

Peningkatan kadar *capsaicin* tanaman *Capsicum annuum* cv. Lado pada kondisi kekeringan menggunakan kitosan

The increase of capsaicin level on Capsicum annuum cv. Lado under drought condition using chitosan

Muhammad Abdul AZIZ^{1*)}, Sri WAHYUNI¹⁾, Fenny Martha DWIVANNY²⁾³⁾ & Rizkita Rachmi ESYANTI²⁾

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 16 Mar 2021 / disetujui tgl 19 Okt 2021

Abstract

Red chili pepper (Capsicum annuum) belongs to the vegetable with high economic value. However, drought stress decreases its survival, so that efforts to increase tolerance are needed. Chitosan is popular as a plant defense elicitor toward pathogen infection by inducing secondary metabolite synthesis of phenol group compounds such as capsaicin. This study aimed to determine the effect of 1 mg mL⁻¹ of chitosan on the capsaicin level increment and expression level of the PAL1 gene of red chili cv. Lado under drought conditions. At the onset of the generative phase, plants were subjected to treatments including chitosan (Chi), Chitosan-drought (Chi-D), drought (D) and control (C). Observations were carried out by measuring the PAL1 gene expression level, PAL enzyme activity and capsaicin level. The results showed that 1 mg mL⁻¹ chitosan application under drought conditions decreased PAL1 gene expression recorded at 0.61 and PAL enzyme activity at 0.94-fold compared to the control. Otherwise, the capsaicin level increased 2.46-fold compared to the control. Therefore, applying 1 mg mL⁻¹ chitosan on red chili plants under drought conditions was supposed to increase resistance towards pathogenic infections.

[Keywords: red chili pepper, PAL1 gene expression, secondary metabolite]

Abstrak

Cabai merah (*Capsicum annuum*) merupakan jenis sayuran yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Saat kekeringan, kemampuan bertahan hidup tanaman tersebut sering kali menurun, sehingga diperlukan upaya untuk meningkatkan ketahanannya. Kitosan dikenal sebagai elisitor ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen melalui induksi sintesis metabolit sekunder senyawa golongan fenol seperti *capsaicin*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ terhadap

peningkatan kadar *capsaicin* dan ekspresi gen *PAL1* tanaman cabai merah cv. Lado pada kondisi kekeringan. Serial perlakuan terdiri dari kitosan (Chi), kombinasi kitosan dan kekeringan (Chi-D), kekeringan (D) dan kontrol (C) yang diaplikasikan saat tanaman memasuki fase generatif. Parameter yang diamati meliputi analisis ekspresi gen *PAL1*, aktivitas enzim PAL dan kadar *capsaicin*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ saat kekeringan menurunkan level ekspresi gen *PAL1* 0,61 kali dan aktivitas enzim PAL 0,94 kali dibanding kontrol. Sebaliknya, kadar *capsaicin* meningkat 2,46 kali dibandingkan kontrol, sehingga aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ saat kekeringan diduga dapat meningkatkan ketahanan tanaman tersebut terhadap infeksi patogen.

[Kata Kunci: cabai merah, ekspresi gen *PAL1*, metabolit sekunder]

Pendahuluan

Cabai merah (*C. annuum*) merupakan tanaman yang tersebar luas dan sangat digemari hampir di seluruh dunia (Khan *et al.*, 2014). Hal ini disebabkan oleh kandungan nutrisi seperti protein, lemak, vitamin, serat serta *capsaicin* yang menimbulkan sensasi pedas dan bermanfaat bagi kesehatan (Arora *et al.*, 2011). Produksi cabai merah di Indonesia cenderung fluktuatif dan sering tidak dapat memenuhi kebutuhan pasar, sehingga berdampak pada kenaikan harga yang signifikan (KEMENTAN, 2016). Selain infeksi patogen, kekeringan juga merupakan salah satu faktor utama penyebab penurunan produktivitas yang signifikan pada komoditas ini. Oleh sebab itu, diperlukan solusi strategis untuk mengantisipasi berbagai stres lingkungan yang dialami tanaman. Pichyangkura & Chadchawan (2015) dan Malerba & Cerena (2016) menyatakan bahwa pemanfaatan material ramah lingkungan seperti kitosan untuk meningkatkan pertumbuhan sekaligus ketahanan tanaman menjadi terobosan yang menjanjikan untuk diaplikasikan di bidang pertanian.

Kitosan merupakan senyawa alami turunan dari kitin, polisakarida yang terdapat pada eksoskeleton kelompok *crustaceae* seperti udang, lobster, kepiting, dan juga dinding sel jamur maupun selongsong pupa *black soldier fly* (*BSF*) (Mondal *et al.*, 2012; Pichyangkura & Chadchawan, 2015; Wahyuni *et al.*, 2020). Kitosan dan derivatnya bersifat tidak beracun dan mudah terdegradasi oleh mikroba tanah, sehingga bersifat ramah lingkungan. Senyawa ini juga memiliki bioaktivitas antifungi, sehingga berfungsi sebagai biofungisida (Dzung *et al.*, 2011) yang aplikasinya dapat dilakukan dengan cara penyemprotan pada daun (*foliar spray*) serta penyalutan (*coating*) pada buah-buahan, sayuran, dan biji. Kitosan banyak dikembangkan potensinya sebagai biostimulan yang dapat meningkatkan pertumbuhan sekaligus produktivitas (Dzung *et al.*, 2011; Mukta *et al.*, 2017 & Mondal *et al.*, 2012) dan ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik maupun abiotik (Malerba & Cerena, 2016; Wahyuni *et al.*, 2019 & Aziz *et al.*, 2020a). Namun demikian, aktivitas kitosan yang diaplikasikan pada tanaman ketika tercekam belum banyak dipelajari.

Cekaman kekeringan merupakan salah satu stres lingkungan yang paling banyak terjadi khususnya di negara-negara tropis dan menjadi salah satu ancaman serius di bidang pertanian. Selama kekeringan, *reactive oxygen species* (ROS) seperti superoksida radikal, hidrogen peroksida, dan hidroksil peroksida diproduksi dalam jumlah berlebih sebagai *signal* terjadinya cekaman. Senyawa-senyawa tersebut bersifat toksik, sehingga tanaman akan merespons dengan memproduksi enzim-enzim antioksidan seperti katalase, peroksidase, dan polifenol oksidase untuk mendegradasinya (Khan *et al.*, 2014). Tingginya ROS berkaitan dengan sintesis *abscisic acid* (ABA) yang memediasi penutupan stomata, sehingga berakibat pada pertumbuhan maupun produktivitas yang terhambat (Iriti *et al.*, 2009; & Phimchan *et al.*, 2012). Sung *et al.* (2005) menyatakan bahwa kekeringan pada tanaman cabai dapat menyebabkan bunga dan buah muda berguguran, sedangkan buah yang mampu bertahan memiliki plasenta yang tebal dengan kadar *capsaicin* lebih tinggi. Kadar *capsaicin* yang meningkat saat kekeringan diduga merupakan salah satu respons ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen saat tercekam. Sementara itu, Khan *et al.* (2003) menambahkan bahwa salah satu mekanisme tanaman dalam meningkatkan ketahanan terhadap infeksi patogen adalah melalui regulasi metabolisme sekunder kelompok senyawa fenolik seperti *capsaicin*.

Capsaicin merupakan salah satu metabolit sekunder spesifik golongan fenol pada genus *Capsicum* yang disintesis melalui jalur *phenylpropanoid* dan *fatty acid*. Selain bertanggungjawab terhadap kepedasan dan ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen, senyawa ini juga sangat potensial digunakan di

bidang farmasi sebagai antiinflamasi, antioksidan, analgesik dan antikarsinogenik. *Capsaicin* dan *dihydrocapsaicin* merupakan komponen utama dari *capsaicinoid* yang disintesis dan terakumulasi di plasenta cabai (Gonzalez-zamora *et al.*, 2013). Kadar *capsaicin* pada plasenta cabai merah defisit air mulai meningkat secara signifikan pada 10 hari setelah berbunga (HSB), kemudian mencapai titik maksimum pada 30 HSB yaitu sekitar 3,84 kali lebih tinggi dibanding kontrol (Sung *et al.*, 2005). Khan *et al.* (2014) menyatakan bahwa peningkatan sintesis metabolit sekunder dapat meningkatkan toleransi stres abiotik. Selain itu, hasil penelitian sebelumnya juga mengungkapkan bahwa kadar *capsaicin* yang tinggi sejalan dengan peningkatan ketahanan tanaman terhadap infeksi *Colletotrichum capsici* (Kraikruan *et al.*, 2008), *Verticillium dahlia* dan *Phytophthora capsici* (Velooso *et al.*, 2013). Oleh sebab itu, akumulasi *capsaicin* dapat dijadikan sebagai salah satu parameter untuk mempelajari tingkat ketahanan tanaman cabai merah dalam merespons perubahan lingkungan.

PAL merupakan *family gene* yang terdiri dari 4 anggota yaitu *PAL1*, *PAL2*, *PAL3* dan *PAL4*. Gen *PAL* terekspresi hampir di semua organ tanaman cabai sebagai gen awal yang terekspresi pada jalur *phenylpropanoid*, *pathway* yang bertanggung jawab terhadap biosintesis metabolit sekunder golongan fenol seperti *capsaicin*. Masing-masing gen *PAL* terekspresi secara kuat pada organ tertentu sebagai respons baik terhadap perkembangan tanaman maupun cekaman lingkungan (Kim & Hwang, 2014). Gen *PAL* yang terekspresi kemudian ditranslasi menjadi protein aktif yaitu enzim *phenylalanine ammonia lyase* (*PAL*). *PAL* merupakan enzim yang berperan untuk mengkatalisis *phenylalanine* menjadi *cinnamic acid*. Kondisi stres kekeringan dapat memengaruhi aktivitas enzim *PAL* sebagai enzim pertama yang diaktifkan dalam biosintesis *capsaicin* (Sung *et al.*, 2005). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ terhadap peningkatan kadar *capsaicin* dan ekspresi gen *PAL1* tanaman cabai merah (*C. annuum* cv. Lado) pada kondisi kekeringan.

Bahan dan Metode

Persiapan bahan dan perlakuan

Studi pengaruh aplikasi kitosan dan kekeringan terhadap tanaman cabai merah (*C. annuum*) cv. Lado dilakukan di rumah kaca, ITB Bandung. Cabai merah cv. Lado merupakan komoditas komersil produksi PT. East West Seed Indonesia yang banyak dibudidayakan karena beberapa alasan seperti adaptif terhadap berbagai ketinggian lahan dan berpotensi menghasilkan 18-20 ton Ha⁻¹ (PT. Ewindo, tidak dipublikasikan). Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 3 ulangan. Perlakuan terdiri dari kitosan 1

mg mL⁻¹ (Chi), kombinasi kitosan 1 mg mL⁻¹ dan kekeringan (Chi-D), kekeringan (D) dan kontrol (C). Percobaan ini dilakukan selama ± 112 hari dengan rata-rata fotoperiodisasi adalah 12 jam, kelembaban udara 78,96%, intensitas cahaya 10.240 lux, dan suhu lingkungan ± 27,78°C. Cabai merah ditanam dalam *polybag* berisi 3 kg media yang terdiri dari campuran tanah, sekam dan pupuk organik (4 : 3 : 2, v / v / v). Bibit cabai disiram sebanyak ± 200 mL air pada fase perkecambahan untuk menjaga kelembaban media, kemudian 1 L setiap 2 hari ketika sudah dipindahkan ke dalam *polybag*, yaitu selama 7 minggu atau sebelum memasuki fase generatif (Aziz *et al.*, 2020b).

Ketika tanaman mulai memasuki fase pembungaan, ditandai oleh munculnya kuncup bunga, dilakukan perlakuan Chi, Chi-D, D dan C hingga 16 minggu setelah tanam (MST). Pada minggu ke 16 atau sekitar 55 HSB, dilakukan pengambilan sampel daun dan buah (Sung *et al.*, 2005). Sekitar 55 HSB merupakan waktu panen untuk tanaman cabai merah cv. Lado (PT East West Seed Indonesia, tidak dipublikasikan), sehingga pada fase tersebut diduga kadar *capsaicin* berada di titik puncaknya. Sampel daun digunakan untuk ekstraksi RNA dan analisis aktivitas enzim PAL, sedangkan sampel buah digunakan untuk analisis kadar *capsaicin*.

Larutan kitosan 1 mg mL⁻¹ yang disiapkan dengan mengacu pada Esyanti *et al.* (2019) dan Aziz *et al.* (2020a) disemprotkan satu minggu sekali dengan teknik *foliar spray* pada kelompok perlakuan Chi dan Chi-D. Perlakuan kekeringan dilakukan dengan memberikan penyiraman 50% dari kebutuhan yaitu 500 mL air setiap 2 hari yang diberikan pada kelompok perlakuan D dan Chi-D

(Dorji *et al.*, 2005). Penentuan kebutuhan air dilakukan dengan menghitung kapasitas lapang media yang digunakan (Aziz *et al.*, 2020b).

Ekstraksi RNA, amplifikasi dan analisis qPCR gen PAL1

RNA total diekstrak dari 50 mg sampel daun cabai merah menggunakan kit ekstraksi RNA (mini PureLinkTM RNA, Invitrogen). Integritas RNA divalidasi dengan instrumen elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% (b/v) yang ditambah *gelred*. Konsentrasi dan kemurnian RNA yang diperoleh ditentukan menggunakan spektrofotometer nanodrop (Eppendorf, biospectrometer). Perlakuan DNase dilakukan dengan menggunakan DNaseI (Thermo Scientific), sementara cDNA disintesis menggunakan iScript cDNA Synthesis Kit dari Bio-Rad. Setelah itu, kualitas cDNA divalidasi menggunakan gel agarosa 2% dengan *CaUbi3* sebagai gen referensi dengan primer spesifik (Tabel 1). Kondisi PCR (*thermal cycler*) dilakukan sesuai protokol pada Tabel 2.

Amplifikasi *PAL1* dilakukan menggunakan primer spesifik (Tabel 1). Setelah ukuran fragmen DNA hasil amplifikasi terkonfirmasi sesuai dengan primer yang didesain sebelumnya, dilakukan sekuensing melalui jasa Macrogen, Korea. PCR kuantitatif (qPCR) dilakukan menggunakan instrumen dari MyGo Pro dan pewarna dari Toyobo (Thunderbirds Sybr qPCR Mix QPS-201). Nilai *melting temperature* (TM) digunakan untuk mengetahui spesifisitas primer, sementara nilai siklus kuantifikasi (Cq) digunakan untuk mengukur level ekspresi gen target.

Tabel 1. Primer untuk gen *PAL1* and *CaUbi3*

Table 1. The *PAL1* and *CaUbi3* genes primers

Primer <i>Primer</i>	Nomor aksesori <i>Accession number</i>	Nucleotida (5' to 3') <i>Nucleotides (5' to 3')</i>	Ukuran (bp) <i>Size (bp)</i>
<i>PAL1</i> Forward	NM_001324603	TGGGCTTAATCTCATCAAGG	283
Reverse		TAGGTTGAGCTGCAGGTATC	
<i>CaUbi3</i> Forward	AY486137.1	TCCATCTGCTCTCTGTTGACG	201
Reverse		CCCCAAGCACAATAAGACATTGT	

Tabel 2. Protokol amplifikasi gen *PAL1* dan *CaUbi3*

Table 2. The amplification of *PAL1* and *CaUbi3* genes protocol

	Siklus PCR <i>PCR Cycles</i>				
	Denaturasi awal <i>Early denaturation</i>	Denaturasi <i>Denaturation</i>	Penempelan <i>Annealing</i>	Elongasi <i>Elongation</i>	Elongasi akhir <i>Late elongation</i>
Suhu <i>Temp.</i>	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C
Waktu <i>Time</i>	3'	30''	30''	1'	5'
Siklus <i>Cycles</i>	1x		35x		1x

Kuantifikasi level ekspresi gen target dilakukan melalui metode relatif menggunakan persamaan $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Perhitungan dilakukan dengan melakukan normalisasi terhadap nilai Cq gen referensi dan kelompok kontrol terlebih dahulu dengan mengikuti persamaan berikut (Livak dan Schmittgen, 2001):

$$\Delta\Delta Cq = (Cq_{gen\ target} - Cq_{gen\ ref.})_{sampel} - (Cq_{gen\ target} - Cq_{gen\ ref.})_{kalibrator/kontrol}$$

Analisis aktivitas enzim PAL

Aktivitas enzim PAL dianalisis berdasarkan metode Sung *et al.* (2005), dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 0,5 gr daun cabai dihaluskan menggunakan bantuan nitrogen cair, kemudian ditambahkan 3 mL buffer ekstraksi protein yang mengandung 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 15 mM β -mercaptoethanol, dan 50 mM asam askorbat. Sampel dihomogenkan dengan kecepatan tinggi selama 1 menit melalui bantuan vortex, kemudian disentrifus pada 7000 rpm selama 40 menit. Supernatan disentrifus kembali pada 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 5 mL buffer Tris-HCl 50 mM pH 8. Total protein diukur menggunakan metode Bradford (Bradford, 1976), yaitu dengan cara menambahkan 20 μ L ekstrak protein ke dalam 980 μ L reagen Bradford, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS (AMTAST AMV11) pada λ_{595} nm. BSA (*Bovine Serine Albumin*) digunakan sebagai larutan standar pada konsentrasi 0; 1; 2,5; 5; 10 dan 15 ppm.

Uji aktivitas enzim PAL dilakukan dengan mencampurkan 1 mL Tris-HCl 100 mM, 0,5 mL L-fenilalanin 10 mM, 0,4 mL air deion steril, dan 0,1 mL ekstrak protein. Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 mL HCl 6M. Sebanyak 7,5 mL dietil eter ditambahkan untuk mengikat senyawa polar. Campuran disimpan pada freezer -20°C. Setelah 2 fase terbentuk, dietil eter dibuang. Fase beku dikeringkan menggunakan freeze dryer selama 24 jam, kemudian dilarutkan dengan 3 mL NaOH 50 mM. Absorbansi diukur pada λ_{290} nm. Kuantifikasi aktivitas enzim PAL dilakukan dengan *cinnamic acid* sebagai standar pada konsentrasi 0; 0,3125; 0,625; 1,25 dan 2,5 ppm (Sung *et al.*, 2005).

Analisis kadar capsaicin plasenta cabai merah

Capsaicin diekstrak dari plasenta cabai menggunakan metode maserasi (Goci *et al.*, 2014). Kuantifikasi kadar *capsaicin* dilakukan dengan mengacu pada metode Sung *et al.* (2005) menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC, C-R7A Plus Chromatopac, Shimadzu). Plasenta dipisahkan dari buah cabai kemudian dikeringkan pada suhu 60°C selama 30 jam. Sampel dihaluskan dan dimaserasi

dalam 5 mL *ethanol* 96% selama 24 jam dengan bantuan *shaker*. Sampel yang telah dimaserasi selanjutnya disaring dalam gelas kimia 50 mL, kemudian diinkubasi pada suhu ruang agar *ethanol* menguap. Filtrat kering dilarutkan menggunakan 1 mL *methanol* 100% kemudian disaring kembali dengan kapas bebas lemak untuk segera diuji atau disimpan pada suhu 4°C.

Sebanyak 2,5 μ L ekstrak diinjeksi ke dalam sistem HPLC. Campuran asetonitril dan aqua bides pada rasio 6 : 4 (v : v) dengan laju aliran 0,7 mL per menit selama 12 menit per sampel digunakan sebagai fase gerak. Sebelum digunakan, asetonitril disaring menggunakan filter *polytetrafluoroethylene* (PTFE), sementara aqua bides disaring menggunakan membran nitroselulosa. Konsentrasi *capsaicin* ditetapkan dengan mengukur absorbansi pada λ_{280} nm, dengan larutan standar *capsaicin* (SIGMA, Lot #BCBJ2271V) pada konsentrasi 0; 125; 250; dan 500 ppm.

Analisis statistik

Perbedaan signifikansi antar perlakuan ditentukan dengan uji Tukey HSD ($p < 0,05$) menggunakan perangkat lunak R studio 3.5.2 (32/64 bit). Sementara pengaruh aplikasi kitosan, Kekeringan dan interaksi antar kedua perlakuan terhadap parameter level ekspresi gen *PAL1*, aktivitas enzim PAL dan kadar *capsaicin* dianalisis menggunakan Two-way ANOVA yang dilakukan menggunakan aplikasi IBM SPSS 22.

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh pemberian kitosan pada kondisi kekeringan terhadap level ekspresi dan aktivitas PAL

Hasil pengujian menunjukkan terbentuknya 2 pita (Gambar 1A) dengan kemurnian RNA (rasio λ_{260} dan λ_{280}) berkisar antara 2,12 – 2,14, sementara konsentrasinya berkisar antara 353,1 – 410,9 μ g mL⁻¹. Terbentuknya 2 pita dengan tingkat kemurnian tersebut menjadi syarat utama untuk memenuhi validitas pengujian, sementara konsentrasi RNA digunakan sebagai acuan dalam sintesis cDNA. Setelah total RNA diubah menjadi cDNA, selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan primer spesifik gen target.

Berdasarkan hasil studi secara *in silico*, dengan menggunakan primer spesifik (Tabel 1) akan diperoleh pita produk dengan ukuran sekitar 201 untuk *CaUbi3* dan 284 bp untuk *PAL1*. Pada penelitian ini, *CaUbi3* berperan sebagai gen referensi yang digunakan untuk normalisasi level ekspresi gen target serta untuk memvalidasi hasil sintesis cDNA (Livak & Schmittgen, 2001). cDNA yang berhasil disintesis terkonfirmasi dari satu pita yang terbentuk sesuai dengan ukuran yang didesain. Produk amplifikasi gen *PAL1* dan *CaUbi3* yang disertai dengan kontrol negatif (K-) divisualisasikan secara bersamaan (Gambar 1B).

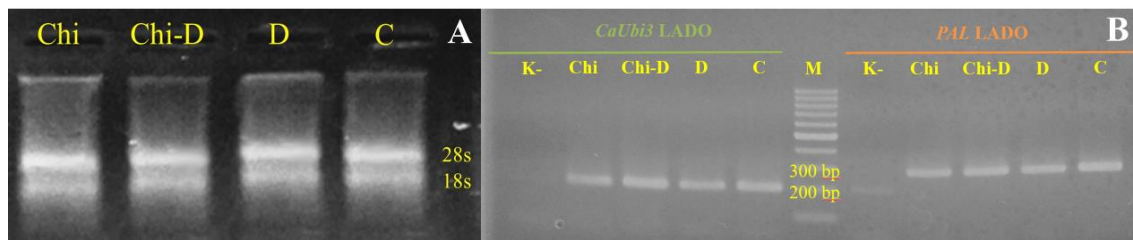
Setelah dilakukan analisis sekuensing menggunakan perangkat *basic local alignment searching tool* (BLAST), dihasilkan tingkat kesamaan (*identity value*) sebesar 97% terhadap gen *CaPAL1* (*accession number*: NM_001324603).

Nilai *Tm* (*melting temperature*) pada setiap sampel teramati pada satu nilai yang sama yaitu antara 85 – 90°C yang menandakan bahwa proses amplifikasi secara spesifik terjadi pada satu gen target (Gambar 2A). Sementara itu, *Cq* menunjukkan nilai siklus yang mana gen target pada sampel mengalami amplifikasi di fase eksponensial. Nilai *Cq* antara kelompok perlakuan dan *non template control* (NTC) dapat dijadikan sebagai acuan validitas reaksi pada proses qPCR. Nilai *Cq* pada kelompok NTC harus tidak terdeteksi atau terdeteksi dengan nilai lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan (Gambar 2B). Nilai *Cq* ini digunakan untuk mengkuantifikasi level ekspresi baik secara relatif maupun mutlak (Livak & Schmittgen, 2001).

Berdasarkan hasil kuantifikasi level ekspresi gen *PAL1*, dapat diketahui bahwa terjadi perbedaan level ekspresi yang signifikan pada setiap perlakuan. Namun demikian, jika dibandingkan dengan kontrol, terjadi penurunan level ekspresi pada setiap kelompok perlakuan. Level ekspresi yang teramati pada kelompok perlakuan kitosan saat kekeringan (Chi-D) adalah

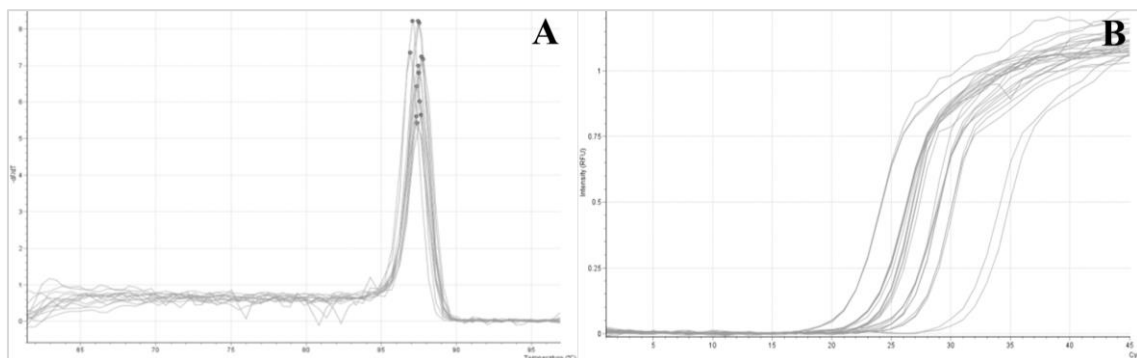
0,61 kali dibandingkan kontrol, kemudian disusul kelompok kitosan (Chi) dan kekeringan (D) secara berturut-turut yaitu 0,22 dan 0,10 kali dibandingkan kontrol (Gambar 3A). Hal tersebut tidak sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya pada kultivar yang lain. Telah dilaporkan bahwa level ekspresi gen *PAL* meningkat 12 kali oleh aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ (Mejia-teniente *et al.*, 2013) dan 3,61 kali karena cekaman kekeringan (Khan *et al.*, 2014) pada tanaman cabai.

Perubahan level ekspresi gen *PAL* merupakan salah satu respons ketahanan tanaman saat tercekam. Perbedaan respons ketahanan yang teramati berdasarkan hasil analisis level ekspresi *PAL1* pada tanaman cabai merah cv. Lado diduga terjadi karena pengaruh tingkat ketahanan dan perbedaan umur fisiologis antar kultivar tanaman. *C. annum* cv. Lado diketahui memiliki ketahanan yang rendah terhadap penyakit baik yang disebabkan oleh bakteri maupun jamur patogen dengan masa panen yang relatif panjang yaitu sekitar 100 - 120 hari setelah tanam (PT. East West Seed Indonesia, tidak dipublikasikan). Umur fisiologis tanaman cabai berkaitan dengan ketahanan terhadap infeksi patogen, karena biosintesis *capsaicin* sebagai salah satu regulator ketahanan berfluktuasi seiring dengan tingkat kematangan buah dan cekaman lingkungan (Sung *et al.*, 2005). *C. annum* cv. Laba diketahui memiliki ketahanan terhadap penyakit yang lebih



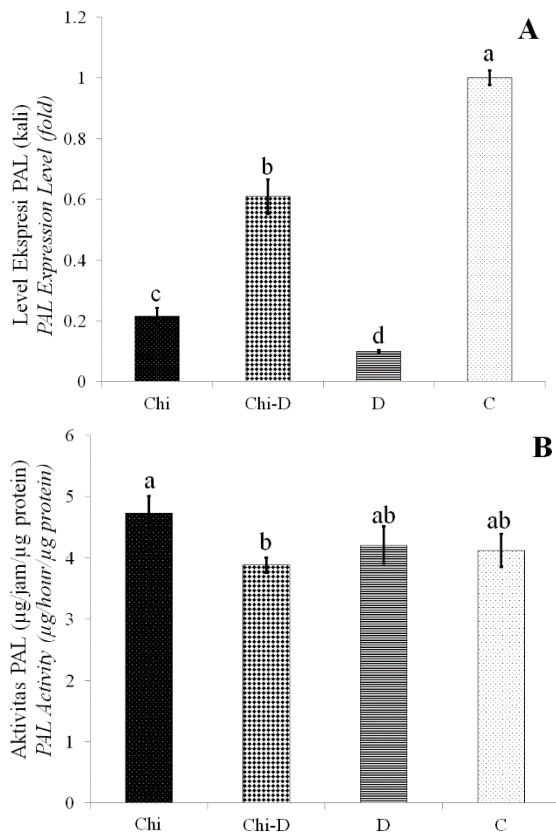
Gambar 1. Elektrofogram RNA total (A) dan hasil PCR gen referensi (*CaUbi3*) serta gen target (*PAL1*) tanaman cabai merah (*C. annum* cv. Lado) (B). Chi = kitosan; Chi-D = kombinasi kitosan dan kekeringan; D = kekeringan; dan C = kontrol; K- = kontrol negatif dan M = marker

Figure 1. The electroforegram of the total RNA (A) and PCR product of *CaUbi3* housekeeping gene and also *PAL1* gene of red chili pepper (*C. annum* cv. Lado) (B). Chi = chitosan; Chi-D = chitosan and drought; D = drought; C = control; K- = negative control; and M = marker



Gambar 2. Nilai *Tm* (A) dan *Cq* (B) pada proses amplifikasi gen target menggunakan sistem qPCR

Figure 2. *Tm* (A) and *Cq* (B) values on the amplification of the target gene using qPCR system



Gambar 3. Pengaruh kitosan saat kekeringan terhadap level ekspresi *PAL1* (A) dan aktivitas enzim PAL tanaman cabai merah (B). Bar pada setiap kelompok perlakuan menunjukkan nilai standar error dari nilai rata-rata ($n = 3$). Nilai signifikansi ditentukan oleh perbedaan huruf pada setiap bar pada taraf $p < 0,05$. Chi = kitosan; Chi-D = kombinasi kitosan dan kekeringan; D = kekeringan; dan C = kontrol

Figure 3. The effect of chitosan under drought condition to *PAL1* expression level (A) and PAL activity on red chili plant (B). The bars indicate the mean of each growth parameters with corresponding standard error ($n = 3$). Significance value is indicated by the difference letter on top of each bar, $p < 0.05$. Chi = chitosan; Chi-D = chitosan and drought; D = drought; C = control

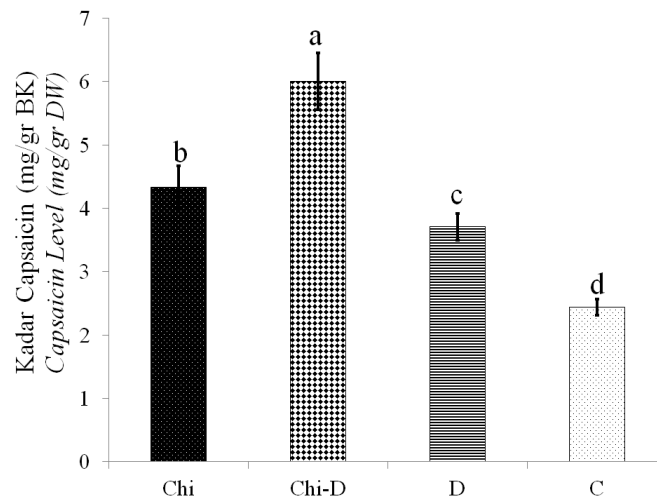
tinggi dibandingkan *C. annum* cv. Lado dengan masa panen yang lebih singkat yaitu sekitar 90-100 hari setelah tanam. Aziz *et al.* (2020a) menyatakan bahwa cabai merah cv. Lado teramat sangat responsif terhadap perlakuan kitosan, kekeringan, maupun kombinasinya yang ditunjukkan oleh perubahan level ekspresi gen-gen ketahanan seperti *WRKY17* dan *WRKY53*. Oleh sebab itu, diduga terdapat perbedaan fluktuasi level ekspresi gen *PAL1* selama fase pematangan buah setelah perlakuan kitosan, kekeringan, maupun kombinasinya pada kultivar Lado. Di samping itu, pada penelitian ini level ekspresi gen *PAL1* hanya diamati pada organ daun. Dengan demikian, diduga *PAL1* dari organ daun tidak responsif

terhadap perlakuan kitosan maupun kekeringan pada fase pematangan buah. Selain ditentukan oleh ekspresi gen *PAL1*, aktivitas enzim PAL dan kadar metabolit sekunder *capsaicin* juga ditentukan oleh level ekspresi gen *PAL* yang lain.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim PAL tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan kitosan (Chi) yaitu sebesar $4,73 \mu\text{g}/\text{jam}/\mu\text{g}$ protein, yang berbeda signifikan terhadap kelompok kombinasi kitosan dan kekeringan (Chi-D) yaitu $3,88 \mu\text{g}/\text{jam}/\mu\text{g}$ protein. Sementara itu, pada perlakuan kekeringan (D) dan kontrol (C) teramat sebesar 4,21 dan $4,14 \mu\text{g}/\text{jam}/\mu\text{g}$ protein secara berturut-turut (Gambar 3B). Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa aplikasi kitosan 1 mg mL^{-1} secara tunggal berpotensi untuk meningkatkan aktivitas enzim PAL. Hal ini didukung oleh Khan *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa aplikasi kitosan oligomer dapat meningkatkan aktivitas PAL pada daun tanaman kedelai yang diperkirakan berperan sebagai gejala awal terhadap stres, baik berupa elisitasi ataupun infeksi patogen. Aktivitas PAL pada kelompok Chi-D menunjukkan nilai terendah dan juga berbeda signifikan terhadap kelompok kitosan. Hal ini menandakan bahwa kombinasi aplikasi tersebut diduga dapat menurunkan aktivitas PAL. Fenomena ini diperkirakan terjadi karena stres berlebih yang dialami tanaman seiring kombinasi perlakuan yang diberikan. Stres yang terjadi pada tanaman dapat memicu peningkatan level *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebih, sehingga dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada protein, DNA, maupun lipid (Anjum *et al.*, 2011). Tinggi rendahnya aktivitas PAL akan berpengaruh terhadap jalur biosintesis metabolit sekunder golongan fenol yang melibatkan *phenylalanine* sebagai prekursor utamanya. Khan *et al.* (2014) menyampaikan bahwa PAL dan *capsaicin synthetase* (CS) merupakan 2 enzim kunci yang berperan dalam biosintesis *capsaicin*.

Pengaruh pemberian kitosan saat kekeringan terhadap kadar capsaicin

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi kitosan pada kondisi kekeringan (Chi-D) dapat meningkatkan kadar *capsaicin* secara signifikan, yaitu sebesar 2,46 kali dibanding kontrol. Jika dibandingkan dengan perlakuan kitosan (Chi) dan kekeringan (D), secara berturut-turut teramat peningkatan yang signifikan sebesar 1,39 hingga 1,62 kali lebih tinggi (Gambar 4). Hasil tersebut didukung oleh Sung *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa kekeringan 50% dapat meningkatkan kadar *capsaicin* di plasenta cabai merah sebesar 2,56 kali lebih tinggi dibanding kontrol. Selain itu, Khan *et al.* (2003) menambahkan bahwa aplikasi kitosan oligomer dapat meningkatkan kadar total fenol tanaman kedelai yang diperkirakan sejalan dengan peningkatan aktivitas enzim PAL. Dengan demikian dapat diketahui bahwa baik aplikasi kitosan (Chi) maupun kekeringan (D) berpotensi



Gambar 4. Pengaruh perlakuan kombinasi kitosan dan kekeringan terhadap kadar *capsaicin* cabai merah. Bar pada setiap kelompok perlakuan menunjukkan nilai standar error dari nilai rata-rata ($n = 3$). Nilai signifikansi ditentukan oleh perbedaan huruf pada setiap bar pada taraf $p < 0,05$. BK = berat kering; Chi = kitosan; Chi-D = kombinasi kitosan dan kekeringan; D = kekeringan; dan C = kontrol

Figure 4. The effect of kitosan and drought treatment combination to capsaicin level on red chili plant. The bars indicate the mean of each growth parameters with corresponding standard error ($n = 3$). Significance value is indicated by the difference letter on top of each bar, $p < 0.05$. DW = Dry weight; Chi = chitosan; Chi-D = chitosan and drought; D = drought; C = control

menyebabkan peningkatan kadar metabolit sekunder golongan fenol seperti *capsaicin*, kemudian kombinasi keduanya berpotensi menyebabkan peningkatan yang lebih tinggi.

Biosintesis *capsaicin* terjadi di dalam sel-sel epidermis plasenta yang diakumulasikan dalam bentuk *blister*, kemudian disekresikan menuju lapisan sel terluar *pericarp* buah cabai. Senyawa ini disintesis melalui kondensasi *vanillylamine* yang diperoleh dari jalur sintesis *phenylpropanoid* dan *fatty acid*. Jalur sintesis *phenylpropanoid* menentukan struktur fenol, sementara jalur *fatty acid* menentukan gugus lemak (Gonzalez-zamora *et al.*, 2013). Tahap awal dari jalur *phenylpropanoid* adalah sintesis *cinnamic acid* dari prekursor *phenylalanine* dengan menggunakan katalis *phenylalanine ammonia lyase* (PAL) yang terjadi baik pada batang maupun daun. Sementara untuk jalur asam lemak menggunakan asam amino *valine* sebagai prekursor. Gen *PAL* bertanggungjawab sebagai gen awal dalam produksi metabolit sekunder melalui jalur *phenylpropanoid*, sedangkan gen *CS* merupakan gen yang terekspresi di plasenta buah cabai dan berperan terhadap pembentukan *capsaicin* (Arora *et al.*, 2011; Kim & Hwang, 2014).

Berdasarkan hasil yang diperoleh, peningkatan kadar *capsaicin* yang signifikan pada perlakuan Chi-D diperkirakan karena respons sinergis oleh tanaman terhadap kombinasi perlakuan kitosan dan kekeringan (Iriti *et al.*, 2009), sehingga dapat menstimulasi respons ketahanan yang lebih tinggi dengan mensintesis metabolit sekunder *capsaicin* dalam jumlah berlebih. Hal ini sejalan dengan Khan *et al.* (2014) bahwa aplikasi jamur endofit *P.*

resedanum LK6 saat kekeringan secara signifikan dapat meningkatkan kadar *capsaicin* cabai merah yang diikuti dengan peningkatan ekspresi gen *PAL* dan *CS*. Kekeringan dan aplikasi kitosan pada umumnya dapat menginduksi jalur *signalling* yang sama yaitu melalui produksi *abscisic acid* (ABA) dan *jasmonic acid* (JA) (Golldack *et al.*, 2014; Pichayangkura & Chadchawan, 2015). Adanya JA dapat menginduksi aktifnya gen *PAL*, sementara tingginya ABA sejalan dengan peningkatan aktivitas enzim PAL (Wasternack, 2013; Ibrahim & Jaafar, 2013), sehingga diduga kadar *capsaicin* yang paling tinggi oleh aplikasi kitosan saat kekeringan berkaitan dengan jalur *signalling* tersebut.

Pada penelitian ini, rendahnya level ekspresi gen *PAL1* dan aktivitas enzim PAL tidak sejalan dengan peningkatan kadar *capsaicin* yang signifikan lebih tinggi pada kelompok perlakuan Chi-D. Fenomena ini dapat terjadi karena beberapa faktor seperti pengaruh waktu aplikasi, intensitas aplikasi dan konsentrasi kitosan (Mejia-teniente *et al.*, 2013) terhadap fluktuasi ekspresi gen-gen terkait ketahanan seperti *PAL*. Selain itu, diduga umur fisiologis tanaman juga berpengaruh terhadap fluktuasi ekspresi gen-gen ketahanan saat fase pematangan buah. Dengan demikian, pengambilan sampel daun yang dilakukan pada 55 hari setelah berbunga kemungkinan bukan saat dimana ekspresi gen *PAL1* berada pada titik kulminasinya. Selain itu, ekspresi gen *PAL* dan aktivitas enzim PAL dari organ lain baik akar maupun batang diperkirakan berkontribusi dalam menyumbang prekursor *cinnamic acid* yang merupakan produk dari aktivitas enzim PAL. Gonzalez-zamora *et al.* (2013) menyatakan bahwa

capsaicin terbentuk melalui jalur *phenylpropanoid* dan *fatty acid* yang melibatkan asam amino *phenylalanine* dan *valine* sebagai prekursor utama. Produk akhir dari 2 jalur biosintesis tersebut bertanggungjawab terhadap akumulasi *capsaicin*. Selain itu, Kim & Hwang (2014) menyatakan bahwa gen *PAL1*, *PAL2*, dan *PAL4* terekspresi kuat pada sel-sel yang mengalami lignifikasi, sementara ekspresi gen *PAL3* rendah.

Pemanfaatan potensi kitosan di bidang pertanian sebagai biostimulan pertumbuhan dan elisitor ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen menjadi terobosan yang menjanjikan (Pichyangkura & Chadchawan, 2015; Malerba & Cerena, 2016). Aplikasi kitosan terhadap cabai merah sebagai salah satu komoditas penting di Indonesia saat tercekam kekeringan memperkaya wawasan bagi ilmuwan maupun petani dalam mengeksplorasi potensi kitosan lebih dalam. Berdasarkan hasil studi, telah diungkapkan pengaruh kitosan dalam meningkatkan kadar *capsaicin* baik pada kondisi normal maupun kekeringan. Oleh sebab itu, hasil studi ini dapat menjadi rekomendasi bagi petani dalam memanfaatkan kitosan untuk meningkatkan ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen. Namun demikian, studi lebih lanjut dapat dilakukan untuk mempelajari aplikasi beberapa dosis kitosan pada kondisi cekaman yang berbeda, kemudian pengamatan terhadap karakter ketahanan tanaman dilakukan secara komprehensif pada beberapa umur fisiologis yang berbeda.

Kesimpulan

Perlakuan aplikasi kitosan 1 mg mL⁻¹ saat kekeringan dapat meningkatkan kadar *capsaicin* 2,46 kali dibanding kontrol, sehingga aplikasi kitosan diduga dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen saat kekeringan. Sementara itu, level ekspresi gen *PAL1* dan aktivitas enzim PAL pada organ daun tanaman cabai merah cv. Lado sedikit menurun. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mempelajari level ekspresi anggota *family gene PAL* lainnya (*PAL2*, *PAL3* dan *PAL4*) secara komprehensif dengan perlakuan kekeringan dan kitosan selama fase pematangan buah.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) tahun 2018, Kementerian Keuangan Republik Indonesia. Benih cabai merah kultivar Lado diperoleh dari PT East West Seed Indonesia (PT. Ewindo).

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.
- Arora RS, NG Gill, C Chauhan & A Rana (2011). An overview about versatile molecule *capsaicin*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 3, 280-286.
- Aziz MA, RE Esyanti & FM Dwivanny (2020a). Pengaruh kitosan terhadap peningkatan level ekspresi *WRKY17* dan *WRKY53* tanaman *Capsicum annuum* cv. Lada pada kondisi kekeringan. *Menara Perkebunan* 88(2), 120-129.
- Aziz MA, RE Esyanti, K Meitha, FM Dwivany & HH Chotimah (2020b). Chitosan suppresses the expression level of *WRKY17* on red chili (*Capsicum annuum*) plant under drought stress. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 25(1), 52-60.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 248-254.
- 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, 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, 751-755.
- 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.
- Goci E, E Haloci, K Vide & L Malaj (2013). Application and comparison of three different extraction methods of *capsaicin* from capsicum fruits. *Albanian Journal of Pharmaceutical Sciences* 1(1), 16-19.
- Golldack D, C Li, H Mohan & N Probst (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unveiling the signal networks. *Frontiers Plant Science* 151(5), 1-10.

- Gonzales-zamora A, E Sierra-campos, JG Luna-ortega, R Perez-morales, JC Ortiz & JL Garcia-hernandez (2013). Characterization of different capsicum varieties by evaluation of their *capsaicinoids* content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperature. *Molecules* 18, 13471-13486.
- Ibrahim MH & HZE Jaafar (2013). Abscisic acid induced changes in production of primary and secondary metabolites, photosynthetic capacity, antioxidant capability, antioxidant enzymes, and lipoxygenase inhibitory activity of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Molecules* 18, 7957-7976.
- Iriti M, V Picchi, M Possomi, S Gomarasca, N Ludwig, M Gargano & F Faoro (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany* 66, 493-500.
- KEMENTAN (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.
- Khan W, B Prithviraj, Smith & L Donald (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* 160, 859-863.
- Kim DS & BK Hwang (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signaling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany* 65(9), 2295-2306.
- Kraikruan W, S Sangchote, & S Sukprakarn (2008). Effect of *Capsaicin* on Germination of *Colletotrichum capsici* Conidia. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 42, 417-422.
- 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, 402-408.
- Malerba M & R Cerana (2016) Chitosan effects on plant system. *International Journal of Molecular science* 17, 996.
- Mejia-teniente L, FD Duran-flores, AM Chapa-oliver, I Torres-pacheco, A Cruz-hernandez, M Gonzalez-chavira, M Ocampo-valazquez, V Rosalia & RG Guevara-gonzalez (2013). Oxydative and molecular responses in *Capsicum annum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International Journal of Molecular Science* 14, 10178-10196.
- 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, 918-921.
- Mukta JA, M Rahman, AA Sabir, DR Gupta, MZ Surovy, M Rahman & MT Islam (2017). Chitosan and plant probiotics application enhance growth and yield of strawberry. *J Biocatal Agric Biotechnol* 11, 9-18.
- 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, 1204-1209.
- Pichyangkura R & S Chadchawan (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196, 49-65.
- Sung Y, Y Chang & N Ting (2005). *Capsaicin* biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46, 35-42.
- Veloso J, C Prego, MM Varela, R Carballeira, A Bernal, F Merino & J Diaz (2013). Properties of *capsaicinoids* for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biology* 16, 177-185.
- Wahyuni S, CA Yusup, DD Eris, SM Putra, AS Mulyani, Siswanto & Priyono (2019) Peningkatan hasil panen dan penekanan kejadian penyakit pada jagung manis (*Zea mays* var. Bonanza) dengan pemanfaatan biostimulan berbahan kitosan. *Menara Perkebunan* 87(2), 131-139.
- Wahyuni S, R Selvina, R Fauziyah, HT Prakoso, Priyono & Siswanto (2020). Optimasi suhu dan waktu deasetilasi kitin berbasis selongsong maggot (*Hermetia Illucens*) menjadi kitosan. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 25(3), 375-383.
- Wasternack C (2013). Action of jasmonates in plants stress responses and development – applied aspect. *Biotechnology Advances* 32(1), 31-39.