

Ekspresi Gen Penyandi *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) Cabai (*Capsicum annuum*) Sebagai Respons Terhadap *Fusarium oxysporum*

Yulita Wiwik Irana Dewi, Rejeki Siti Ferniah dan Sri Pujiyanto

Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika,
Universitas Diponegoro
Jl. Prof Soedharto, SH, Tembalang, Semarang 50275
E-mail : ferniah_mikro@yahoo.com

Abstract

The chili (*Capsicum annuum*) plant is one of the largest agricultural sectors in Indonesia. Many chili plants are cultivated by people in Indonesia until their production is exported abroad. But in 2015 chili production in Indonesia has decreased compared to previous years. The decline in chili production in Indonesia is caused by the attack of plant pest organisms, one of which is *Fusarium oxysporum* which causes plant fall disease. *F. oxysporum* is a fungus on the ground, and several strains of *Fusarium oxysporum* are pathogenic to plants and are difficult to control. PAL is an enzyme that catalyzes the change of phenylalanin to *ammonia* and *trans-cinnamic* which response to biotic and abiotic pressures such as pathogens, *UV radiation* and low temperatures. The purpose of this study is to determine the expression of the encoding gene *Phenylalanin Ammonia Lyase* (PAL) in chili (*Capsicum annuum*) in response to *Fusarium oxysporum*. The methods of this study include planting and maintenance of plants, inoculation of *F.oxysporum* to chili plants, chili RNA isolation, analysis of PAL gene expression using qRT-PCR and data analysis. The results of this study were that the expression of the PAL gene at the 6th hour was very high but it declined at the 48th and 96th hours. This study concluded that the *Phenylalanine Ammonia Lyase* encoding gene can be expressed on the capsicum annuum leaves but decreases with increasing time.

Keywords: *Capsicum annuum*, *Gene Expression*, *F. oxysporum*, *PAL*, *qRT-PCR*.

Abstrak

Tanaman cabai (*Capsicum annuum*) merupakan salah satu sektor pertanian terbesar di Indonesia. Tanaman cabai banyak dibudidayakan oleh masyarakat di Indonesia sampai produksinya diekspor ke luar negeri. Namun pada tahun 2015 produksi cabai di Indonesia mengalami penurunan dibandingkan tahun-tahun sebelumnya. Penurunan produksi cabai di Indonesia disebabkan karena adanya serangan organisme pengganggu tanaman salah satunya adalah *Fusarium oxysporum* yang menyebabkan terjadinya penyakit rebah tanaman. *Fusarium oxysporum* adalah jamur yang berada di tanah, dan beberapa strain *F. oxysporum* bersifat patogen terhadap tanaman dan bersifat sulit dikendalikan. PAL adalah enzim yang mengkatalis perubahan phenilalanin menjadi *ammonia* dan *trans-sinamat* yang merespon tekanan biotik dan abiotik seperti patogen, *UV radiasi*, dan suhu rendah. Tujuan dari penelitian ini yaitu, untuk mengetahui ekspresi gen penyandi *Phenylalanin Ammonia Lyase* (PAL) pada cabai (*Capsicum annuum*) sebagai respons terhadap *Fusarium oxysporum*. Metode dari penelitian ini meliputi penanaman dan pemeliharaan tanaman, inokulasi *F. oxysporum* ke tanaman cabai, isolasi RNA daun cabai, analisis ekspresi gen PAL dengan menggunakan qRT-PCR dan analisis data. Hasil dari penelitian ini adalah ekspresi gen PAL pada jam ke-6 terekspresi sedikit lebih tinggi daripada kontrol dan mengalami penurunan pada jam ke-48 dan ke-96. Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tidak ada peningkatan ekspresi gen penyandi *Phenilalanine Ammonia Lyase* pada daun tanaman cabai (*Capsicum annuum*) sampai dengan 96 jam setelah inokulasi.

Kata kunci : *Capsicum annuum*, , *Ekspresi gen*, *F. oxysporum*, *PAL*, *qRT-PCR*.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara agraris yang mayoritas penduduknya bermata pencaharian sebagai petani. Kesuburan tanah yang dimiliki oleh Indonesia menjadikan Indonesia sebagai salah satu penghasil sayur-sayuran terbesar yang hasilnya juga diekspor ke berbagai negara. Salah satu sektor pertanian yang cukup banyak di Indonesia adalah cabai. Jenis cabai yang dibudidayakan bermacam-macam, mulai dari cabai keriting, cabai rawit dan masih banyak lagi. Menurut Sulandari (2004) tercatat berbagai spesies cabai, namun hanya *Capsicum annuum* L. dan *C. frutescens* L. yang memiliki potensi ekonomis. Cabai yang dibudidayakan secara luas di Indonesia juga termasuk kedua spesies ini. Cabai besar dan cabai keriting misalnya, termasuk spesies *C. annuum* sedangkan cabai rawit termasuk *C. frutescens*.

Sejak tahun 2011 hingga 2017, pola produksi cabai besar terus meningkat. Kecuali pada tahun 2015 produksi cabai besar mengalami penurunan sebesar 2,59 persen dibandingkan tahun 2014. Pada tahun 2017 terjadi kenaikan produksi cabai besar yang signifikan dibandingkan dengan tahun 2016, dengan pertumbuhan sebesar 15,37 persen. Tahun 2017, produksi cabai besar mencapai 1,21 juta ton (BPS, 2017). Rendahnya produksi cabai disebabkan oleh berbagai macam faktor, salah satu di antaranya adalah serangan organisme pengganggu tanaman (OPT) berupa serangga dan mikroorganisme seperti virus, bakteri dan jamur (Warisno dan Dahana, 2010).

Salah satu penyebab penyakit tanaman adalah layu fusarium. Penyakit layu fusarium yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* merupakan penyakit yang serius yang dapat menurunkan pertumbuhan, hasil buah, kualitas, dan dapat mengancam produksi cabai. Jamur patogennya masuk ke dalam jaringan pembuluh melalui jaringan akar dan selanjutnya menggunakan pembuluh xilem sebagai jalan untuk secara cepat mengkoloni tanaman sehingga menyebabkan gejala layu yang khas (Wongpia et.al., 2010).

Infeksi gen yang bersifat patogen mampu menginduksi *Systemic Acquired Resistance* (SAR) dari tanaman. SAR merupakan sebuah respon sistemik pada tumbuhan yang terjadi akibat serangan seperti infeksi oleh patogen. Respon sistemik ini berupa rangsangan pada sel tumbuhan untuk mengaktifkan enzim-enzim ketahanan yang memproduksi senyawa anti patogen, di antaranya adalah enzim *Phenylalanine Amonia-Lyase* (PAL) (Amza et.al., 2011).

Metabolisme phenylpropanoid adalah satu proses spesifik yang menghasilkan produk asli

tumbuhan di antaranya isoflavonoid phytoalexin, lignin, pigmen flavonoid dan bahan lindungan UV seperti furanocoumarin. *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) adalah enzim yang terlibat dalam metabolisme phenylpropanoid dan menghasilkan lignin. Fenilpropanoid memiliki fungsi penting dalam beberapa jalur yang berbeda dalam pertahanan tanaman melawan patogen dan predator, dalam perlindungan dari radiasi UV, dalam sinyal transduksi dan komunikasi dengan organisme lain, dan sebagai molekul regulator (Gutierrez-Gonzalez et.al., 2010).

Metode genetika molekuler telah digunakan untuk menganalisis gen penyandi *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) secara fungsional dari peran mereka dalam pengembangan tanaman dan tanggapan terhadap rangsangan eksternal (Huang et.al., 2010). *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) berperan penting dalam pertahanan tanaman, yaitu terlibat dalam biosintesis asam salisilat (SA), sinyal penting yang terlibat dalam sistem pertahanan tanaman (Mauch-Mani et.al., 1996). Ekspresi gen penyandi *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) merespon berbagai tekanan lingkungan, termasuk infeksi patogen, perlukaan, penipisan nutrisi, radiasi UV, dan suhu ekstrim. Karena itu, penelitian tentang ekspresi gen yang terlibat dalam jalur biosintesis phenylpropanoid diperlukan untuk memberikan pemahaman yang lebih baik tentang mekanisme molekuler selama respon pertahanan. Kajian secara ilmiah mengenai infeksi *Fusarium oxysporum* tersebut sampai pada tingkat molekuler diperlukan untuk melihat ekspresi gen penyandi *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) pada cabai (*Capsicum annuum*) akibat infeksi *Fusarium oxysporum*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika (FSM) Universitas Diponegoro (UNDIP) dan Laboratorium Terpadu UNDIP. Waktu pelaksanaan penelitian adalah bulan Januari – Maret 2019.

a. Alat dan bahan

Alat-alat yang diperlukan antara lain rumah kaca, plastik bening kecil, plastik bening besar, *cup* plastik, sendok plastik, neraca analitik, sekop, penyiram, mortar, *paste*, *freezer*, *gel ice*, cawan petri, shaker, erlenmeyer, rak mikrotube, beker *glass*, lampu bunsen, ose tanam tajam, tabung *mikrosentrifuge* 1,5 ml, vortex, mikropipet, tip kuning, tip putih, tip biru, *autoklaf*, *sentrifuge*, hemositometer, *hand contour*, mikroskop, inkubator, *laminar air flow* (LAF), mesin *qRT-PCR*, *RotorGene-Q* (Qiagen), *nanodrop*, alat tulis, kamera, label.

Bahan yang digunakan antara lain benih tanaman cabai merah kultivar Lembang-1 dari Balai Penelitian Sayuran (Balitsa, Lembang, Indonesia), media tanam berupa tanah humus, pupuk NPK (nitrogen-fosfor-kalium), air untuk perawatan tanaman. Jamur *Fusarium oxysporum* koleksi Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro, PDA (*Potato Dextrose Agar*, Oxoid) digunakan sebagai medium pertumbuhan. PDB (*Potato Dextrose Broth*) digunakan untuk medium pertumbuhan jamur. Isolasi RNA cabai menggunakan *Plant RNA Mini Kit* (Geneaid), qRT-PCR menggunakan Bioline BIO-72001 SensiFAST™ SYBR® No-ROX One Step kit, 100 RXNS-1 Qty, primer CaBPR1 forward 5'-CTGGTGCCGTGAAGATGTGGGT-3' dan CaBPR1 reverse 5'-TACCACCCATTGTTGCACCGAA-3', primer 18sRNA forward 5'-GGGCGACTAATGAACCCCAA-3' dan 18sRNA revers 5'-AAGCACACGTCCGCTTGATA-3', alkohol 70%, lateks, tisu, plastik wrap, aluminium foil dan masker.

b. Inokulasi *F. oxysporum* ke Tanaman

Inokulasi *F. oxysporum* ke tanaman cabai dilakukan setelah tanaman cabai berusia 35 hst dengan dua perlakuan yaitu dengan perlakuan akar dengan perendaman dalam suspensi *F. oxysporum* dengan kerapatan 10^5 - 10^6 sel/ml dan tidak perlakuan (kontrol). Isolat *F. oxysporum* dari PDB diambil sebanyak 1 ml lalu diencerkan dengan menggunakan 9 ml *aquades* steril dalam erlenmeyer. Ambil 1 ml suspensi *F. oxysporum* lalu letakkan dalam hemositometer dan hitung dengan mikroskop kerapatan sporanya sampai mencapai kerapatan 10^5 - 10^6 sel/ml. Penghitungan kerapatan spora menggunakan hemositometer menggunakan standar penelitian dari Iskandar dan Suhendra (2012) yaitu 10^6 spora/ml. Kerapatan spora dihitung dengan hemositometer kemudian hasil yang diperoleh dihitung menggunakan rumus dari Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BBPPTP) Surabaya (2014) yaitu :

$$S = \frac{X}{L \times t \times d} \times 10^3$$

Keterangan :

- S : Kerapatan spora per ml larutan
- X : Rerata jumlah konidia pada kotak a,b,c,d,e
- L : luas kotak hitung ($0,04 \times 5 = 0,2 \text{ mm}^2$)
- t : kedalaman bidang hitung (0,1 mm)
- d : faktor pengenceran
- 10^3 : volume suspensi yang dihitung (1 ml = 10^3 mm^3)

Inokulasi pada tanaman cabai dilakukan setelah 30 hst dengan menggunakan metode rendam akar (Timmusk *et al.*, 2008). Benih lada yang berakar (berumur 10 minggu) dicabut kemudian diinokulasi cendawan endofit dengan cara merendam perakarannya ke dalam suspensi biakan cendawan endofit selama 24 jam. Tanaman cabai dicabut dari pot lalu akar dicuci dengan menggunakan air mengalir sampai tanah yang ada pada akar menghilang. Akar direndam di dalam larutan desinfektan yang terbuat dari 10 ml *bayclin* dan 990 ml *aquades* selama 1 menit, hal ini bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme dan cendawan yang menempel pada akar. Dalam penelitian Umesha (2006) benih didisinfeksi dengan natrium hipoklorit 0,5% selama 4 menit selanjutnya dicuci dengan air suling steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya akar direndam dalam *aquades* steril 1000 ml selama 1 menit. Setelah 1 menit akar lateral tanaman dilukai dengan menggunakan gunting kecil lalu direndam dalam suspensi *F. oxysporum* selama 20-30 menit.

Perlakuan kontrol dilakukan dengan cara mengeluarkan tanaman dari dalam pot lalu akar dicuci dengan air mengalir sampai bersih kemudian akar direndam ke dalam desinfektan yang terbuat dari 10 ml *bayclin* dan 990 ml *aquades* selama 1 menit, hal ini bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme dan cendawan yang menempel pada akar. Setelah itu akar dicuci dengan *aquades* steril kemudian ditanam dalam pot bunga yang berisi tanah steril.

c. Isolasi RNA Cabai

Isolasi RNA cabai dilakukan pada tanaman cabai yang telah diinokulasi dengan *F. oxysporum* dan dibandingkan dengan kontrol. Isolasi RNA dilakukan pada daun ke-3 dari ujung tanaman cabai pada hari ke-0, ke-2 dan ke-4. Proses isolasi RNA dilakukan dengan cara mengambil daun tanaman cabai dan ditimbang sebanyak 0.1g. Proses isolasi RNA total daun cabai dengan menggunakan *PLANT RNA Mini Kit* (Geneaid). Sebelum dilakukan isolasi RNA daun disimpan pada suhu -20°C overnight. Selanjutnya daun cabai digerus dengan menggunakan *mortar* dan *pestel* di atas *gel ice* hingga lumat, hal ini bertujuan agar RNA tidak terdegradasi. Setelah daun terhaluskan kemudian dipindah ke dalam tabung mikro (ukuran 1,5 ml).

Tahap lisis sel dilakukan dengan menambahkan 500 µl bufer PRB ke dalam tabung mikro dan campur dengan vortex. Sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit. Kolom filter ditempatkan dalam tabung koleksi 2 ml. Campuran sampel kemudian dipindahkan ke kolom filter. Setelah itu sampel disentrifuge selama 1 menit pada 4000 rpm kemudian kolom filter dibuang. Dengan hati-hati filtrat dipindahkan ke tabung mikrosentrifuge 1,5 ml baru.

Tahap RNA *binding* dilakukan dengan menambahkan $\frac{1}{2}$ volume etanol absolut ke filtrat (250 μ l) yang kemudian kocok dengan kuat. Kolom RB ditempatkan dalam tabung koleksi 2 ml kemudian campuran dipindah ke kolom RB. Sampel kemudian disentrifuge pada 12000 rpm selama 1 menit. Cairan bagian bawah tabung dibuang dan kolom RB dimasukkan ke tube koleksi 2 ml.

Tahap pencucian RNA dilakukan dengan menambahkan 400 μ l buffer W1 ke tengah kolom RB, setelah itu disentrifuge pada 12000 rpm selama 30 detik, cairan bagian bawah tabung kemudian dibuang lalu kolom RB diletakkan kembali ke tabung koleksi 2 ml. Sebanyak 600 μ l buffer pencuci ditambahkan ke tengah kolom RB lalu disentrifuge pada 12000 rpm selama 30 detik, cairan bagian bawah tabung dibuang dan kolom RB dimasukkan kembali ke tabung koleksi 2 ml. Sebanyak 600 μ l buffer pencuci ditambahkan ke tengah kolom RB lalu disentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Cairan bagian bawah tabung dibuang dan kolom RB dimasukkan kembali ke tube koleksi 2 ml. Tube koleksi 2 ml disentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan matriks kolom.

Tahap elusi RNA dilakukan dengan menempatkan kolom RB kering dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml yang bersih. Sebanyak 50 μ l air bebas RNase ditambahkan ke tengah matriks kolom. Selama 2-3 menit matriks kolom didiamkan untuk memastikan air bebas RNase benar-benar terserap. Dengan kecepatan 12000 rpm sampel disentrifuge selama 1 menit untuk mengelusi RNA yang dimurnikan.

Konsentrasi dan kemurnian total RNA diukur secara spektrofotometri menggunakan *NanoDrop instrumen* (Thermo Scientific NanoDrop 2000C Technologies, Wilmington, DE, USA) dan kemurnian dinilai menggunakan rasio A260 / 280 dan A260 / 230 yang ditentukan dengan NanoDrop (Zhang *et.al.*,2013).

d. Pengenceran RNA total

RNA hasil isolasi selanjutnya diukur konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan NanoDrop pada panjang gelombang 260/280. Setelah diketahui konsentrasi dan kemurniannya selanjutnya dilakukan pengenceran RNA total sebelum dilakukan PCR yang bertujuan agar konsentrasi dari sampel RNA relatif sama. Dalam penelitian Suciati. *et.,al* (2012) hasil total RNA sampel yang berhasil diisolasi diukur serapannya pada panjang gelombang 260 nm agar dapat ditentukan konsentrasi RNA total masing-masing sampel. Kadar RNA total ini digunakan untuk menyamakan jumlah RNA yang akan digunakan pada RT-PCR kurang lebih sama yaitu 50 ug tiap sampel

dengan cara mengatur volume dan pengenceran RNA total yang digunakan pada tiap campuran RT-PCR.

e. Ekspresi Gen PAL Secara Kuantitatif

Uji ekspresi gen PAL dilakukan pada tanaman cabai yang telah diinokulasi dengan *F.oxysporum* dan dibandingkan dengan kontrol. Analisis ekspresi gen CaPal dilakukan pada daun ke-3 dari ujung tanaman cabai pada hari ke-0, ke-2 dan ke-4. Reaksi qRT-PCR dilakukan dengan satu tahap reaksi Bioline BIO-72001 SensiFAST™ SYBR® No-ROX *One Step kit*, 100 RXNS-1 Qty. *One Step* qRT-PCR merupakan proses transkripsi balik dan PCR dalam 1 tabung PCR (Marinho *et.al.*,1998). Metode one step qRT-PCR merupakan metode menggunakan sampel RNA dengan sintesis cDNA langsung dalam mesin qRT-PCR. Metode qRT-PCR memiliki kelebihan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, cocok untuk tindakan kuantifikasi (Schwarzenbach *et.al.*,2014).

Analisis qRT-PCR dilakukan menggunakan kombinasi primer spesifik gen untuk cDNA. Proses amplifikasi gen *Phenylalanin Ammonia Lyase* dilakukan menggunakan primer CaBPR1 *forward* 5'-CTGGTGCCGTGAAGATGTGGGT-3' dan CaBPR1 *reverse* 5'-TACCACCCATTGTTGCACCGAA-3' (Zhang *et.al.*,2013). qRT-PCR dilakukan menggunakan SensiFAST™ SYBR® No-ROX *One Step kit*, 100 RXNS-1 Qty sesuai protokol. Setiap reaksi (20 μ L) terdiri dari 10 μ l 2x SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step Mix, 0,8 μ l primer *forward*, 0,8 μ l primer *reverse*, 0,2 μ l *Reverse transcriptase*, 0,4 μ l *RiboSafe RNase Inhibitor*, 16 μ l H₂O, dan 0,4 μ L *template*. Proses qRT-PCR dilakukan dalam 42 siklus yang terdiri dari 1 siklus pada suhu 45°C selama 10 menit untuk inaktivasi *Revers Transcriptase*, 1 siklus pada suhu 95°C selama 2 menit untuk aktivasi *polymerase*, 40 siklus pada suhu 95°C selama 5 detik untuk denaturasi, 60°C selama 10 detik untuk *annealing*, dan 72°C selama 5 detik untuk *extention*.

Gen normalizer yang digunakan adalah 18sRNA dengan primer *forward* 5'-GGGCGACTAATGAACCCCAA-3' dan *revers* 5'-AAGCACACGTCCGCTTGATA-3' (Ferniah *et.al.*,2015). Selama kuantitasi relatif, perubahan dalam ekspresi gen sampel diukur berdasarkan standar eksternal atau contoh referensi, juga dikenal sebagai kalibrator. Saat menggunakan kalibrator, hasilnya dinyatakan sebagai target atau rasio referensi (Medrano *et.al.*,2005).

Perhitungan ekspresi gen PAL pada kuantifikasi relatif dapat dilakukan dengan *comparative threshold cycle* (CT) (Joyce, 2002; Neuvians, 2004). Pada metode ini, nilai CT dijadikan dasar untuk mengkuantifikasi ekspresi gen PAL secara relatif terhadap gen lain yang berfungsi sebagai kontrol

internal. Gen kontrol atau standar internal yang digunakan dalam qRT-PCR adalah gen *housekeeping* yang terekspresi secara konstitutif. Gen *housekeeping* yang digunakan dalam qRT-PCR harus terekspresi dalam tingkat yang cukup tinggi agar mudah terdeteksi (Vatanavicharn, 2014).

Setelah proses amplifikasi diperoleh kurva disosiasi yang kemudian dianalisis ekspresi relatifnya dengan menggunakan metode yang membandingkan target Ct dengan nilai referensi yang dipilih, yaitu level ekspresi *housekeeping gene* yang pada penelitian ini menggunakan gen 18sRNA, dengan perhitungan $\Delta Ct = Ct \text{ target gene} - Ct \text{ housekeeping gene}$. Bila nilai ΔCt memiliki nilai positif maka nilai Ct gen target lebih besar daripada nilai 18sRNA (+ ΔCt) dan sebaliknya nilai negatif bila Ct gen target lebih rendah dari pada 18sRNA (- ΔCt). Perbandingan level ekspresi didapat dengan menggunakan rumus metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Humaryanto *et.al.*, 2017). Analisis ekspresi gen *Phenylalanine ammonia lyase* dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Rotor GeneQ Software version 2.1.1*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Isolasi RNA Daun Cabai Hari ke 0,2 dan 4

Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian RNA dapat dilihat pada tabel 4.1 :

Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian RNA hari ke 0, 2 dan 4 dengan Menggunakan NanoDrop.

Sampel	Konsentrasi	Unit	260/280
A. jam ke 0			
Kontrol	273,2	ng/μl	2,12
Kontrol UL	216,6	ng/μl	2,07
Perlakuan	323,5	ng/μl	2,06
Perlakuan UL	146,3	ng/μl	1,97
B. jam ke 48			
Kontrol	123,2	ng/μl	2,14
Kontrol UL	131,5	ng/μl	2,17
Perlakuan	200,7	ng/μl	2,15
Perlakuan UL	81,8	ng/μl	2,19
C. jam ke-96			
Kontrol	642,4	ng/μl	2,12
Kontrol UL	428,0	ng/μl	2,12
Perlakuan	480,9	ng/μl	2,09
Perlakuan UL	161,4	ng/μl	2,17

Pengukuran konsentrasi RNA didasarkan pada panjang gelombang 260 nm. Dari hasil pengukuran dapat dilihat bahwa sampel RNA total dari tanaman hari

ke 0, 2 dan 4 memiliki konsentrasi berkisar 81,8-642,4 ng/μl. Konsentrasi ini kemudian diencerkan menjadi 50 ng/μl dengan menambahkan *RNAse free water* dalam RNA. Pengenceran konsentrasi RNA total dilakukan karena dalam proses qRT-PCR jumlah *copy* cDNA harus sama sehingga RNA awal untuk mensintesis cDNA harus memiliki konsentrasi yang sama. Hamzah *et.al.*, (2018) menyatakan bahwa penggunaan konsentrasi cDNA pada uji ekspresi dengan metode RT-PCR memerlukan konsentrasi cDNA yang sama karena akan memengaruhi intensitas pita yang terbentuk. Konsentrasi dan kemurnian RNA setelah pengenceran dapat dilihat pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian RNA hari ke 0,2 dan 4 Setelah Pengenceran Menggunakan NanoDrop.

Sampel	Konsentrasi	Unit	260/280
A. jam ke 0			
Kontrol	32,2	ng/μl	1,45
Kontrol UL	41,7	ng/μl	2,14
Perlakuan	59,7	ng/μl	1,97
Perlakuan UL	43,9	ng/μl	1,96
B. jam ke 48			
Kontrol	48,2	ng/μl	2,15
Kontrol UL	51,0	ng/μl	2,21
Perlakuan	59,3	ng/μl	2,21
Perlakuan UL	49,1	ng/μl	2,23
C. jam ke-96			
Kontrol	58,8	ng/μl	2,20
Kontrol UL	48,3	ng/μl	2,21
Perlakuan	44,7	ng/μl	2,16
Perlakuan UL	52,2	ng/μl	2,20

Penentuan nilai Ct GOI dan Norm dapat dilihat pada lampiran. Hasil pengukuran diketahui bahwa kemurnian RNA total dari tanaman hari ke 0, 2 dan 4 adalah murni karena sampel RNA terbebas dari kontaminasi protein. Hal ini sesuai dengan Aranda *et.al.*, (2009) pengukuran kemurnian RNA pada nisbah A260/A280 seharusnya memberikan nilai 2.0 untuk menunjukkan bahwa sampel RNA yang diekstrak telah murni dari protein. Perbandingan 1.80 hingga 2.00 menunjukkan kemurnian yang cukup baik dan sedikitnya kontaminan protein dalam larutan ekstrak RNA. Setelah dilakukan pengenceran RNA selanjutnya dipilih konsentrasi RNA berdasarkan range terdekat sehingga untuk hari ke-0 dipilih kontrol ulangan dan perlakuan ulangan, hari ke-2 dipilih kontrol dan perlakuan ulangan dan hari ke-4 dipilih kontrol ulangan dan perlakuan untuk selanjutnya dianalisis tingkat

ekspresinya dengan menggunakan *Rotor GeneQ Software Version 2.1.1*

b. Ekspresi Gen Penyandi *Phenylalanine Ammonia Lyase* pada cabai Lembang-1 secara Kuantitatif

Perhitungan ekspresi gen PAL dilakukan secara kuantitatif relatif dimana ekspresi gen target dibandingkan dengan gen referensi. Medrano (2005) menyatakan bahwa selama kuantitasi relatif, perubahan dalam ekspresi gen sampel diukur berdasarkan standar eksternal atau sampel referensi, juga dikenal sebagai kalibrator.

Analisis qRT-PCR menggunakan *RotorgeneQ Software version 2.1.1* dapat dilihat pada tabel 4.3

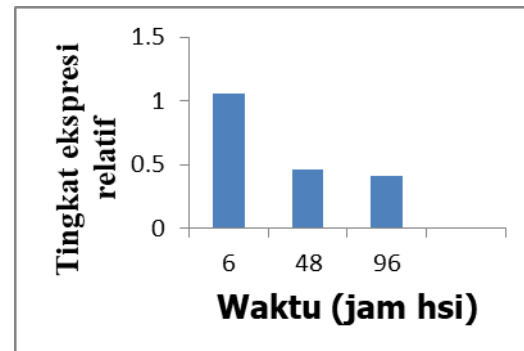
Tabel 4.3 Analisis qRT-PCR gen CaPal pada cabai Lembang-1

Ct H0					
Replicate name	GOI CT	Norm CT	Relative Conc.	Calibrator	Avg rel exp
K	17.99	13.05	1.00	Yes	1.00
P	17.88	13.04	1.06		1.06
Ct H2					
Replicate name	GOI CT	Norm CT	Relative Conc.	Calibrator	Avg rel exp
K	18.37	13.76	1.00	Yes	1.00
P	19.59	13.85	0.46		0.46
Ct H4					
Replicate name	GOI CT	Norm CT	Relative Conc.	Calibrator	Avg rel exp
K	19.74	14.41	1.00	Yes	1.00
P	20.10	13.47	0.41		0.41

*K = Kontrol, P = Perlakuan, GOI: gen target = *gene of interest*, Norm : gen normalisasi = *normalizer*

Hasil dari analisis menggunakan *RotorgeneQ Software version 2.1.1* menunjukkan bahwa nilai *relative conc.* Gen CaPal berkisar antara 0.41-1.06. Nilai Ct CaPal berkisar antara 17.88-20.10 dan nilai Ct 18s RNA berkisar antara 13.04-14.41. Nilai Ct menunjukkan siklus amplifikasi dimana sinyal *fluorescent* melewati batas ambang (*threshold*) yang ditandai dengan jumlah amplikon yang bertambah (Dewi *et.al.*, 2015). Nilai Ct digunakan untuk mengkategorikan tingkatan ekspresi. Budiman, *et.al* (2015) yang menyatakan bahwa nilai Ct dikategorikan bervariasi dari 15 sampai 40.

Berdasarkan tabel 4.2 maka dapat dibuat grafik ekspresi gen PAL yang ditunjukkan pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 Tingkat ekspresi gen PAL pada tanaman cabai Lembang-1 sebagai respon terhadap infeksi *Fusarium oxysporum*

Berdasarkan grafik dapat diketahui bahwa adanya perubahan pada tingkat ekspresi gen CaPal tanaman cabai Lembang-1 sebagai respons terhadap adanya infeksi *F. oxysporum* dengan kerapatan spora 4×10^6 sel/ml. Ekspresi gen CaPal paling tinggi terjadi pada jam ke-6 dan mengalami penurunan pada jam ke-48 dan jam ke-96. Menurut Zhang *et.al.*, (2013) perbedaan jaringan tanaman cabai rentan memiliki tingkat ekspresi CaPal yang berbeda dimana pada daun ekspresi CaPal tertinggi pada 96 hpi dan pada akar ekspresi CaPal tertinggi pada 48 hpi. Menurut (Hwang,

2014) ekspresi CaPal secara konstitusional jauh lebih tinggi di akar. Jaringan daun sehat tidak secara konstitutif mengekspresikan CaPal, namun dengan adanya patogen CaPal diinduksikan sangat kuat pada daun cabai. Menurut Hwang(2014) induksi CaPal dapat terjadi 5-25 jam setelah inokulasi. Vasconseulo *et.al.*, (2007) menyatakan bahwa pada saat tanaman berinteraksi dengan patogen, hama atau cekaman biotik dan abiotik, tanaman akan mengaktifkan berbagai mekanisme pertahanan, termasuk induksi biosintesis metabolit sekunder. Salah satunya adalah pembentukan fitoaleksin sebagai respon hipersensitif dan penebalan lignin yang terbentuk pada dinding sel sebagai pertahanan mekanik. Flavonoid salah satunya berfungsi melindungi tanaman dari berbagai cekaman biotik maupun abiotik (Pourcel *et.al.*, 2007). Senyawa lain yang dihasilkan akibat adanya cekaman biotik dan abiotik adalah asam absisat (Atkinson *et.al.*, 2012), dan etilen (Dreher, 2007). Berdasarkan referensi tersebut ekspresi gen CaPal pada jam ke-6 terekspresi sedikit lebih tinggi daripada kontrol dan mengalami penurunan pada jam ke-48 dan ke-96 karena respons pertama terjadi di akar yang terluka dimana akar berusaha untuk menutup luka dengan menghasilkan senyawa metabolit

berupa lignin. Ekspresi CaPal mengalami penurunan karena *Capsicum annuum* tidak mampu melawan serangan *Fusarium oxysporum*. Respon negatif ekspresi CaPal selaras dengan pengamatan morfologi bahwa setelah 35 hari tanaman layu dan tidak dapat melawan adanya infeksi patogen. Jika tanaman termasuk dalam tanaman yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* maka ekspresi CaPal lebih tinggi dari kontrol. Zhang *et.al.*, (2013) menyatakan bahwa pada tanaman cabai tahan menunjukkan tingkat ekspresi CaPal yang relative lebih tinggi dibandingkan tanaman cabai rentan. Ferniah *et.al.*, (2014) menyatakan bahwa berdasarkan tingkat keparahan penyakit, kultivar Lembang-1 menunjukkan tingkat keparahan tertinggi di antara kelima kultivar lainnya yaitu Branang, TM999, Kencana, Gantari dan Cipanas.. Keparahen penyakit yang mencapai 34,4% menempatkan kultivar tersebut pada golongan sangat rentan terhadap *F. oxysporum*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tidak ada peningkatan ekspresi gen penyandi *Phenilalanine Ammonia Lyase* pada daun tanaman cabai (*Capsicum annuum*) sampai dengan 96 jam setelah inokulasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro yang telah membantu atas terlaksananya penelitian ini, serta kepada Ibu Rejeki Siti Ferniah dan Bapak Sri Pujiyanto yang telah membimbing tugas akhir penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, S. (2008). *Techniques in Molecular Biology*. Lucknow: International Book Distributing Co.
- Agrios, G.N. (1988). *Plant Pathology*. 3rd ed. Academic Press Inc. San Diego, California.
- Ali, M. (2006). Chili (*Capsicum sp.*) Food Chain Analysis: Setting Research Priorities in Asia. Shanhu, AVRDC Publication, 06-678.
- Altinok H., H. C. Can., H.F. Boyaci., and V. Topcu. (2014). Genetic variability among breeding lines and cultivars of eggplant against *Fusarium oxysporum f. sp. melongenae* from Turkey. *Phytoparasitica*, 42(1): 75- 84.
- Amrullah. (2000). Tingkat Kandungan Klorofil Daun dan Kontribusinya Serta Pengaruh Pemupukan NPK Mg dan Pemberian Metanol Terhadap Kandungan Klorofil, Pertumbuhan dan Produktivitas Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annuum L.*). Program Pascasarjana. Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
- Amza R.D., A. Dharma., and A. Santoni. (2011). Respon Pertahanan Kultur Pisang Kepok (*Musa balbisiana cv. Kepok*) Terhadap Inokulasi *Fusarium oxysporum f.sp cubense*. Skripsi. Universitas Andalas.
- Aranda I.V.R., S. Dineen., R.L. Craig., and J.M. Robertson. (2009). Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 104 concentration range. *Anal Biochem*, 387(1): 122-127.
- Artico S., S.M Nardeli., O. Brilhante., M.F Grossi-de Sa., M.A Ferreira. (2010). Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biology*, 10(1): 49.
- Atkinson N.J., and P.E. Urwin. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10): 3523-3544.
- Badan Pusat Statistik R.I. Anonim. (2017). *Luas panen, produksi dan produktivitas cabai tahun 2014*. Anonim. (2017). *Statistik Tanaman Sayuran dan Buah-buahan Semusim*. Indonesia: Badan Pusat Statistik.
- Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan Surabaya. 2014. *Metode Perhitungan Jumlah Spora Cendawan*. Intruksi Kerja. Edisi 6 Februari 2014.
- Bayona L.G., A. Grajales., R. Sierra., M.C.C. Garcia., A. Bernal., P. Jimenez and S. Restrepo. (2011). *First Report of Fusarium oxysporum Causing Potato Dry Rot in Solanum tuberosum in Colombia*. Colombia: New Disease Reports 24: 14.
- BioRad. 2006. Real Time PCR Application Guide. BioRad Laboratories, Inc, USA.
- Budiman, F., A. Zoraya., & M. Nurhalim. (2015). The Existence of mRNAs and miRNAs Expression for Maintaining Cell Survival Networks Associated With The Human Transparent and Cataractous Lens. *Journal Ocular Biology*, 3(1): 8-14.
- Campbell N.A., J.B Reece and L.G Mitchell. (2002). *Biologi. Ed. ke-5. Terj. dari Biology, 5th ed*. Jakarta: Erlangga.
- _____. (2010). *Biologi. Ed. ke-8. Terj. dari Biology. 8th ed*. Jakarta :Erlangga.

- Chaman M.E., S.V. Copaja and V.H. Argandona. (2003). Relationships between salicylic acid content, *phenylalanine ammonia-lyase (PAL)* activity, and resistance of barley to aphid infestation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8): 2227–2231.
- Cyntya V.A., G.W Santosa., E. Supriyantini., dan S.Y Wulandari.(2018).Pertumbuhan Rumput Laut *Gracilaria sp.* dengan Rasio N:P yang Berbeda.*Journal of Tropical Marine*,1(1): 16-22.
- Dale J.W and M.V Schantz. (2002). *From genes to genomes*. Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Devi R.N. (2010). Budidaya Tanaman Cabai Merah. Tugas akhir.Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Dewi Y.A., C. Ahwil and M.Nurhalim. (2015). The Role of Myeloid Derived Suppressor Cells and CXCR4 Genes Expression for Nasopharyngeal Carcinoma Progression. *Journal of Scientific Research and Studies*, 2(8): 195-201.
- Ditjen Pertanian Tanaman Pangan. Anonim. (1991). *Direktorat Bina Produksi Padi dan Palawija Sub Direktorat pengawasan Mutu dan Sertifikasi Benih*. Jakarta: Petunjuk Pengawas Benih.
- Dixon R.A and N. Paiva. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7): 1085–1097.
- Dreher K and J. Callis. (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annals. of Botany*, 99(5): 787-822.
- Ferniah R.S., B.S Daryono., R.S Kasiamdari dan A. Priyatmojo. (2014). *Respon Ketahanan Tanaman Cabai Merah (Capsicum annuum L.) Indonesia terhadap Infeksi Fusarium oxysporum*. Yogyakarta: Pasca Sarjana Biologi UGM.
- _____.(2015).Expression of Class II Chitinase Gene in Chilli (*Capsicum annuum L.*) as Response to *Fusarium oxysporum* Pathogen Attack. *Asian Journal of Plant Pathology*, 9(3): 142-147.
- Gaffar, S. (2007). *Buku Ajar Bioteknologi Molekuler*. Bandung: Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Geneaid.2019. <http://www.geneaid.com/sites/default/files/RP14%20NEW.pdf> <http://www.geneaid.com/sites/default/files/RP14%20NEW.pdf> .Diakses pada tanggal 11 April 2019.
- Gutierrez-Gonzalez J., K. Satish., P. Lam Son.(2010). Differential Expression of Isoflavone Biosynthetic Genes in Soybean During Water Deficits. *Plant Cell Physiology*, 51(6): 936–948.
- Hahlbrock K and D. Scheel. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1): 347–369.
- Hallmann J., A. Quadt-Hallmann., W.F Mahaffee., J.W Kloepper. (1997). Bacterial endofites in agricultural crops. *Can J Microbiol*, 43(10): 895–914
- Hamzah M.Z., E.I Simbala Herny., dan Y. Aditya.2018.Pengujian Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Secara Molekuler Menggunakan Gen 16s rRNA Bakteri Simbion Endofit yang Diisolasi dari Alga Merah (*Galaxaura rugosa*).*Jurnal Ilmiah Farmasi*, 7(3): 294-301.
- Harpenas dan R.A Dermawan. (2010). *Budidaya Cabai Unggul*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hasanuzzaman M., F. Golam. (2011). Gene actions involved in yield and yield contributing traits of chilli (*Capsicum annuum L.*). *Aust. J. Crop Sci*, 5(13): 1868-1875.
- Herman R and R. Perl-Treves. (2007). Characterization and Inheritance of a New Source of Resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* Race 1.2 in *Cucumis melo*. *Plant Disease*, 91(9): 1180-1186.
- Hewindati dan Y. Tri . (2006). *Hortikultura*. Jakarta: Universitas Terbuka.
- Hibar K., M. Daami-Remadi, E.I Mahjoub M. (2007). Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* by *Trichoderma spp.* *Tunisian Journal of Plant Protection*, 2(1): 47-58.
- Huang J., M. Gu., Z. Lai., K. Shi., et.al. (2010). Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth,development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153(8): 1526–1538.
- Hutabarat and Jhon Calvein Donald. (2010). Analisis Ekspresi Gen Agamous2, Squamosa1, dan Egad1 Organ Reproduksi dan Vegetatif. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Intitut Pertanian Bogor.
- Hwang Dae Sung Kim & Byung Kook. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 65(1): 2295–2306.

- Iskandar D dan A. Suhendra.(2012). Uji Inokulasi *Fusarium* sp untuk Produksi Gaharu pada Budidaya *A. Beccariana*. *Sains dan Teknologi Indonesia*.14(3): 182-188.
- Jacobs A., R. Govender., S.W Heerden.(2013). *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici race 3 causing tomato wilt in South Africa. *Australasian Plant Dis*, 8(1): 145-147.
- Joyce, C. (2002). *Quantitative PCR: A Review of Current Methodologies. From Methods in Molecular Biology vol. 193: RT-PCR Protocols*. Totowa: Humana Press Inc.
- Kartasapoetra, A. (2003). *Teknologi Benih – Pengolahan Benih dan Tuntunan Praktikum*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Lee H., T. Ha., I. Baek., J. Ko., M. Im. (2009). Characterization of Isoflavones Accumulation in Developing Leaves of Soybean (*Glycine max*) Cultivars. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(2): 139-143.
- Livak K.J., T.D Schmittgen.(2008). Analyzing Real-Time PCR Data by THE Comparative CT Method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101-1108.
- Madigan M.T., J.M Martinko., J. Parker.(2000). *Brock Biology of Microorganisms*. New Jersey: Ninth Ed. Prentice Hall International, Inc.
- Marinho V.L.A., G. Kummert., G. Rufflard D. Colinet., P. Lepoivre.(1998). Detection of Apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as template for one-step RT-PCR. *Plant Dis*, 82(7): 785-790.
- Mauch-Mani B and A.J Slusarenko.(1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*, 8(2): 203-212.
- Medrano M.L., Wong and F. Juan.(2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1): 75-85.
- NCBI.(2018).<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400835>. Diakses pada tanggal 15 Oktober 2018.
- Neuvians M.W., T.C Pfaffl Ales., T.P Prgomet.(2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(1): 509-515.
- Nugraheni, E.(2010). *Karakterisasi Biologi Isolat-Isolat Fusarium sp pada Tanaman Cabai Merah (Capsicum annuum L.) Asal Boyolali*. Surakarta: Skripsi. Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Nugroho, B.(2013). Effectiveness Of Avirulent *Fusarium Oxysporum* F.Sp. *Cepae* in Controlling Fusarium Wilt Disease On Chili. *Jurnal AgriSains*, 4(7): 65-76.
- Pourcel L., J.M Routaboul., V. Cheynier., L. Lepiniec and I. Debeaujon. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci*, 12(1): 29-36.
- Putri, Dyah M.S.(2006). Pengaruh Jenis Media terhadap Pertumbuhan *Begonia imperialis* dan *Begonia 'Bethlehem Star'*. *Biodiversitas*, 7(2): 168-170.
- Raes J.R.A., J.H Christensen., Y. Van de Peer., W. Boerjan.(2003). Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(3): 1051-1071.
- Rosdiana N.S., P.R Sarjono., dan N.S Mulyani.(2013). Aktivitas *Fusarium oxysporum* dalam Menghidrolisis Eceng Gondok (*Eichhrnia crassipes*) dengan Variasi Temperatur. *Chem Info*, 1(1) :220-225.
- Schwarzenbach H., N. Nishida., G.A Callin., K. Pantel. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 11(1): 145-156.
- Semangun, H. (2000). *Penyakit-penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Setyaningsih I., Desniar dan E. Purnamasari. (2012). Antimikroba dari *Chaetoceros gracilis* yang dikultivasi dengan Penyinaran Berbeda. *Jurnal Akuatika*, 3(2): 183.
- Singleton P., D. Sainsbury.(2006). *Dictionary of microbiology and molecular microbiology*. New York: 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Suciati, Yulia., A.N Prijanti., M. Sadikin.(2012). Pola mRNA Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) dan Ekspresi Protein HIF-1 α Ginjal Tikus pada Hipoksia Sistemik Kronik. *Jurnal Kedokteran Yasri*, 20(1): 1-13.
- Sulandari, S. (2004). Karakterisasi Biologi, Serologi dan Analisis Sidik Jari DNA Virus Penyebab Penyakit Daun Keriting Kuning Cabai. *Disertasi SPs IPB. Bogor*.
- Suryanti I.A.P., Y. Ramona., M.W Proborini. (2015). Isolasi dan klasifikasi jamur penyebab layu dan antagonisnya pada tanaman kentang yang dibudidayakan di Bedgul Bal. *Jurnal Bali*, 17(2): 37-41.
- Sutedjo, Mul Mulyani.(2008). Pupuk dan Cara Pemupukan. Rineka Cipta. Jakarta.

- Timmusk P., V. West., N.A.R Gow and R. Paul Huffstutler. (2008). *Paenibacillus polymyxa* antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5): 1473-1481.
- Tjahjoleksono, Aris.(2014).*Teknologi DNA Rekombinan*.Jurusan Biologi FMIPA,Institut Pertanian Bogor.
- Umesha, S. (2006). Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Prot*, 25(4): 375–381.
- USDA.(2018).
<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=C AAN4>.Diakses pada tanggal 15 Oktober 2018.
- Vasconsuelo, A and R. Boland. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5): 861-875.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3, 2–20.
- Volpin, H., D.A Philips., Y. Okon and Y. Kapulnik.(1995). Suppression of an Isoflavonoid Phytoalexin Defense Response in Mycorrhizal Alfalfa Roots. *Plant Phvsiol*, 108(1): 1449-1 454
- Warisno dan K. Dahana. (2010). *Peluang Usaha dan Budidaya Cabai*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Wilkins, T.A & L.B Smart. (1996). *Ioslation of RNA from plant tissue Di dalam: A Laboratory Guide to RNA Isolation, Analysis and Synthesis*. New York: Wiley-Liss Inc.
- Wongpia A and K. Lomthaisong. (2010). Changes in the 2DE Protein Profiles of Chilli Pepper (*Capsicum annuum*) Leaves in Response to *Fusarium oxysporum* Infection. *Science Asia*, 36(1) : 259 - 270.
- Wuryandari, Y., S. Wiyatiningsih dan Maroeto.(2015).Formula Berbahan Aktif Pseudomoad Fluoresen dan Pengaruhnya Terhadap Perkembangan Penyakit Layu pada Cabai. *J HPT Tropika*, 15(1): 89-94.
- Yuan, J., W. Raza., Q. Shen and Q. Huang.(2012).Antifungal Aktivty of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum f.sp.cubense*.*Journal ASM.org*, 78(16): 5942-5944.
- Yuri.(2012).*Fusarium oxysporum*.
<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/06/fusarium-oxysporum.html>.Diakses pada tanggal 16 November 2018.
- Yuwono Triwibowo.(2005).*Biologi Molekuler*.Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gajah Mada.Yogyakarta.
- Zahara H., L.H Harahap. (2007). *Identifikasi jenis cendawan pada tanaman cabai (Capsicum annuum) pada topografi yang berbeda*. Bogor: Seminar Temu Teknis Pejabat Fungsional Non Peneliti. Bogor.
- Zhang, S., W. Raza., X. Yang., J. Hu., Q. Huang., Y. Xu., X. Liu., W. Ran., Q.Shen.(2008). Control of *Fusarium* wilt Disease of Cucumber Plants with The Application of A Bioorganic Fertilizer. *Biol Fertil Soils*, 44(8): 1073–1080.
- Zhang Y.L., D.W Li., Z..H Gong., J.E Wang., Y.X Yin and J.J Ji. (2013). Genetic determinants of the defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythiaceae). *Genetics and Molecular Research*, 12(3): 3605-3621.