genetic materials used were JN26, Oniki1, Oniki2, Oniki3, Kodi4, NDR31, Nigeria P9, Nigeria P2, JN7, Srilanka, Mojokerto, Pamotan, Karimun, Larantuka, BO2, SM9, and JT21 by using 25 primers. The activity consisted of collecting of cashew germplasm (17 accessions), followed with laboratory activities such as: DNA extraction and purification, loading and running of PCR product, RAPD and data analysis. Results shows that 25 primers used were 24 primers shown DNA band pattern 21 of which there are polymorphism and 3 the monomorphism. Germplasm collection of cashew has wide variation. At 88% coefficient, 17 accessions of cashew were divided into five clusters. The first cluster consisted of 8 individuals (Oniki 1, Kodi4, JN26, NDR31, Srilanka, Mojokerto, Karimun, dan JT 21), the second cluster of five individuals (Nigeria P9, B02, Nigeria P2, JN7, Pamotan), third cluster two individuals (SM9 and Larantuka), the fourth cluster of one individual (Oniki3) and the fifth cluster consisted of one individual (Oniki2).*

Keywords : Cashew, genetic variability, superior variety, RAPD

PENDAHULUAN

Jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) adalah salah satu tanaman tropis yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan termasuk ke dalam family Anacardiaceae. Selain gelondong, produk jambu mete yang mempunyai nilai ekonomi diantaranya adalah CNSL yang diekstrak dari kulit gelondong dan untuk keperluan industri (minyak rem), buah semu untuk buah segar, bahan sirup atau selai dan pakan ternak, kulit batang untuk obat diare, dan daun pucuk untuk lalap.

Budidaya jambu mete di Indonesia selama ini belum menggunakan varietas unggul sehingga mengakibatkan rendahnya produksi yaitu sekitar 493 kg/ha/tahun (Ditjenbun, 2010). Jika dibandingkan dengan negara lain seperti India, hasil per hektar 800-1000 kg (Rao, 1998) dan Vietnam 700 kg (Chau, 1998), posisi Indonesia jauh tertinggal. Banyak faktor yang mempengaruhi rendahnya produksi jambu mete di antaranya adalah bahan tanaman yang digunakan asal (tidak unggul), kurangnya perawatan tanaman, serta adanya gangguan hama dan penyakit. Hal yang sama juga dialami India yang sampai tahun 1980 produktivitasnya hanya 600 kg/ha, dengan penggunaan bahan tanaman unggul dan penerapan teknologi budidaya yang memadai produktivitasnya meningkat menjadi 1.112 kg/ha (Rao, 1998).

Mengetahui keragaman genetik jambu mete merupakan prioritas utama yang perlu dilakukan, sebagai landasan dasar dalam program pemuliaan tanaman. Dengan demikian, plasma nutfah jambu mete dapat dimanfaatkan secara optimal. Saat ini di KP. Cikampek terdapat 178 aksesi koleksi plasma nutfah jambu mete dan varietas yang sudah dilepas di antaranya GG1, PK36, MR851, BO2 dan SM9.

Salah satu pendekatan untuk mengetahui keragaman genetik dan hubungan kekerabatan serta mendeteksi pohon induk yang berproduksi tinggi adalah menggunakan *Random Amplification Polymorphic DNA* (RAPD). RAPD merupakan marka molekuler yang lebih cepat, lebih murah, dan lebih mudah dibandingkan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan *Random Fragment Length Polymorphism* (RFLP), dalam mempelajari keragaman genetik, hubungan kekerabatan antar genotipe, dan identifikasi varietas. Marka DNA hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai

indikator seleksi tanpa dipengaruhi lingkungan, juga dapat digunakan mengidentifikasi aksesi-aksesi jambu mete koleksi plasma nutfah baik itu hasil persilangan atau yang berasal dari daerah lain tanpa menunggu tanaman tersebut berproduksi. Di samping itu, terhadap materi-materi genetik hasil persilangan perlu dilakukan evaluasi dalam upaya penemuan varietas unggul produksi tinggi. Teknik RAPD telah banyak diaplikasikan dalam kegiatan pemuliaan tanaman antara lain untuk analisis keragaman plasma nutfah tanaman jambu mete (Samal *et al.*, 2003), gambir (Fauza *et al.*, 2007), jeruk (Karsinah *et al.*, 2002), dan kakao (Ronning *et al.*, 1995).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen, Bogor mulai bulan Mei-Nopember 2010. Materi genetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah 17 aksesi/varietas koleksi plasma nutfah jambu mete (JN26, Oniki1, Oniki2, Oniki3, Kodi4, NDR31, Nigeria P9, Nigeria P2, JN7, Srilanka, Mojokerto, Pamotan, Karimun, Larantuka, BO2, SM9, dan JT21) dengan menggunakan 25 primer.

Lingkup kegiatan penelitian ini dimulai dari pengumpulan semua koleksi plasma nutfah jambu mete (17 aksesi/varietas). Dilanjutkan dengan kegiatan di Laboratorium dengan tahapan kegiatan seperti:

Ekstraksi dan Purifikasi DNA

DNA diekstraksi dari daun muda (0,3 g) untuk setiap aksesi plasma nutfah jambu mete menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang dimodifikasi dengan penambahan antioksidan *polyvinilpyrrolidone* (PVPP) dan *mercaptoethanol* dicampurkan pada saat penggerusan dengan menggunakan mortar steril, gerusan daun dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 2 ml, kemudian ditambah buffer ekstraksi CTAB sebanyak 400 µl, vortex selama 2-3 menit, disentrifuge sebentar. Selanjtnya diinkubasi dalam air hangat (± 60 °C) selama 10 menit. Untuk purifikasi DNA dilakukan dengan menambahkan 300 µl campuran chloroform:isoamilalkohol (24:1). Vortex sampai rata, disentrifuge dengan kecepatan 15000 rpm pada suhu 25 °C selama 10 menit, supernatan dipindahkan ke dalam tabung

eppendorf yang baru menggunakan pipet, kemudian ditambahkan Isopropanol 300 µl dan digoyang perlahan sampai rata. Selanjutnya disentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 15000 rpm pada temperatur 4 °C. Supernatan dibuang, endapan DNA dicuci dengan 70% etanol sebanyak dua kali, disentrifuge selama 5 menit pada kecepatan 15000 rpm dengan suhu 4 °C, cairan etanol dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan, kemudian dilarutkan dalam 50 µL bufer TE (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 7,5) diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam dan ditambah 1 µL RNase A (10 mg/mL). DNA disimpan dalam refrigerator sampai siap digunakan.

Loading dan Running Produk PCR dan Analisis RAPD

PCR dibuat dengan volume 20 µL yang mengandung 50 ng DNA dari setiap aksesori, 10 pmoles primer DNA (0,4 µM), 10 nM setiap dNTP, 1 U *Taq* polimerase (Promega) dan 2,5 µL *Taq* polimerase 10x bufer Promega (500 mM KCL, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9,0). Primer dekamer dari *Operon Technologies* (Alameda, CA) digunakan dalam percobaan ini. Campuran reaksi PCR contoh dalam tabung eppendorf selanjutnya dilapisi dengan 1 tetes minyak mineral. Reaksi amplifikasi DNA dilakukan menggunakan *ThermoLyne II Thermal Cycler*, dengan kondisi PCR sebagai berikut: satu siklus 3 menit pada suhu 94 °C, dan diikuti dengan 45 siklus selama 1 menit pada suhu 94 °C (denaturasi), 1 menit pada suhu 37 °C (*annealing*), 2 menit pada suhu 72 °C (ekstensi). Seluruh produk amplifikasi DNA dilengkapi dengan ekstensi selama 1 menit pada suhu 72 °C. Setelah amplifikasi, produknya kemudian dielektroforesis pada konsentrasi agarose 1,5%, konsentrasi ethidium 0,005% (pada buffer) dan 0,00625% (pada agar). Kemudian dilarutkan 1x TBE buffer dan dialirkan pada tegangan listrik 121 Volt selama 3-4 jam. Hasil elektroforesis difoto menggunakan BIO-RAD Gel Doc™ EQ.

Analisis Data

Data yang diperoleh berdasarkan hasil *scoring* pita amplifikasi dengan klasifikasi "1" bila terdapat pita hasil amplifikasi, dan "0" bila tidak terdapat pita hasil amplifikasi. Data kemudian dianalisis dengan program NTSYS-pc (*Numerical*

Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.10) (Rohlf, 2000). Jarak genetik digunakan untuk analisis kluster dengan menggunakan metode UPGMA (*unweighted pair-group with arithmetic average*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan purifikasi DNA

Proses ekstraksi DNA mengalami beberapa kesulitan dikarenakan banyak sekali senyawa fenol yang sangat mengganggu pada saat proses isolasi DNA. Senyawa polifenol merupakan kontaminan yang mengganggu dan sering menyebabkan kegagalan isolasi dan pemurnian DNA. Hal seperti ini sering ditemui pada tanaman lain, di antaranya gambir (Fauza *et al.*, 2007) dan kemiri sunan (Syafaruddin dan Santoso, 2011). Kontaminan yang tercampur pada DNA dapat menghambat reaksi amplifikasi, sehingga kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan menjadi sangat rendah. Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan cara melakukan penambahan RNase dan pemurnian berulang-ulang, sehingga amplifikasi DNA dapat dilakukan dan dapat digunakan untuk analisa selanjutnya.

DNA berkualitas tinggi yang akan didapat dalam suatu ekstraksi DNA merupakan satu kaidah dasar yang harus dipenuhi dalam studi molekuler, terutama dalam penandaan sidik jari DNA. *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol (Lumaret *et al.*, 1998; Jose dan Usha, 2000). Ada tiga langkah utama dalam ekstraksi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Nicholl, 1993; Surzycki, 2000).

Primer dan Tingkat Polimorfisme

Dari dua puluh lima primer PCR-RAPD yang digunakan untuk mengamplifikasi sebanyak 17 sampel jambu mete, ada 24 primer yang memberikan pita DNA, 21 di antaranya polimorfisme dan tiga primer menunjukkan monomorfis (primer OPA-03, OPH-05, dan OPE-14) (Tabel 1) Jumlah pita yang dihasilkan bervariasi antara 1-5 pita dan berukuran 100-2000 bp. Untuk tanaman lainnya, seperti lada menghasilkan 1-8 pita

dengan ukuran 100-2000 kb (Syafaruddin dan Tresniawati, 2011), sedangkan pada analisis RAPD tanaman kelapa diperoleh antara 4-10 fragmen DNA per primer (Matondang *et al.*, 2001) atau rata-rata 11 fragmen per primer (Roslim *et al.*, 2003). Tanaman karet menghasilkan 5-11 fragmen per primer (Nurhaimi-haris *et al.*, 1998). Demikian juga analisis RAPD pada DNA kopi menghasilkan 1-7 fragmen dan DNA kakao menghasilkan 2-8 fragmen per primer (Toruan-Mathius dan Hutabarat, 1996; Toruan-Mathius *et al.*, 1997)

Hasil penelitian menunjukkan ada satu primer yang tidak menghasilkan pita DNA, yaitu OPF-01. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh tidak ada sekuen komplementer pada DNA genom atau hanya ada satu untai yang mengandung sekuen komplementer dengan primer tersebut. Menurut William *et al.* (1990), salah satu syarat utama terjadinya amplifikasi DNA dengan satu primer acak adalah jika primer tersebut mempunyai urutan basa nukleotida yang komplementer dengan kedua untai DNA genom pada posisi yang berlawanan. Nurhaimi dan Darussmin (1997) menyatakan bahwa amplifikasi DNA tidak terjadi apabila komplemen urutan basa nukleotida DNA cetakan terdapat pada jarak yang jauh. Amplifikasi DNA dengan PCR akan terjadi apabila komplemen basa primer dengan urutan basa DNA cetakan jaraknya tidak melebihi 5.000 pb.

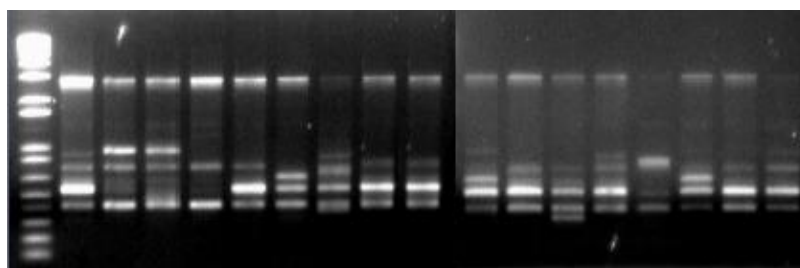
Analisa PCR

Hasil isolasi DNA terhadap 17 aksesori/varietas koleksi plasma nutfah jambu mete berdasarkan pembacaan gel hasil elektroforesis dengan menggunakan primer OPB-04 dan OPM12 terlihat pada Gambar 1 dan 2.

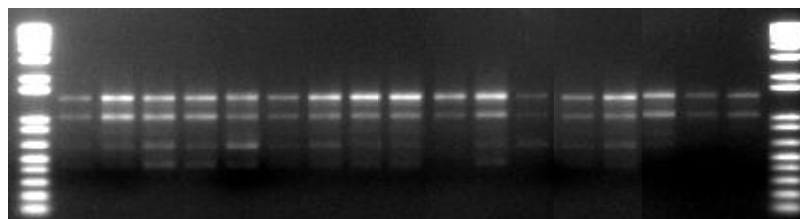
Tabel 1. Nama primer dan sekuen nukleotida yang digunakan untuk PCR-RAPD serta informasi polimorfisme

Table 1. Primer name and nucleotide sequence used for PCR-RAPD and polymorphism information

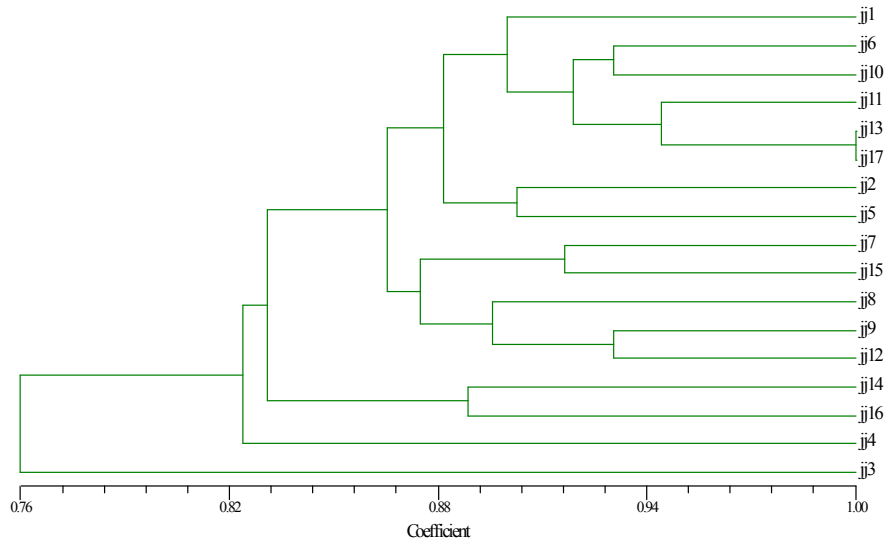
| No. | Nama Primer | Polimorfisme | Jumlah pita |
|-----|-------------|--------------|-------------------|
| 1. | OPA-03 | Monomorfis | 1 |
| 2. | OPC-07 | Polimorfis | 1 – 2 |
| 3. | OPE-09 | Polimorfis | 1 |
| 4. | OPB-17 | Polimorfis | 1 – 2 |
| 5. | OPF-13 | Polimorfis | 3 – 5 |
| 6. | OPC-03 | Polimorfis | 1 – 3 |
| 7. | OPG-16 | Polimorfis | 1 – 3 |
| 8. | OPF-01 | - | Tidak keluar pita |
| 9. | OPG-18 | Polimorfis | 1 – 4 |
| 10. | OPD-16 | Polimorfis | 1 – 2 |
| 11. | OPH-10 | Polimorfis | 1 |
| 12. | OPM-12 | Polimorfis | 2 – 4 |
| 13. | OPN-06 | Polimorfis | 3 – 4 |
| 14. | OPJ-20 | Polimorfis | 1 – 3 |
| 15. | OPN-15 | Polimorfis | 1 – 3 |
| 16. | OPH-04 | Polimorfis | 2 – 3 |
| 17. | OPN-18 | Polimorfis | 1 |
| 18. | OPH-05 | Monomorfis | 2 |
| 19. | OPS-09 | Polimorfis | 1 – 2 |
| 20. | OPM-15 | Polimorfis | 1 – 4 |
| 21. | OPB-04 | Polimorfis | 2 – 5 |
| 22. | OPA-13 | Polimorfis | 1 – 3 |
| 23. | OPE-14 | Monomorfis | 1 |
| 24. | OPJ-04 | Polimorfis | 1 – 3 |
| 25. | OPA-01 | Polimorfis | 0 – 5 |



Gambar 1. Pola pita DNA 17 aksesori plasma nutfah Jambu Mete menggunakan primer OPB-04
Figure 1. Band pattern of 17 cashew DNA accessions germplasm using primer OPB-04



Gambar 2. Pola pita DNA 17 aksesori plasma nutfah jambu mete menggunakan primer OPM-12
Figure 2. Band pattern of 17 cashew DNA accessions germplasm using primer OPM-12



Keterangan: JJ1= JN26, JJ2 = Oniki1, JJ3 = Oniki2, JJ4 = Oniki3, JJ5 = Kodi4, JJ6 = NDR31, JJ7 = Nigeria P9, JJ8 = Nigeria P2, JJ 9 = JN7, JJ10 = Srilanka, JJ11 = Mojokerto, JJ 12 = Pamotan, JJ13 = Karimun, dan JJ14 = Larantuka, JJ15 = BO2, JJ16 = SM9, dan JJ17 = JT21.

Gambar 3. Hasil analisis hubungan kekerabatan 17 aksesi jambu mete dengan program NTSys 2.1
 Figure 3. Dendrogram of genetic relationships of 17 cashew germplasm by using NTSys 2.1 program.

Kekerabatan Antar Nomor Aksesi

Hasil analisis kekerabatan 17 sampel jambu mete dengan program NTSys 2.1 menunjukkan bahwa variasi genetik yang cukup tinggi pada koefisien 88%. Tujuhbelas jambu mete tersebut mengelompok menjadi lima, kelompok yang pertama terdiri dari delapan individu (Oniki1, Kodi4, JN26, NDR31, Srilanka, Mojokerto, Karimun, dan JT21), kelompok dua terdiri dari lima individu (Nigeria P9, B 02, Nigeria P2, JN 7, dan Pamotan), kelompok tiga dua individu (SM9 dan Larantuka), kelompok empat satu individu (Oniki3), dan kelompok lima satu individu (Oniki2). Pada masing-masing kelompok juga terlihat adanya variasi genetik di antara individu-individu membentuk sub kelompok. Pada kelompok pertama terlihat adanya variasi genetik di antara individu membentuk sub kelompok (Gambar 3). Jumlah kelompok yang banyak menunjukkan keragaman genetik antar aksesi plasma nutfah jambu mete. Dengan demikian, koleksi plasma nutfah jambu mete di antara aksesi tersebut semakin beragam.

KESIMPULAN

Dari dua puluh lima primer PCR-RAPD yang digunakan untuk mengamplifikasi sebanyak 17 sampel jambu mete, ada 24 primer yang memberikan pita DNA, 21 di antaranya

polimorfisme dan tiga primer menunjukkan monomorfis. Hasil analisis kekerabatan 17 aksesi jambu mete dengan program NTSys 2.1 menunjukkan variasi genetik yang cukup tinggi. Pada koefisien 88%, 17 aksesi jambu mete tersebut mengelompok menjadi lima, kelompok pertama terdiri dari delapan individu (Oniki1, Kodi4, JN26, NDR31, Srilanka, Mojokerto, Karimun, dan JT21), kelompok dua lima individu (Nigeria P9, B02, Nigeria P2, JN7, dan Pamotan), kelompok tiga terdiri dua individu (SM9 dan Larantuka), kelompok empat satu individu (Oniki3), dan kelompok lima satu individu (Oniki2). Pada masing-masing kelompok juga terlihat adanya variasi genetik di antara individu-individu.

DAFTAR PUSTAKA

- Chau, N. M. 1998. Integrated Production Practices of Cashew in Vietnam. FAO, Reg. Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- Ditjenbun. 2010. Statistik Perkebunan Indonesia: Jambu Mete. 2009. Departemen Pertanian. Direktorat Jenderal Perkebunan. Jakarta.
- Fauza, H., I. Ferita, M. H. Karmana, N. Rostini dan R. Setiamihardja. 2007. Variabilitas genetik tanaman gambir berdasarkan marka RAPD. *Zuriat* 18 (2): 93-99.

- Jose, J. and R. Usha. 2000. Extraction of geminiviral DNA from a aighly mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 349-355.
- Karsinah, Sudarsono, L. Setyobudi dan H. Aswindinoor. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 7 (1): 8-16.
- Lumaret, R., H. Michaud, J. P. Ripoll, and L. Toumi. 1998. Chloroplast DNA Extraction Procedure for Species High in Phenolics and Polysaccharides. In A. Karp, P.G. Isaac, and D.S. Ingram (Eds.). *Molecular Tool for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London. p. 15-17.
- Matondang, I., Suharsono dan A. Hartana. 2001. Analisis keanekaragaman genetik kelapa dalam asal Maluku menggunakan teknik Random Amplified Polymorphic DNA. *Hayati* 8: 31-34.
- Nicholl, D. S. T. 1993. *An Introduction to Genetic Engineering*. Department of Biological Science University of Praisly.
- Nurhaimi-Haris and A. Darussamin. 1997. RAPD analysis of oil palm clones with normal and abnormal fruits. *Menara Perkebunan* 66 (1): 64-74.
- Nurhaimi-Haris, S. Woelan dan A. Darussamin. 1998. RAPD analysis of genetic variability in plant rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) clones. *Menara Perkebunan* 66 (1): 9 – 19.
- Orozco-Castillo, K., J. Chalmers, R. Waugh, W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Gent.* 87 : 934-940.
- Rao, E. V. V. B. 1998. Integrated Production of Cashew in India. In. *Integr. Prod. Pract of Cashew in Asia*. FAO-Reg. Off. for Asia and The Pacific. Bangkok Thailand. p 15-25.
- Rohlf, F. J. 2000. *NT SYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. User Guide*. Department of Ecology and Evolution State University of New York.
- Ronning, C. M., R. J. Schnell and D. N. Kuhn. 1995. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in *Theobroma cacao* L. *J. Amer Sco Hort Sci* 120 (4): 681-686.
- Roslim, D. I., A. Hartana dan Suharsono. 2003. Kemiripan genetika tiga populasi kelapa tipe dalam berdasarkan tiga metode analisis data penanda RAPD. *Hayati* 10: 12-18.
- Samal, S., G. R. Rout and P. C. Lenka. 2003. Analysis of genetic relationship between populations of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by using morphological characterization and RAPD markers. *Plant Soil Environment* 49 (4): 176-182.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Syafaruddin dan T. J. Santoso. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Penelitian Tanaman Industri* 17 (1) : 11-17.
- Syafaruddin dan C. Tresniawati. 2011. Variabilitas genetik plasma nutfah lada (*Piper nigrum* L.) berdasarkan marka random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Buletin Ristri* 2 (1) : 89-98.
- Toruan-Mathius, N. dan T. Hutabarat. 1996. Penanda RAPD dan polimorfisme genetik tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) toleran terhadap cekaman air. *Menara Perkebunan* 64 (2): 45-55.
- Toruan-Mathius, N., T. Hutabarat and D. Suhendi. 1997. The use of RAPD to evaluate genetic variability of hybrid parent in *Theobroma cacao* L. plants. *Menara Perkebunan* 65 (2): 53-63.
- Williams, J. G. K., A. R. K. Kubelik, J. L. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by random primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.* 18: 6531-6535.