

Pengaruh kitosan terhadap peningkatan level ekspresi *WRKY17* dan *WRKY53* tanaman *Capsicum annuum* cv. *Laba* pada kondisi kekeringan

The effect of chitosan on the escalation of WRKY17 and WRKY53 genes expression level on Capsicum annuum cv. Laba under drought condition

Muhammad Abdul AZIZ^{1)*}, Rizkita Rachmi ESYANTI²⁾, & Fenny Martha DWIVANNY^{2,3)}

¹⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor, Indonesia 16128
²⁾ Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganeca 10, Bandung, Jawa Barat, Indonesia
³⁾ Pusat Penelitian Nanosains and Nanoteknologi, Institut Teknologi Bandung, Jawa Barat, Indonesia

Diterima tgl 26 Mei 2020 / disetujui tgl 19 Oktober 2020

Abstract

Chitosan is known as the natural plant growth biostimulant and defense elicitor involving WRKY transcription factors in response to environmental stresses. However, either plant's growth or defense responses against stress are different among the cultivars. In the previous study, chitosan and drought treatment combination on red chili plant cv. Lado resulted in the impeded growth performance followed by the down-regulated expression level of WRKY17. Hence, this study aimed to investigate the response of red chili plant from the different cultivar towards the combination of chitosan and drought treatments. At the onset of the generative phase, plants were subjected to the drought treatment with and without 1 mg mL⁻¹ of chitosan application. Observation of plant performance was carried out by measuring plant height, the number of leaves, the conversion percentage of flowers developed to fruits, and the number of harvested fruits, while the molecular parameter was indicated by the analyses of WRKY17 and WRKY53 expression levels. In line with the previous study using cv. Lado, the combination of 1 mg mL⁻¹ of chitosan and drought treatment significantly reduced the plant productivity observed in the number of fruits, followed by the plant height and the number of leaves. However, the expression level of WRKY17 and WRKY53 experienced 10 and 22-fold higher than controls, respectively. This is different from the previous study which showed the reduction of WRKY17 expression level. According to the study, it can be implied that the combination of chitosan and drought treatments on red chili plant cv. Laba could reduce plant growth performance, but increased genetics indicator towards plant's defense system against stress indicated by the escalation of WRKY17 and WRKY53 expression level. Furthermore, the individual chitosan application are potential to increase the productivity of red chili plant cv. Laba.

[Keywords: red chili cv. Laba, gene expression, growth performance]

Abstrak

Kitosan diketahui merupakan biostimulan pertumbuhan dan elisitor ketahanan alami yang melibatkan faktor transkripsi *WRKY* dalam merespons stres lingkungan. Sementara itu, dalam menanggapi cekaman, respons pertumbuhan maupun ketahanan tanaman berbeda pada kultivar satu dan yang lain. Pada penelitian sebelumnya, kombinasi kitosan dan kekeringan pada cabai merah cv. Lado berdampak pada penurunan karakter pertumbuhan yang diikuti penurunan level ekspresi *WRKY17*. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari respons tanaman cabai merah pada kultivar yang berbeda terhadap kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan. Ketika memasuki fase generatif, tanaman diberikan cekaman kekeringan dengan dan tanpa perlakuan kitosan 1 mg mL⁻¹. Pengamatan karakter pertumbuhan dilakukan dengan mengukur tinggi, jumlah daun, persentase konversi bunga menjadi buah dan jumlah buah, sedangkan analisis molekuler dilakukan dengan mengkuantifikasi level ekspresi *WRKY17* dan *WRKY53*. Sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya pada cv. Lado, kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan secara signifikan dapat menurunkan produktivitas tanaman cabai merah cv. Laba yang teramati pada parameter jumlah buah, kemudian diikuti parameter tinggi tanaman dan jumlah daun. Namun, level ekspresi *WRKY17* dan *WRKY53* secara berturut-turut mengalami peningkatan sebesar 10 dan 22 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal tersebut berlawanan dengan hasil sebelumnya yang mana menunjukkan penurunan level ekspresi *WRKY17*. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan pada cv. Laba dapat menurunkan respons pertumbuhan, namun meningkatkan indikator genetik ketahanan tanaman terhadap cekaman yang ditunjukkan dengan peningkatan level ekspresi *WRKY17* dan *WRKY53*. Sementara

itu, aplikasi kitosan secara individu berpotensi meningkatkan produktivitas tanaman cabai merah cv. Lada.

[Kata kunci: cabai merah cv. Lada, ekspresi gen, performa pertumbuhan]

Pendahuluan

Kitosan merupakan turunan dari kitin, yaitu polisakarida yang umumnya ditemukan pada eksoskeleton udang, lobster, dan kepiting (Mondal et al., 2012). Senyawa ini merupakan *co-polymer* dari *N-acetyl-D-glucosamine*, dan *D-glucosamine* (Pichyangkura & Chadchawan, 2015). Kitosan banyak dipelajari sebagai biostimulan untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman. Selain itu, kitosan diketahui memiliki aktivitas antifungi, antitranspirasi, dan elisitor ketahanan terhadap cekaman biotik maupun abiotik (Ohta et al., 2004; Dzung et al., 2011; & Mondal et al., 2012). Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa aplikasi kitosan saat cekaman kekeringan dilaporkan dapat meningkatkan karakter fisiologis tanaman *Richinus communis* (Karimi et al., 2012) dan *Ocimum basilium* (Malekpoor et al., 2016). Namun demikian, Bistgani et al. (2017) menyatakan bahwa aplikasi kitosan pada kondisi kekeringan 50% menyebabkan penurunan berat basah tanaman *Thymus*. Aziz et al. (2020) menambahkan bahwa aplikasi kitosan pada tanaman cabai merah cv. Lado saat kekeringan secara signifikan dapat menurunkan pertumbuhan yang diikuti penurunan level ekspresi *WRKY17*. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa aplikasi kitosan pada berbagai kondisi lingkungan terhadap berbagai jenis hingga kultivar tanaman menunjukkan pengaruh yang beragam.

Kekeringan merupakan salah satu stres abiotik yang menjadi masalah paling besar di bidang pertanian karena dapat menghambat pertumbuhan dan menurunkan produktivitas tanaman. Secara umum, tanaman akan merespons cekaman kekeringan dengan mensintesis asam absisat (ABA), fitohormon terkait perkembangan tanaman dan juga sebagai salah satu regulator ketahanan. ABA kemudian mengaktifkan jalur transduksi *signal* yang melibatkan sintesis senyawa-senyawa oksidatif seperti H_2O_2 untuk menginduksi penutupan stomata sebagai salah satu mekanisme pertahanan. Hal tersebut bertujuan untuk mengurangi laju transpirasi, namun sayangnya juga berdampak pada penurunan laju fotosintesis seiring menurunnya suplai CO_2 , sehingga hal ini berakibat pada penurunan pertumbuhan dan produktivitas tanaman (Iriti et al., 2009; Anjum et al., 2011; Phimchan et al., 2012). Saat tercekam, tanaman dapat melakukan berbagai mekanisme adaptif yang melibatkan integrasi molekuler dalam mengaktifkan transduksi sinyal untuk mempertahankan pertumbuhan dan/ atau ketahanan (Khan et al., 2014). Yan et al. (2014) menyatakan bahwa sensitivitas tanaman terhadap

cekaman kekeringan melibatkan faktor transkripsi *WRKY* dalam mengaktifkan jalur *signaling* ABA yang memicu penutupan stomata.

WRKYs merupakan salah satu kelompok faktor transkripsi yang dikarakterisasi berdasarkan keberadaan satu atau dua domain pada sisi N dan C terminal, yaitu dengan motif *WRKYGQK* pada sisi N terminal dan motif *zinc finger* pada sisi C terminal. Kedua elemen tersebut dibutuhkan untuk afinitas pengikatan protein *WRKY* dengan sekuen konsensusnya, *C/T)TGAC(C/T*, yang disebut *W-box* pada daerah promoter gen target. Terdapat 74 protein *WRKY* yang dikarakterisasi dari *Arabidopsis* dan telah dikelompokkan ke dalam tiga grup berdasarkan jumlah dan tipe domain *WRKY*nya. Grup III dicirikan dengan satu motif *C-C-H-C zinc finger*, grup II dicirikan dengan satu motif *C-C-H-H zinc finger*, dan grup I dicirikan dengan dua motif *C-C-H-H zinc finger* (Journot-Catalino et al., 2006). *WRKY* diketahui berperan dalam jalur *signaling* asam absisat (ABA) dan asam jasmonat (JA) pada tanaman dalam merespons cekaman kekeringan (Jiang et al., 2015; Ding et al., 2014). Namun demikian, belum banyak studi yang mempelajari peran *WRKY* dalam merespons cekaman kekeringan pada berbagai komoditas pertanian khususnya tanaman cabai merah.

Di Indonesia, produksi komoditas cabai dari waktu ke waktu cenderung fluktuatif bahkan sering kali tidak dapat memenuhi kebutuhan pasar. Hal tersebut terjadi baik karena adanya paparan cekaman biotik seperti infeksi patogen maupun abiotik seperti kekeringan (Balitbang, 2016; Kementerian Pertanian, 2016). Respons tanaman cabai merah dalam menanggapi cekaman lingkungan dipengaruhi oleh karakter pertumbuhan maupun ketahanan yang melekat pada masing-masing kultivar maupun variasi genetik. *C. annum* cv. Lada merupakan produk unggulan yang dikembangkan dari kultivar Lado oleh PT *East West Seed* Indonesia. Beberapa karakter yang dikembangkan meliputi peningkatan ketahanan terhadap berbagai penyakit dan masa panen yang lebih singkat (PT *East West Seed* Indonesia, *unpublished*). Pada penelitian sebelumnya, aplikasi kitosan saat kekeringan terhadap *C. annum* cv. Lado berdampak pada pertumbuhan dan produktivitas yang terhambat. Oleh sebab itu, pada penelitian ini digunakan kultivar Lada sebagai kelanjutan dari riset sebelumnya untuk mempelajari peran kitosan terhadap tanaman cabai merah pada kultivar yang berbeda. Keunggulan karakter ketahanan pada cv. Lada diharapkan dapat menyebabkan pengaruh positif terhadap kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari respons tanaman cabai merah pada kultivar yang berbeda terhadap kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan.

Bahan dan Metode

Bahan dan pemeliharaan tanaman

Pemeliharaan tanaman cabai merah dan perlakuan dilakukan di rumah kaca Institut Teknologi Bandung, Indonesia. Desain penelitian menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan serial perlakuan terdiri dari kelompok aplikasi kitosan (Chi), kombinasi kitosan dan kekeringan (Chi-D), kekeringan (D), dan kontrol (C) dengan tiga ulangan. Penelitian ini diawali dengan mempersiapkan media tanam yang terdiri dari campuran tanah, sekam dan pupuk kandang (4 : 3 : 2, v/v/v), kemudian dimasukkan ke dalam *polybag* berukuran 17,5 x 35 cm sebanyak 3 kg. Bibit cabai merah berusia sekitar 3 minggu ditanam pada media dengan penyiraman normal atau sebesar 100% kapasitas lapang dari media yang digunakan (Restiana, 2016). Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah air yang digunakan untuk memenuhi 100% kapasitas lapang yaitu 1 L untuk 2 hari, yang mana dilakukan hingga memasuki fase generatif. Sementara itu, larutan kitosan 1% disiapkan dengan cara melarutkan 5 g serbuk kitosan dalam 3,5 mL asam asetat glasial kemudian diencerkan dengan akuades hingga 500 mL dengan bantuan *magnetic stirrer* selama \pm 24 jam dan digunakan sebagai larutan stok. Ketika akan digunakan, kitosan 1 mg mL⁻¹ dibuat dengan melarutkan 100 mL stok kitosan ke dalam 900 mL akuades dan dihomogenkan dengan bantuan *magnetic stirrer* pada kecepatan tinggi (500 rpm) sambil ditambahkan NaOH 3M sedikit demi sedikit hingga larutan mencapai pH 6 – 6,4 (Esyanti *et al.*, 2019).

Tanaman yang mulai memasuki fase generatif, yaitu ditandai dengan munculnya kuncup bunga, diberikan kombinasi perlakuan kitosan 1 mg mL⁻¹ dan kekeringan. Perlakuan kekeringan dilakukan dengan cara mempertahankan media tanam dengan 50% kadar air dari kapasitas lapang (Dorji *et al.*, 2005), yaitu dengan penyiraman sebanyak 500 mL air per 2 hari terhadap kelompok perlakuan Chi-D dan D. Sementara itu, perlakuan kitosan dilakukan dengan cara disemprotkan pada permukaan abaksial dan adaksial daun secara merata yang dilakukan satu kali dalam sepekan (Esyanti *et al.*, 2019) pada kelompok perlakuan Chi-D dan Chi. Perlakuan ini berlangsung hingga memasuki masa dipanen, yaitu berkisar antara 55-60 hari setelah berbunga (Sung *et al.*, 2005). Setelah dipanen, daun cabai langsung dibungkus dengan *aluminium foil* kemudian dicelupkan ke dalam nitrogen cair dan disimpan di dalam *deep freezer* -80°C untuk digunakan pada analisis molekuler.

Pengukuran parameter pertumbuhan

Selama perlakuan dilakukan pengukuran terhadap parameter pertumbuhan yang terdiri dari tinggi tanaman, jumlah daun, persentase perubahan bunga menjadi buah, dan jumlah buah. Pengukuran tinggi tanaman dilakukan setiap

minggu yaitu dengan mengukur tinggi mulai dari permukaan tanah hingga ujung tanaman pada 8 hingga 16 minggu setelah tanam (MST) menggunakan mistar, sementara jumlah daun dan jumlah buah dihitung secara manual pada 16 MST. Persentase perubahan bunga menjadi buah dihitung dengan cara membagi jumlah buah saat panen (16 MST) dengan jumlah bunga pada titik tertinggi untuk masing-masing kelompok perlakuan.

Ekstraksi RNA dan analisis qPCR

Pada penelitian ini, RNA total diisolasi dari sampel daun sebanyak 50 mg menggunakan kit mini PureLink™ RNA (Thermoscientific Invitrogen). Integritas RNA dikonfirmasi dalam gel agarosa 1,5% (b/v) dengan *gel red* sebagai agensia pewarna menggunakan instrumen elektroforesis. Sementara itu, kuantitas dan kemurnian RNA diukur menggunakan spektrofotometer nanodrop (Eppendorf, bio-spectrometer) pada rasio panjang gelombang λ_{260} dan λ_{280} . Perlakuan DNase untuk memurnikan RNA dilakukan menggunakan DNaseI (Thermo Scientific), sedangkan sintesis cDNA dilakukan dengan iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) yang mengandung enzim *reverse transcriptase*. Setelah itu, kualitas cDNA dikonfirmasi dalam gel agarosa 2% menggunakan *CaUbi3* sebagai gen referensi dengan primer spesifik yang telah didesai sebelumnya. Kondisi Reaksi PCR (*standard PCR, thermal cycler*) dilakukan dengan program sebagai berikut: 95°C 3 menit, 95°C 30 detik, 58°C 30 detik, 72°C 1 menit, 72°C 5 menit sebanyak 35 siklus (n = 3 ulangan teknis).

Amplifikasi gen *WRKY17* (*Accession number* : XM_016699929.1) dan *WRKY53* (*Accession number* : NM_001324692.1) dilakukan menggunakan primer spesifik yang merujuk dari penelitian sebelumnya oleh Aziz *et al.* (2020) yaitu dengan sekuen (5' ke 3') *Forward* : GGGGTTACTACAGATGCAGC dan *Reverse* : CTCTGGCCAGAACTTCCATC untuk *WRKY17*, serta sekuen *Forward* : ACAGATGCACGTA-TCGTCAC dan *Reverse* : GCCTGTTTTGAT-AAACGGCC untuk *WRKY53*. Sementara itu, primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gene referensi *CaUbi3* (*Accession number* : AY486137.1) yaitu menggunakan sekuen TCCATCTGCTCTCTGTTGACG (*Forward*) dan CCCCAAGACAATAAGACATTGT (*Reverse*). Setelah dikonfirmasi menggunakan instrumen elektroforesis, sekuen dilakukan melalui jasa Macrogen, Korea. Pada tahap akhir, analisis *quantitative* PCR dilakukan dengan menggunakan instrumen dan perangkat lunak dari MyGo Pro dengan pewarna dari Toyobo (Thunderbirds Sybr qPCR Mix QPS-201). Skor siklus kuantifikasi (Cq) kemudian digunakan untuk mengukur level ekspresi melalui metode relatif dengan menggunakan rumus seperti yang dijelaskan oleh Livak & Schmittgen (2001).

Analisis statistik

Pengaruh kitosan, kekeringan, dan interaksi antar kedua perlakuan terhadap parameter jumlah daun, persentase bunga menjadi buah, jumlah buah, serta level ekspresi *WRKY17* dan *WRKY53* dianalisis dengan *Two-way* ANOVA yang dilakukan menggunakan aplikasi statistik IBM SPSS 22. Perbedaan signifikansi antar perlakuan dan analisis korelasi antar parameter ditentukan menggunakan uji Tukey HSD pada $P < 0,05$ menggunakan aplikasi R studio 3.5.2 (64 bit).

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, rata-rata kondisi iklim yang teramati yaitu pada fotoperiode 12 jam, kelembaban 78,96%, intensitas cahaya 10240 lux dan suhu 27,78°C. Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan tanaman cabai merah kultivar Loba yang dilakukan dengan mengukur tinggi tanaman dari 8 hingga 16 MST, jumlah daun dan buah pada 16 MST, serta persentase konversi bunga menjadi buah ditampilkan pada Gambar 1. Hasil pengamatan tersebut menunjukkan adanya pengaruh kitosan yang signifikan terhadap pertumbuhan tanaman cabai merah pada kondisi kekeringan. Kitosan diketahui merupakan *co-polimer* dari *N-asetil-D-glukosamin* dan *D-glukosamin* yang dapat menstimulasi pertumbuhan tanaman karena diperkirakan dapat menjadi sumber nitrogen (gugus amina) (El-Tanahy et al., 2012), meningkatkan penyerapan mikronutrien dan makronutrien (Chookhongkha et al., 2012; Jang et al., 2012), meningkatkan aktivitas enzim-enzim terkait metabolisme nitrogen seperti nitrat reduktase, glutamin sintetase, dan protease serta meningkatkan transport nitrogen pada daun (Mondal et al., 2012).

Kekeringan merupakan salah satu cekaman abiotik yang dapat menstimulasi asam jasmonat (JA) dan menekan kerja hormon giberelin (GA), sehingga pertumbuhan tanaman terhambat. Selain itu, tanaman dapat merespons kekeringan dengan mengaktifkan asam absisat (ABA) yang dapat menginduksi penutupan stomata untuk mengurangi laju transpirasi (Iriti et al., 2009). Namun, hal tersebut juga berdampak pada penurunan absorpsi CO₂, sehingga aktivitas fotosintesis menurun dan berakibat pada penurunan pertumbuhan dan kesintasan tanaman (Anjum et al., 2011; Phimchan et al., 2012). Peran kitosan dalam meningkatkan aspek fisiologis tanaman saat kekeringan telah dipelajari pada beberapa tanaman seperti *Ocimum basilium* (Malekpoor et al., 2016) dan *Richinus communis* (Karimi et al., 2012). Dengan demikian, kitosan diperkirakan juga dapat mempengaruhi aspek fisiologis maupun molekuler tanaman *C. annuum* pada kondisi kekeringan.

Aplikasi kitosan saat kekeringan menurunkan pertumbuhan dan produktivitas tanaman

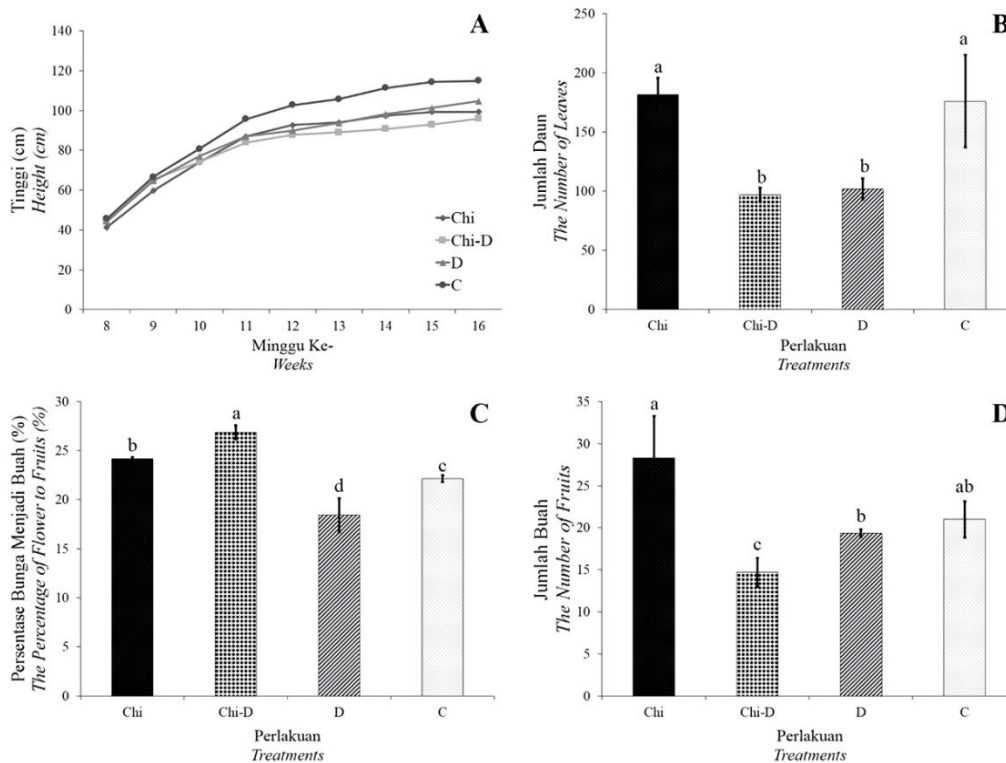
Pada parameter tinggi tanaman terjadi tren peningkatan tinggi mulai dari akhir fase eksponensial hingga fase stasioner (Gambar 1A). Pada 8 MST atau akhir fase eksponensial, tinggi tanaman pada setiap kelompok perlakuan memperlihatkan pola yang seragam, hal ini menunjukkan bahwa pola pertumbuhan tanaman pada fase vegetatif di setiap kelompok perlakuan relatif sama. Saat memasuki akhir fase stasioner atau 16 MSA, kelompok kombinasi perlakuan kitosan 1 mg mL⁻¹ dan kekeringan (Chi-D) menunjukkan tren tinggi tanaman yang paling rendah dibanding kelompok lainnya. Sementara itu, kelompok kontrol (C) menunjukkan tren tinggi tanaman yang paling baik. Oleh sebab itu, diperkirakan bahwa aplikasi kitosan pada penelitian ini tidak menyeimbangkan dampak negatif dari cekaman kekeringan yang dialami tanaman cabai merah kultivar Loba. Hal tersebut sesuai dengan dugaan Iriti et al. (2009) bahwa kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan pada tanaman dapat menyebabkan respons sinergis dalam meningkatkan ketahanan terhadap cekaman namun berdampak antagonis terhadap pertumbuhan, yakni ditunjukkan dengan respon pertumbuhan yang terhambat.

Berdasarkan jumlah daun dan buah (Gambar 1B dan 1D) pada 16 MSA, terdapat tren yang relatif sama yaitu kelompok perlakuan kombinasi kitosan dan kekeringan (Chi-D) menunjukkan nilai yang paling rendah dibandingkan kelompok lainnya. Jumlah daun tertinggi teramati pada kelompok kitosan (Chi) yaitu sejumlah 182 helai, kemudian disusul kelompok perlakuan C, D, dan Chi-D secara berturut-turut 176, 101, dan 97 helai. Meskipun demikian, antara kelompok Chi dan C tidak berbeda signifikan, begitu pula antara kelompok D dan Chi-D. Selaras dengan jumlah daun, jumlah buah tertinggi juga teramati pada kelompok Chi yaitu sejumlah 28 buah, kemudian disusul C, D, dan Chi-D secara berturut-turut 21, 19, dan 15 buah. Namun, pada parameter jumlah buah, kelompok perlakuan Chi-D teramati paling rendah dan berbeda signifikan terhadap kelompok lainnya. Dengan demikian, kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan berpotensi menyebabkan pengaruh penurunan pertumbuhan dan produktivitas tanaman cabai merah. Meskipun demikian, aplikasi kitosan secara individu berpotensi untuk meningkatkan jumlah buah. Hasil ini selaras dengan studi Bistgani et al. (2017) bahwa aplikasi kitosan pada kondisi kekeringan 50% menyebabkan penurunan berat basah tanaman *Thymus* sekitar 29,98% dan 5,60% yang ditanam pada tahun 2014 dan 2015 secara berturut-turut. Namun, hal tersebut tidak sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya pada tanaman *Ocimum basilium* (Malekpoor et al., 2016) dan *Richinus communis* (Karimi et al., 2012).

Perbedaan frekuensi aplikasi dan konsentrasi kitosan dapat menyebabkan perbedaan respons fisiologis pada tanaman. Malerba & Cerena (2016) menyatakan bahwa aktivitas kitosan dalam menginduksi respons biologis tanaman seperti resistensi terhadap cekaman dan peningkatan produktivitas bergantung pada komposisi kimia, waktu aplikasi, dan frekuensi aplikasinya. Pada penelitian sebelumnya, tiga kali aplikasi kitosan dengan konsentrasi 0,4 g L⁻¹ dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman *Ocimum basilicum* baik pada kondisi normal maupun kekeringan (Malekpoor *et al.*, 2016). Sementara itu, pada penelitian ini kitosan 1 mg mL⁻¹ diaplikasikan selama fase generatif yaitu sejumlah 8 kali aplikasi, sehingga terdapat perbedaan frekuensi dan konsentrasi kitosan yang diduga menyebabkan perbedaan respons pada spesies yang berbeda. Oleh sebab itu, diperkirakan bahwa aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ pada fase generatif tidak berpengaruh signifikan dalam menyeimbangkan dampak negatif cekaman kekeringan. Selain itu,

normalnya pada fase ini pertumbuhan tanaman memasuki fase stasioner, sehingga rendahnya jumlah daun dan buah pada kelompok perlakuan Chi-D dan D diduga disebabkan oleh gugurnya organ tanaman atau absisi. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa baik kekeringan maupun aplikasi kitosan diketahui dapat mengaktifkan jalur *signaling* yang sama, yaitu melalui sintesis asam absisat (ABA) yang memicu penutupan stomata dan absisi (Iriti *et al.*, 2009; Gollmack *et al.*, 2014; Pichayangkura & Chadchawan, 2015).

Absisi organ tanaman baik berupa daun, bunga maupun buah diduga disebabkan oleh cekaman kekeringan dan juga temperatur lingkungan yang teramati mencapai 31,48 °C pada 13 MST (data tidak ditampilkan), sementara normalnya adalah 25-27 °C pada siang hari dan 18-20 °C pada malam hari (Sumarni & Muharam, 2005). Cekaman abiotik yang dialami tanaman selama fase generative akan berdampak signifikan terhadap gugurnya bunga maupun buah (Sung *et al.*, 2005).



Gambar 1. Pertumbuhan dan produktivitas tanaman cabai merah yang terdiri dari (A) tren tinggi tanaman dari minggu ke 8 – 16, (B) jumlah daun, (C) persentase konversi perubahan bunga menjadi buah, dan (D) jumlah buah. Bar pada setiap kelompok perlakuan merepresentasikan standar error dari nilai rata-rata (n = 3). Nilai signifikan ditentukan oleh perbedaan huruf pada setiap bar, $p < 0,05$. Chi = 1 mg mL⁻¹ kitosan; Chi-D = 1 mg mL⁻¹ kitosan dan kekeringan; D = kekeringan; C = kontrol

Figure 1. Red chili plant growth and productivity including (A) plant height starting from week 8 to 16, (B) Leaves number (C) The percentage of flowers to fruits conversion, and (D) harvested fruits number. The bars represent the mean of each growth parameters with corresponding standard error (n = 3). Significant value is indicated by the letter on top of each bar, $p < 0,05$. Chi = 1 mg mL⁻¹ chitosan; Chi-D = 1 mg mL⁻¹ chitosan and drought; D = drought; C = control

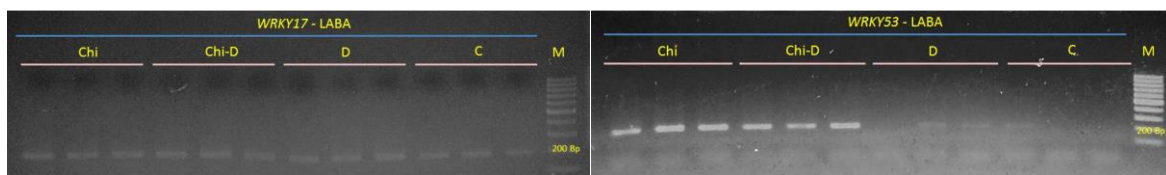
Aziz et al. (2020) menambahkan bahwa jumlah bunga yang diproduksi selama fase tersebut dapat berfluktuasi seiring ketersediaan nutrisi, terjadinya cekaman abiotik, hingga berkembang menjadi buah. Meskipun diketahui dapat menyebabkan pertumbuhan dan produktivitas tanaman terhambat, kelompok perlakuan Chi-D memiliki persentase perkembangan bunga menjadi buah paling tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain yaitu sebesar 26,36%. Nilai tersebut berbeda signifikan terhadap kelompok Chi, C dan D, yang teramati sebesar 24,18%; 22,15%; dan 13,42% secara berturut-turut. Dengan demikian dapat diketahui bahwa meskipun dengan jumlah bunga paling rendah, kelompok tanaman pada perlakuan Chi-D dapat mempertahankan jumlah bunga tersebut hingga berkembang menjadi buah yang siap dipanen. Oleh sebab itu, aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ pada kondisi kekeringan diketahui berpotensi menurunkan dampak negatif dari cekaman kekeringan pada parameter pembungaan. Dugaan ini didukung oleh Dzung et al. (2011) yang menyatakan bahwa aplikasi kitosan dapat menurunkan tingkat absisi buah kopi hingga 15,25% dibandingkan kontrol yang diikuti dengan peningkatan kadar klorofil, akumulasi mineral, dan pertumbuhan tanaman tersebut. Selain itu, Salachna & Zawadzinska (2014) menambahkan bahwa aplikasi kitosan dapat mempercepat waktu pembungaan dan meningkatkan jumlah bunga pada kelompok tanaman *Freesia*. Sementara itu, Dorji et al. (2005) dan Sung et al. (2005) menyatakan bahwa kekeringan 50% menyebabkan penurunan jumlah buah lebih dari 20% dan berat buah 22% dibandingkan kontrol. Hal tersebut selaras dengan hasil penelitian ini bahwa persentase perkembangan bunga menjadi buah pada kelompok perlakuan dengan kitosan (Chi dan Chi-D) terjadi peningkatan, sementara pada kelompok kekeringan (D) terjadi penurunan yang signifikan terhadap kontrol.

Secara umum, baik parameter tinggi tanaman, jumlah daun, maupun jumlah buah, kelompok kombinasi perlakuan kitosan 1 mg mL⁻¹ dan

kekeringan (Chi-D) menyebabkan penurunan karakter pertumbuhan dibandingkan kontrol. Hal ini diduga karena frekuensi perlakuan kitosan yang terlalu sering, sehingga dapat memicu penutupan stomata dan produksi *Reactive oxygen species* (ROS) berlebih (Pichyangkura & Chadchawan, 2015). Dugaan tersebut sejalan dengan hasil penelitian Aziz et al. (2020) bahwa aplikasi kitosan dan kekeringan secara bersamaan pada *C. annuum* cv. Lado menyebabkan penutupan stomata yang paling tinggi di antara perlakuan kekeringan dan kitosan secara terpisah maupun kontrol. Hal ini dapat menyebabkan efisiensi fotosintesis menurun karena terbatasnya absorpsi CO₂ ke dalam sel-sel tanaman dan juga menginduksi gugurnya organ tanaman. Maser et al. (2018) menjelaskan bahwa ABA yang terinduksi karena kekeringan maupun aplikasi kitosan menyebabkan tingginya akumulasi ion Ca²⁺ di dalam sel penjaga dan keluarnya ion K⁺ yang terus menerus. Hal ini berdampak pada penurunan tekanan turgor sel penjaga sehingga stomata menutup.

Aplikasi kitosan saat kekeringan meningkatkan ekspresi gen WRKY17 dan WRKY53

Gen target *WRKY17* dan *WRKY53* serta gen referensi *CaUbi3* diamplifikasi menggunakan primer spesifik yang telah didesain sebelumnya. Dengan menggunakan primer tersebut akan diperoleh amplicon dengan ukuran ± 181 bp untuk gen *WRKY17*, ± 192 bp untuk gen *WRKY53* dan ± 201 bp untuk gen *CaUbi3*. Gen referensi *CaUbi3* digunakan untuk mengkonfirmasi keberhasilan sintesis cDNA dan sebagai *housekeeping gene* pada proses qPCR untuk normalisasi level ekspresi gen (Livak & Schmittgen, 2001). Apabila cDNA berhasil disintesis, maka akan muncul pita tunggal sesuai dengan ukuran yang dirancang untuk masing-masing pasangan primer. Hasil amplifikasi gen target divisualisasikan sesuai pada Gambar 2. Setelah dilakukan analisis *sequencing* terhadap produk PCR menggunakan teknik BLAST, diperoleh nilai kesamaan (*identity*) sebesar 100% dengan gen *Capsicum annuum probable WRKY17* (*Accession number*: XM_016699929.1) dan *WRKY53* (*Accession number*: NM_001324692.1).



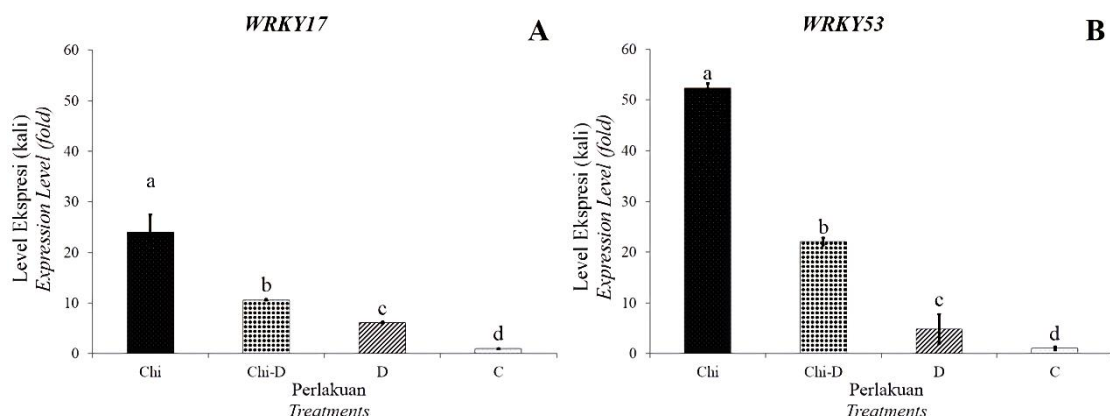
Gambar 2. Elektroforegram gen *WRKY17* dan *WRKY53* tanaman *C. annuum* cv. Laba. Chi = 1 mg mL⁻¹ kitosan; Chi-D = 1 mg mL⁻¹ kitosan dan kekeringan; D = kekeringan; C = kontrol; M = marker; dan K- = kontrol negatif

Figure 2. The electroforegram of *WRKY17* dan *WRKY53* genes of *C. annuum* cv. Laba. Chi = 1 mg mL⁻¹ chitosan; Chi-D = 1 mg mL⁻¹ chitosan and drought; D = drought; C = control; M = marker K- = negative control

Pada saat tercekam, tanaman dapat melakukan berbagai mekanisme pertahanan yang melibatkan integrasi molekuler, seluler, dan biokimia (Khan *et al.*, 2014). *WRKY* merupakan salah satu kelompok faktor transkripsi yang berperan dalam meregulasi respons kekeringan melalui berbagai mekanisme seperti penutupan stomata, pengaturan level ROS, aktivasi ABA *signaling*, dan lain lain (Phukan *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2012). Berdasarkan jumlah dan tipe domain *WRKY*-nya, faktor transkripsi *WRKY* pada *Arabidopsis* telah dikelompokkan ke dalam tiga grup yaitu Grup III yang dicirikan dengan satu motif C-C-H-C *zinc finger*, grup II dengan satu motif C-C-H-H *zinc finger*, dan grup I dengan dua motif C-C-H-H *zinc finger* (Journot-Catalino *et al.*, 2006). Beberapa anggota dari masing-masing grup diketahui memiliki peran ganda dalam merespons cekaman biotik maupun abiotik, sebagai contoh *WRKY17* (grup II) pada tanaman *Arabidopsis thaliana* yang diketahui mengalami peningkatan ekspresi setelah diinduksi patogen *Pseudomonas syringae* (Journot-catalino *et al.*, 2006). Selain itu, overekspresi *WRKY17* dapat meregulasi respon kekeringan (Yan *et al.*, 2014). Mekanisme biologis tersebut berkaitan dengan aspek pertumbuhan, perkembangan, dan level cekaman yang dialami tanaman. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, *WRKY41*, *WRKY70*, dan *WRKY1* dilaporkan dapat meningkatkan toleransi terhadap cekaman kekeringan pada tanaman tembakau transgenik dengan meregulasi penutupan stomata dan level ROS. Selain itu, Overekspresi *WRKY53* pada *Arabidopsis* menunjukkan penurunan toleransi terhadap cekaman garam. Sementara itu, beberapa gen *WRKY* terinduksi oleh cekaman kekeringan, sebagai contoh gen-gen *WRKY* dari kacang kedelai

meningkatkan toleransi cekaman abiotik pada tanaman *Arabidopsis* transgenik (Niu *et al.*, 2012; Phukan *et al.*, 2016).

WRKY53 merupakan kelompok faktor transkripsi *WRKY* grup III yang terinduksi saat cekaman kekeringan (Sun & Yu, 2015), sementara itu *WRKY17* diketahui berperan dalam mekanisme seluler terkait toleransi terhadap kekeringan melalui ABA *signaling*, penutupan stomata dan regulasi level ROS (Yan *et al.*, 2014). Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui perbedaan level ekspresi gen *WRKY17* dan *WRKY53* yang signifikan antar perlakuan. Kedua gen tersebut teramati mengalami peningkatan level ekspresi secara signifikan terhadap kontrol. Peningkatan level ekspresi paling tinggi terjadi pada kelompok perlakuan kitosan secara individu (Chi), untuk *WRKY17* dan *WRKY53* masing-masing sekitar 23 dan 52 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol, kemudian disusul kelompok kombinasi kitosan dan kekeringan (Chi-D) yaitu sekitar 10 dan 22 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol dan kelompok kekeringan (D) sekitar 4 dan 6 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol (Gambar 3). Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa *WRKY17* pada tanaman jagung mengalami peningkatan level ekspresi setelah 12 jam perlakuan kekeringan (Cai *et al.*, 2017). Namun demikian, Aziz *et al.* (2020) menyatakan bahwa *WRKY17* pada *C. annuum* cv. Lado mengalami penurunan level ekspresi sebesar 0,56 kali lipat lebih rendah dibandingkan kontrol setelah diberikan kombinasi kitosan dan kekeringan. Oleh sebab itu, diduga antara cabai merah cv. Laba dan Lado, yang diketahui memiliki perbedaan karakter ketahanan, menunjukkan peran yang berbeda terhadap cekaman yang diberikan.



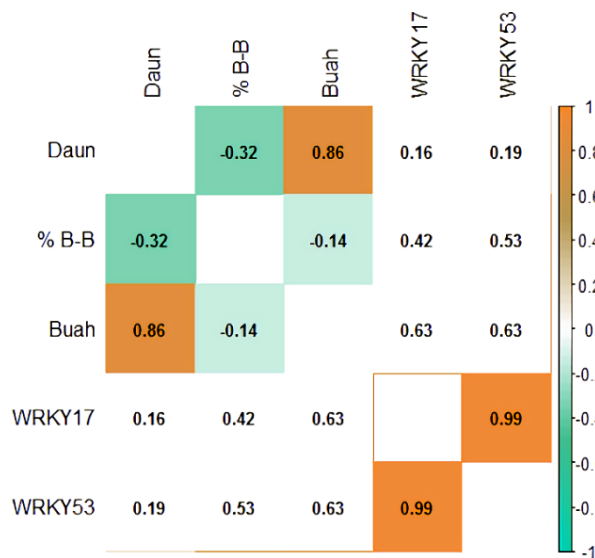
Gambar 3. Pengaruh kombinasi kitosan dan kekeringan terhadap level ekspresi gen *WRKY17* (A) dan *WRKY53* (B) tanaman cabai merah. Bar pada setiap kelompok perlakuan merepresentasikan standar error dari nilai rata-rata ($n = 3$). Nilai signifikan ditentukan oleh perbedaan huruf pada setiap bar dengan $p < 0,05$. Chi = 1 mg mL^{-1} kitosan; Chi-D = 1 mg mL^{-1} kitosan dan kekeringan; D = kekeringan; C = kontrol

Figure 3. The effect of chitosan and drought combination on the expression level of *WRKY17* (A) and *WRKY53* (B) genes on red chili plant. The bars represent the mean of each gene expression level with corresponding standard error ($n = 3$). Significant value is indicated by the letter on top of each bar, $p < 0,05$. Chi = 1 mg mL^{-1} chitosan; Chi-D = 1 mg mL^{-1} chitosan and drought; D = drought; C = control

Berdasarkan hasil penelitian, baik *WRKY17* maupun *WRKY53* selalu menunjukkan level ekspresi yang lebih tinggi pada perlakuan dengan kitosan yaitu sekitar 23 (Chi) dan 10 (Chi-D) kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol untuk *WRKY17* dan sekitar 52 (Chi) dan 22 (Chi-D) kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol untuk *WRKY53*. Yan *et al.* (2014) menyatakan bahwa pada kelompok overekspresi *WRKY17*, saat diberikan aplikasi *exogenous* ABA menunjukkan berkurangnya sensitivitas ABA *signaling* terhadap penutupan stomata. Sun & Yu (2015) menambahkan bahwa *WRKY53* diduga meregulasi buka-tutup stomata melalui 2 jalur yaitu dengan mereduksi kadar H₂O₂ untuk menghalangi penutupan stomata dan meningkatkan degradasi amilum menjadi malat untuk menjaga agar stomata tetap terbuka. Oleh sebab itu, diduga korelasi ekspresi *WRKY* terhadap performa pertumbuhan cabai merah cv. Lada berlangsung melalui jalur tersebut. Berdasarkan analisis korelasi, ditunjukkan bahwa antara gen *WRKY17* dan *WRKY53* memiliki korelasi positif sebesar $r = 0,99$. Dengan demikian, antar dua gen tersebut diduga memiliki peran sinergis dalam merespons cekaman yang diberikan melalui regulasi buka-tutup stomata. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Aziz *et al.* (2020), bahwa gen *WRKY17* dan *WRKY53* pada cabai merah cv. Lado menunjukkan korelasi negatif sebesar $r = -0,78$ setelah diberikan aplikasi kitosan saat kekeringan,

sehingga hasil tersebut membuktikan bahwa cabai merah cv. Lada menunjukkan respons yang berbeda dengan cv. Lado dalam menanggapi kombinasi perlakuan tersebut.

Faktor transkripsi *WRKY* terlibat dalam aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman, serta sensitif terhadap cekaman (Niu *et al.*, 2012). Pada kelompok Chi, stomata yang terbuka dapat berdampak positif terhadap pertumbuhan seiring tersedianya CO₂ sebagai bahan baku fotosintesis (Iriti *et al.*, 2009). Disisi lain, aplikasi kitosan diketahui berdampak positif terhadap pertumbuhan dan ketahanan tanaman terhadap cekaman, sehingga level ekspresi *WRKY* yang tinggi pada kelompok Chi diduga berkaitan dengan respons pertumbuhan yang teramati paling baik pada parameter jumlah daun dan jumlah buah dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini sejalan dengan hasil analisis korelasi yang mana antar dua parameter tersebut menunjukkan korelasi positif sebesar $r = 0,86$. Namun demikian, pada saat kekeringan (Chi-D & D) tanaman perlu melakukan mekanisme adaptif untuk mempertahankan ketersediaan air yang terbatas, sementara stomata yang terbuka dapat berakibat buruk bagi tanaman seiring terjadinya kehilangan air (Aziz *et al.*, 2020). Oleh sebab itu, hal tersebut memberikan indikasi bahwa ekspresi gen-gen *WRKY* berkorelasi positif dengan ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan dan respons tanaman dalam mempertahankan kesintannya.



Gambar 4. Analisis korelasi antar parameter setelah kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan pada tanaman cabai merah. Korelasi positif ditunjukkan dengan warna jingga, sementara korelasi negatif dengan warna hijau. Daun = jumlah daun; % B-B = konversi persentase bunga menjadi buah; Buah = jumlah buah; WRKY17 = level ekspresi gen *WRKY17*; WRKY53 = level ekspresi gen *WRKY53*

Figure 4. The correlation analysis among parameters after chitosan and drought treatments combination on red chili plants. The positive correlation is defined by the orange color, while the negative correlation is by the green. Daun = the number of leaves; % B-B = the percentage of flower to fruits conversion; Buah = the number of fruits; WRKY17 = the expression level of *WRKY17*; WRKY53 = the expression level of *WRKY53*.

Kesimpulan

Berbeda dari cv. Lado, tanaman *Capsicum annuum* cv. Laba yang diberikan aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ saat berada pada kondisi cekaman kekeringan menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan level ekspresi *WRKY17* dan *WRKY53*, yaitu sebesar 10 dan 22 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kontrol, secara berturut-turut. Namun demikian, penurunan respons pertumbuhan teramati pada parameter jumlah daun dan jumlah buah, yang kemudian diikuti parameter tinggi tanaman yang mana sejalan dengan kultivar tetuanya yaitu Lado yang juga menunjukkan respons penurunan karakter pertumbuhan. Namun, aplikasi kitosan secara individu teramati cenderung menunjukkan peningkatan produktivitas pada kultivar Laba.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) tahun 2018, Kementerian Keuangan Republik Indonesia. Benih cabai merah kultivar Laba diperoleh dari PT East West Seed Indonesia. Dr. Turhadi, M.Si., yang telah membantu dalam menganalisis data.

Daftar Pustaka

- Anjum SA, X Xie, L Wang, MF Saleem, C Man & W Lei (2011). Morphological, physiological, and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6(9), 2016-2032.
- Aziz MA, RE Esyanti, K Meitha, FM Dwivany & HH Chotimah (2020). Chitosan suppresses the expression level of *WRKY17* on red chili (*Capsicum annuum*) plant under drought stress. *Indonesian Journal of Biotechnology* 25(1), 52-60.
- Balitbang (2016). *Pengendalian Penyakit Antraknose pada Tanaman Cabai*. Juli 11, 2016 Diunduh dari <http://www.litbang.pertanian.go.id/berita/one/2630/> [21 Agustus 2017]
- Bistgani ZE, SA Siadat, A Bakhshandeh, AG Pirbalouti & M Hashemi (2017). interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* celak. *The Crop journal* 5, 407-415.
- Cai R, W Dai, C Zhang, Y Wang, M Wu, Y Zhao, Q Ma, Y Xiang & B Cheng (2017). the maize *WRKY* transcription factor *ZmWRKY17* negatively regulates salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 246(6), 1215-1231.
- Chookhongkha N, S Miyagawa, Y Jirakiattikul & S Photchanhai (2012). Chili growth and seed productivity as affected by chitosan. *International Conference on Agriculture Technology and Food Sciences (ICATFS)* 17-18 Nov 2012.
- Ding ZJ, JY Yan, GX Li, ZC Wu, SQ Zhang & SJ Zheng (2014). *WRKY41* controls arabidopsis seed dormancy via direct regulation of *ABI3* transcript levels not downstream of ABA. *The Plant Journal* 79, 810-823.
- Dorji K, MH Behboudian & JA Zegda-dominguez (2005). Water relations, growth, yield, and fruit quality of hot pepper under deficit irrigation and partial rootzone drying. *Scientia Horticulturae* 104(2), 137-149.
- Dzung NA, VTP Khanh & TT Dzung (2011). Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristic, growth, development, and drought resistance of coffee. *Carbohydrate Polymers* 84(2), 751-755.
- El-Tanahy AMM, AR Mahmoud, M Mona, Abde-Mouty & AH Ali (2012). Effect of chitosan doses and nitrogen sources on the growth, yield and seed quality of cowpea. *Australian Journal of Crop Science* 6(4), 115-121.
- Esyanti RR, FM Dwivany, S Mahani, H Nugrahapraja & K Meitha (2019). Foliar application of chitosan enhances growth and modulates expression of defense genes in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Aust J Crop Sci* 13(1), 55-60.
- Golldack D, C Li, H Mohan & N Probst (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unveiling the signal networks. *Frontiers Plant Science* 5(151), 1-10.
- Iriti M, V Picchi, M Possomi, S Gomasasca, N Ludwig, M Gargano & F Faoro (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany* 66(3), 493-500.
- Jang E, E Gu, B Hwang, C Lee & J Kim (2012). Chitosan stimulates calcium uptake and enhances the capability of chinese cabbage plant to resist soft rot disease caused by *Pectocacterium carotovorum* spp. *carotovorum*. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 30(2), 137-143.
- Jiang CH, ZY Huang, P Xie, C Gu, K Li, DC Wang, YY Yu, ZH Fan, CJ Wang, YP Wang, YH Guo & JH Guo (2015). Transcription factors *WRKY70* and *WRKY11* served as regulators in rhizobacterium *bacillus cereus* ar156-induced systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 1-18.

- Journot-Catalino N, Somssich, E Imre, D Roby & T Kroj (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulator of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 18, 3289-3302.
- Karimi S, H Abbaspour, JM Sinak & H Makarian (2012). Evaluation of drought stress and foliar chitosan on biochemical characteristics of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Research Journal of Biological Sciences* 7, 117-122.
- Kementerian Pertanian (2016). *Outlook Komoditas Pertanian Sub Sektor Hortikultura : Cabai*. Jakarta, Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, kementerian Pertanian.
- Khan AL, JH Shin, HY Jung & IJ Lee (2014). Regulation of capsaicin synthesis in *capsicum annum* L. by *Penicillium resedanum* LK6 during drought condition. *Scientia Horticulturae* 175, 167-173.
- Livak KJ & TD Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25(4), 402-408.
- Malekpoor F, AG Pirbalouti & A Salimi (2016). Effect of foliar application of chitosan on morphological and physiological characteristics of basil under reduced irrigation. *Research on Crops* 17(2), 354-359.
- Malerba M & R Cerana (2016). Chitosan effects on plant system. *International Journal of Molecular science* 17(996), 1-15.
- Maser P, N Leonhardt & JL Schroeder (2018). *The clickable guard cell: electronically linked model of guard cell signal transduction pathways*. Schroeder Laboratory, UCSD, diunduh dari laman <http://labs.biology.ucsd.edu/schroeder/clickablegc.html> [Desember 2018]
- Mondal MMA, MA Malek, AB Puteh, MR Ismail, M Ashrafuzzman & L Naher (2012). Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. *Australian Journal of Crop Science* 6(5), 918-921.
- Niu CF, W Wei, OY Zhou, AG Tian, YJ Hao, WK Zhang, B Ma, Q Lin, ZB Zhang, JS Zhang & SY Chen (2012). Wheat WRKY genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic arabidopsis plants. *Plant, Cell and Environment*, 1-15.
- Ohta K, S Morishita, K Suda, N Kobayashi & T Hosoki (2004). Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornament plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 73(1), 66-68.
- Phimchan P, S Techawongstein, S Chanthai & PW Bosland (2012). Impact of drought stress on the accumulation of capsaicinoids in capsicum cultivars with different initial capsaicinoid levels. *HortScience* 47(9), 1204-1209.
- Phukan UJ, GS Jeena & RK Shukla (2016). WRKY transcription factor: molecular regulation and stress responses in plants. *Frontiers In Plant Science* 7(760), 1-14.
- Pichyangkura R & S Chadchawan (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196, 49-65.
- Restiana S (2016). *Induksi Peningkatan Capsaicin Pada Cabai Merah (Capsicum annum L. cv. Gada F1) dengan Perlakuan Cekaman Air Untuk Peningkatan Ketahanan Terhadap Jamur Colletotricum acutatum* J. H. Skripsi, Institut Teknologi Bandung.
- Salachna P & Zawadzinska (2014). Effect of chitosan on plant growth, flowering, and corms yield of potted freesia. *Journal of Ecological Engineering* 15(3), 97-102.
- Sumarni N & A Muharam (2005). *Budidaya Tanaman Cabai Merah*. Bandung, Balai Penelitian Tanaman Sayur.
- Sun Y & D Yu (2015). Activated expression of *AtWRKY53* negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement. *Plant Cell Report*, 34(8), 1295-1306.
- Sung Y, YY Chang & NL Ting (2005). Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46(1), 35-42.
- Yan H, H Jia, X Chen, L Hao, H An & X Guo (2014). The cotton WRKY transcription factor *GhWRKY17* Functions in drought and salt in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production. *Plant and Cell Physiology* 55(12), 2060-2076.