

**KARAKTER MORFOLOGI, KANDUNGAN CAPSAICIN DAN
PROFIL GEN *KasI* CABAI RAWIT (*Capsicum frutescens* L.) G1
KONTROL DAN MUTAN G1M1**

SKRIPSI

oleh
DIKI RIZZAL FAUZI
145090107111015



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**KARAKTER MORFOLOGI, KANDUNGAN CAPSAICIN DAN
PROFIL GEN *KasI* CABAI RAWIT (*Capsicum frutescens* L.) G1
KONTROL DAN MUTAN G1M1**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

oleh
DIKI RIZZAL FAUZI
145090107111015



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

KARAKTER MORFOLOGI, KANDUNGAN CAPSAICIN DAN PROFIL GEN *KasI* CABAI RAWIT (*Capsicum frutescens* L.) G1 KONTROL DAN MUTAN G1M1

DIKI RIZZAL FAUZI
145090107111015

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 13 Juli 2013
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Prof.Dr.Ir. Estri Laras Arumingtyas, M.Sc.St.
NIP.19630818 198802 2 001

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP.19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Diki Rizzal Fauzi

NIM : 145090107111015

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi berjudul: Karakter Morfologi, Kandungan Capsaicin dan Profil Gen *KasI* Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi,
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi skripsi ini saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 20 Juli 2018,
yang menyatakan

Diki Rizzal Fauzi
145090107111015

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



KARAKTER MORFOLOGI, KANDUNGAN CAPSAICIN DAN PROFIL GEN *KasI* CABAI RAWIT (*Capsicum frutescens* L.) G1 KONTROL DAN MUTAN G1M1

Diki Rizzal Fauzi, Estri Laras Arumingtyas
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2018

ABSTRAK

Cabai G1M1 merupakan salah satu tanaman cabai rawit mutan hasil induksi mutasi dengan *ethyl methane sulfonate* (EMS) 0,01% terhadap cabai rawit Genotipe 1 (G1). Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi variasi karakter morfologi, menganalisis kandungan capsaicin, dan profil genetik gen *KasI* antara tanaman cabai rawit mutan G1M1 dan G1 kontrol. Pengamatan morfologi dilakukan ketika tanaman berumur 120 HST. Karakter yang diamati meliputi tinggi tanaman, jumlah cabang, hari pembungaan pertama, jumlah bunga pada setiap aksil, panjang dan diameter buah, jumlah biji, dan berat buah. Kandungan capsaicin diukur dari buah berumur antara 30-35 HSP, metode yang digunakan adalah metode spektrofometri ($\lambda 280$ nm). Profil gen *KasI* pada tanaman mutan dan kontrol dianalisis dengan metode sekuensing dan hasilnya akan disejajarkan serta dibandingkan dengan sekuens *Capsicum annuum 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (KasI) gene* (KM037709.1) pada NCBI. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tanaman mutan G1M1 memiliki karakter generatif dan tinggi tanaman yang berbeda signifikan dengan tanaman G1 kontrol, sedangkan karakter jumlah cabang, jumlah bunga pada setiap aksil, dan hari pembungaan mutan G1M1 tidak berbeda nyata dengan G1 kontrol. Kandungan capsaicin antara tanaman G1M1 tidak berbeda signifikan dengan kontrol, akan tetapi kandungan capsaicin G1M1 cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Gen *KasI* mutan G1M1 mengalami mutasi titik berupa substitusi. Substitusi ini menyebabkan terjadinya perubahan komposisi asam amino. Hal ini kemungkinan mengakibatkan peningkatan variasi kandungan capsaicin pada tanaman mutan G1M1.

Kata kunci: cabai, capsaicin, EMS, G1M1, *KasI*, morfologi

MORPHOLOGICAL CHARACTERS, CAPSAICIN CONTENT, AND GENETIC PROFILE OF *KasI* GENE OF CAYENNE PEPPER (*Capsicum frutescens* L.) G1 CONTROL AND G1M1

Diki Rizzal Fauzi, Estri Laras Arumingtyas
Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Brawijaya University
2018

ABSTRACT

Cayenne pepper G1M1 is one of mutant plant produced from cayenne pepper Genotype 1 (G1) induced mutation with 0.01% ethyl methane sulfonate (EMS). The aim of this research is to evaluate the variation of morphological characters, analyze of capsaicin content, and genetic profile of *KasI* gene between G1M1 mutant and G1 control. Morphological observations were performed at 120 DAP (day after planting). The observed characters included plant height, number of branches, first flowering, number of flowers on each axillar, length and diameter of the fruit, number of seeds, and weight of fruit. Capsaicin content measured from fruit at 30-35 DPA (day post anthesis) using spectrophotometry method ($\lambda 280$ nm). Genetic profile of *KasI* genes of mutant plants and controls was analyzed by sequencing method and the results aligned and compared with the sequence of *Capsicum annum KasI* (KM037709.1) on the NCBI. The results of this study indicate that G1M1 mutant plant has generative characters and plant height that significantly different with G1 control, while the character number of branch, the number of flowers on each axis, and the day of flowering G1M1 mutant is not significantly different with G1 control. Capsaicin content between G1M1 plants did not differ significantly with G1 control, but the capsaicin content of G1M1 tended to be higher than control. The *KasI* gene of G1M1 mutant shows the presence of substitution at some sites. This extinction causes the replacement of amino acid composition, this is one of possibility the causes of differences in the capsaicin content between plants.

Keywords: capsaicin, cayenne pepper, EMS, G1M1, *KasI*, morphology

KATA PENGANTAR

Segala puji atas kehadiran Allah Yang Maha Esa akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Estri Laras Arumingtyas, M.Sc.St. selaku dosen pembimbing yang telah mendampingi dan memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. Dr. Ir. Retno Mastuti, M.Ag.Sc., D.Ag.Sc dan Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberikan saran yang bermanfaat demi penyusunan skripsi ini.
3. Orang tua penulis atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang tidak terkira.
4. Wahyuningyan Arini, Ayu Zahrotul Fuadati, Nur Rahmattullah, Rekan-Rekan Biologi Angkatan 2014 “AMINO 2014”, anggota *Working Group* Capsicum dan ELFIL, serta seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulisan skripsi ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 20 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR LAMBANG DAN BILANGAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Cabai Rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.)	5
2.2 Syarat Tumbuh Cabai Rawit	6
2.3 Morfologi Cabai Rawit G1 (Cakra Hijau)	7
2.4 <i>Ethyl Methane Sulfonate</i> (EMS)	9
2.5 Senyawa Capsaicinoid Pada Buah Cabai	11
2.5.1 Capsaicin (<i>8-metil-N-vanilil-6-nonenamida</i>) dan Biosintesis	12
2.5.2 Pengukuran Kandungan Capsaicinoid	14
2.6 <i>3-oxoacyl-ACP (acyl carrier protein) synthase (KasI)</i> ...	14
2.7 Analisis Variasi Genetik pada Tanaman	15
BAB III METODE PENELITIAN	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Penyemaian Biji Dan Penanaman Bibit Cabai Rawit	17
3.3 Analisis Morfologi	18
3.4 Analisis Fisiologi	19
3.4.1 Pengukuran Kandungan Capsaicin	19
3.5 Analisis Pofil Gen <i>KasI</i>	20
3.5.1 Isolasi DNA	20
3.5.2 Uji kualitatif dan kuantitatif	21
3.5.3 Amplifikasi Gen <i>KasI</i>	22



3.6 Analisis data	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1 Karakter Morfologi Tanaman Cabai Rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1	24
4.2 Kandungan Capsaicin Tanaman Cabai Rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1	33
4.3 Similaritas Cabai Rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1.....	36
4.4 Profil Gen <i>KasI</i> pada Cabai Rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1	39
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	52



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Perubahan basa dan asam amino pada sekuens gen <i>KasI</i> masing-masing tanaman dibandingkan dengan sekuens <i>Capsicum annuum KasI gene, KasI-a allele, complete cds</i>	43



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Karakter morfologi cabai rawit G1	8
2	Rumus kimia <i>Ethyl Methane Sulfonate</i> (EMS)	9
3	Morfologi tanaman mutan hasil induksi EMS pada <i>Capsicum annuum</i> L.	10
4	Struktur kimia senyawa capsaicin	12
5	Biosintesis capsaicin	13
6	Illustrasi cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) ...	18
7	Karakter vegetatif cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 kontrol dan mutan G1M1: Tinggi tanaman dan jumlah cabang tanaman pada umur 120 HST	25
8	Karakter Jumlah bunga tiap aksil (120 HSP) dan hari pembungaan tanaman cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 kontrol dan mutan G1M1	28
9	Ukuran buah cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 kontrol dan mutan G1M1 pada umur 30 HSP	29
10	Karater buah cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 kontrol dan mutan G1M1: Jumlah biji dan berat buah umur 30 HSP	31
11	Kandungan capsaicin tanaman cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 kontrol dan mutan G1M1 pada umur 30 HSP	35
12	Dendrogram similaritas tanaman cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 kontrol dan mutan G1M1	37
13	Profil gen <i>KasI</i> antara cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1 yang mengalami mutasi	41
14	Profil asam amino gen <i>KasI</i> tanaman cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) mutan G1M1 dan G1 kontrol yang mengalami perubahan	42



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Absorbansi dan kurva standard larutan standard capsaicin	52
2	Tanaman cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 kontrol dan mutan G1M1	53
3	Hasil uji normalitas dengan <i>One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test</i>	54
4	Uji beda menggunakan metode uji t independen (<i>pada parameter yang memiliki data dengan distribusi normal</i>).....	56
5	Uji beda menggunakan metode uji Mann-Whitney..	57
6	Kategori dari karakter morfologi dan fisiologi (kandungan capsaicin) tanaman cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) berdasarkan IPGRI, AVRDC, & CATIE (1995), Arisha dkk. (2015) dan Usman dkk. (2014)	58
7	Scoring karakter morfologi dan kandungan capsaicin tanaman tanaman cabai rawit (<i>Capsicum frutescens</i> L.) G1 kontrol dan mutan G1M1	59
8	Hasil uji kuantitatif DNA dengan metode spektrofotometri	60
9	Visualisasi hasil isolasi DNA genome dengan metode elektroforesis gel agarose (1%)	61
10	Visualisasi hasil amplifikasi gen <i>KasI</i> dengan metode elektroforesis gel agarose (1%); marker 1/1000 bp	61
11	Hasil <i>aligment</i> gen <i>KasI</i>	62
12	Hasil analisis sekuen gen <i>KasI</i> tanaman cabai G1M1 dan G1 kontrol dengan <i>Capsicum annum</i> dengan <i>Basic Local Alignments Search Tool</i> (BLAST)	63



DAFTAR LAMBANG DAN BILANGAN

<u>Simbol/Bilangan</u>	<u>Keterangan</u>
A ₂₃₀	absorbansi 230 nm
A ₂₆₀	absorbansi 260 nm
A ₂₈₀	absorbansi 280 nm
CI	<i>cloroform isoamilalkohol</i>
CTAB	<i>cetyltrimethylammonium bromide</i> [N(CH ₃) ₃] ⁺ Br ⁻]
ddH ₂ O	akuabides
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)
EMS	<i>ethyl methane sulfonate</i>
F ₂	keturunan generasi kedua
G1 Kontrol	genotip 1 <i>original type</i> (kontrol)
G1M1	genotip 1 mutan 1 (tanaman mutan EMS 0,01 % ke-1)
HSP	hari setelah pembungaan
HST	hari setelah tanam
<i>KasI</i>	<i>3-oxoacyl-<i>acp</i> (acyl carrier protein) synthase</i>
PCI	<i>phenol cloroform isoamilalkohol</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>puissance d'hydrogene</i> (tingkat keasaman larutan)
RNA	ribonucleic acid
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA
UV-Vis	ultraviolet visual
v/v	volume per volume
<u>Simbol/Bilangan</u>	<u>Keterangan</u>
μl	mikroliter
bp	<i>base pair</i>
M	molar
mM	milimolar
nm	nanometer
ppm	<i>part per milion</i>
rpm	rotasi per menit

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) merupakan salah satu komoditas pangan yang banyak digunakan dan dikembangkan di negara-negara tropis, termasuk di Indonesia. Pada bidang kuliner cabai rawit banyak digunakan sebagai bumbu masakan dan pemberi sensasi pedas. Cabai rawit juga dimanfaatkan pada bidang medis dan farmasi karena terdapat senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya yang memiliki fungsi sebagai obat untuk penyakit diabetes, obesitas, kanker, dan lain sebagainya (Ikpeme dkk., 2014). Selain itu, senyawa yang terkandung dalam buah cabai rawit diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antikanker, antibakteri, anti-inflamasi dan lain sebagainya (Rizki, 2013).

Banyaknya pemanfaatan tanaman ini menyebabkan permintaan terhadap cabai rawit ini semakin meningkat, akan tetapi permintaan yang tinggi ini tidak diimbangi dengan pasokan cabai yang memadai sehingga seringkali cabai rawit mengalami kenaikan harga yang sangat tinggi. Salah satu penyebab kenaikan harga yang sangat tinggi, seperti yang diketahui bahwa cabai rawit juga merupakan tanaman yang sangat sensitif terhadap perubahan musim, pada musim kemarau cabai rawit cenderung dapat tumbuh dan berkembang dengan baik, sedangkan pada musim hujan cenderung lebih rentan terserang penyakit tanaman dan mati (Rukmana, 2002).

Cabai rawit memiliki karakter yang khas yaitu buah yang pedas. Penyebab rasa pedas pada cabai rawit adalah adanya senyawa capsaicinoid (Mazourek dkk., 2009). Capsaicinoid merupakan senyawa golongan alkaloid yang terakumulasi dalam plasenta dari buah dan senyawa tersebut diketahui memiliki aplikasi luas dalam bidang kuliner, obat-obatan, dan farmasi (Prasad dkk., 2005). Sekitar 80-90% dari capsaicinoids terdiri atas capsaicin dan dihydrocapsaicin, dalam rasio sekitar 1:1 atau 2:1. Sisanya terdiri dari senyawa capsaicinoid lain seperti nordihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin, homocapsaicin, norcapsaicin, dan nornorcapsaicin (Curry dkk., 1999). Senyawa capsaicin merupakan senyawa yang akumulasinya paling banyak ini dibandingkan dengan senyawa capsaicinoid lain. Senyawa ini memiliki sifat iritan, tidak berbau, tidak larut dalam air (larut dalam lemak), selain itu senyawa

ini juga mampu menimbulkan sensasi panas dan sensasi terbakar apabila mengenai jaringan kulit mamalia, termasuk manusia (Rizki, 2013). Tanaka dkk. (2017) juga menjelaskan bahwa jumlah zat capsaicin yang terkandung dalam buah cabai rawit maupun tanaman dari genus *Capsicum* lainnya berkorelasi positif dengan tingkat kepedasan (*pungency*), semakin banyak zat capsaicin yang dihasilkan maka tingkat kepedasannya juga akan semakin tinggi dan semakin sedikit zat capsaicin yang dihasilkan maka tingkat kepedasannya akan semakin rendah. Setiap spesies dan varietas tanaman cabai memiliki kandungan capsaicin dan tingkat kepedasan yang berbeda (Mubarokah dkk., 2015). Salah satu penyebab perbedaan kandungan capsaicin dan tingkat kepedasan ini adalah karena antara satu spesies atau varietas tanaman cabai memiliki variabilitas genetik (Usman dkk., 2014). Berdasarkan hal ini maka salah satu cara pemuliaan tanaman dapat dilakukan dengan cara melakukan induksi mutasi dengan mutagen kimia, seperti *ethyl methane sulfonate* (EMS). EMS diketahui merupakan mutagen kimia penyebab mutasi titik yang terjadi secara acak dan tidak spesifik pada gen tertentu, jenis mutasi yang dihasilkan adalah substitusi dari basa GC menjadi AT dengan intensitas mutasi sebesar 1/3000 kb (Salinas & Sánchez-Serrano, 2006).

Cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 merupakan salah satu varietas cabai komersial yang terdapat di kota Malang (Ratih, 2016). Cabai rawit G1 ini dilaporkan memiliki beberapa karakter morfologi yang unggul diantaranya adalah memiliki jumlah daun dan percabangan yang banyak (Arruvasari, 2016). Selain itu pada penelitian sebelumnya, Arruvasari (2016) juga melakukan induksi mutasi dengan menggunakan EMS dengan konsentrasi EMS yang diberikan terhadap cabai rawit G1 adalah 0,01%, 0,02% dan 0,04%. Hasilnya menunjukkan bahwa tanaman cabai rawit mutan dengan induksi mutasi EMS konsentrasi 0,01% menunjukkan respon yang paling baik dibandingkan dengan tanaman cabai rawit yang diinduksi mutasi dengan EMS konsentrasi 0,02% dan 0,04%. Respon yang ditunjukkan oleh tanaman cabai rawit yang diinduksi mutasi dengan EMS 0,01% adalah adanya peningkatan jumlah helaian daun dan cabang, serta kandungan capsaicin pada daun (Arruvasari, 2016). Akan tetapi, untuk mengevaluasi lebih lanjut mengenai sifat unggul yang dihasilkan mutan cabai ini, maka diperlukan pengkajian lebih lanjut pada keturunan generasi kedua (F₂). Hal ini disebabkan karena pada F₂ telah banyak terjadi

segregasi, sehingga pada generasi ini akan banyak menunjukkan sifat-sifat atau karakter yang lebih bervariasi. Oleh karena itu, analisis morfologi dan kandungan capsaicin perlu dilakukan kembali. Analisis molekular juga perlu dilakukan untuk mengetahui adanya perubahan sekuen DNA yang terdapat pada tanaman.

Pada penelitian ini karakter morfologi yang diamati meliputi tinggi tanaman, jumlah cabang, jumlah bunga per aksil, hari pembungaan pertama, ukuran (panjang dan diameter) buah, berat buah, jumlah biji per buah. Pemilihan tersebut disebabkan karena karakter-karakter tersebut merupakan karakter yang memiliki heritabilitas yang tinggi ($\pm 85\%$) (Choudhary & Samadia, 2004). Karakter fisisologi yang diamati adalah kandungan capsaicin dari buah cabai. Pemilihan ini disebabkan karena capsaicin merupakan metabolit sekunder yang hanya dihasilkan oleh tanaman dari genus *Capsicum* (Kim dkk., 2014). Metode untuk menganalisis kandungan capsaicin dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri dengan menggunakan $\lambda 280$ nm (González-Zamora dkk., 2015). Analisis molekular dilakukan pada gen *3-oxoacyl-ACP (acyl carrier protein) synthase (KasI)*, hal ini disebabkan karena gen ini berperan dalam biosintesis capsaicin pada jalur *branched fatty acid* untuk pembentukan prekursor *8-methyl-6-nonenoic acid* melalui reaksi siklik berantai (Aluru dkk., 2003). Reddy dkk. (2014) melaporkan bahwa polimorfisme gen *KasI* antara tanaman *Capsicum chinense wild type* dan mutan dapat menyebabkan adanya perbedaan signifikan kandungan capsaicin pada buahnya. Mutasi pada gen dapat diketahui dengan cara melakukan analisis profil genetik dengan metode sekuensing (Kumar dkk., 2016). Berdasarkan uraian tersebut maka, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakter cabai rawit G1M1 berdasarkan karakter morfologi, kandungan capsaicin, dan profil genetik gen *KasI*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana variasi karakter morfologi tanaman cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1?
2. Bagaimana kandungan capsaicin pada tanaman cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1?
3. Bagaimana profil genetik *3-oxoacyl-ACP (acyl carrier protein) synthase (KasI)* antara tanaman cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengevaluasi variasi karakter morfologi tanaman cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1.
2. Menganalisis kandungan senyawa capsaicin pada tanaman cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1.
3. Menganalisis profil genetik gen *3-oxoacyl-ACP (acyl carrier protein) synthase (KasI)* antara tanaman cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat digunakan untuk melakukan skrining bibit cabai rawit yang memiliki kualitas unggul dengan cara melakukan persilangan antar tanaman mutan yang memiliki sifat-sifat unggul. Lebih lanjut, penelitian ini juga dapat dikembangkan dengan cara melakukan persilangan cabai antar varietas bahkan antar spesies, sehingga akhirnya dapat diperoleh varietas cabai yang unggul, selain itu adanya varietas baru juga dapat meningkatkan plasma nutfah dan keragaman genetik.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.)

Cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) merupakan tanaman perdu tegak yang mampu tumbuh hingga mencapai tinggi antara 50–150 cm. Perakarannya adalah akar tunggang, akar ini dapat tumbuh hingga mencapai satu meter ke dalam tanah. Batang dari tanaman cabai rawit merupakan batang berkayu, memiliki banyak percabangan, warna batang tanaman muda berwarna hijau dan setelah dewasa berwarna keputihan dengan struktur yang lebih keras. Daun cabai rawit berbentuk bulat telur (*ovate*), dengan bagian pangkal membulat dan bagian ujung meruncing. Panjang daun berkisar antara 1 – 10 cm, sedangkan lebarnya antara 0,5 – 5 cm. Tangkai daun berkisar antara 0,5 – 3,5 cm. Permukaan atas (adaksial) halus dan licin, sedangkan permukaan bawah (abaksial) memiliki rambut halus (*pillus*). Tepi daun rata dan pertulangan daunnya menyirip. Bunga dari tanaman cabai rawit merupakan bunga sempurna, tunggal, tumbuh dari ketiak daun (aksial), kelopak bunga berjumlah lima helai dan saling berlekatan antara satu dengan lainnya, mahkota bunga berwarna putih berjumlah lima helai, berdiameter antara 8 – 15 mm. Benang sari berjumlah 5 – 6, kepala sari berwarna kebiruan. Putik berjumlah satu berwarna kuning kehijauan. Bakal buah beruang dua atau lebih. Buah cabai rawit merupakan tipe buah buni beruang tiga, berbentuk kerucut, memiliki panjang antara 1 – 3 cm, berdiameter antara 0,5 – 1 cm, bagian ujung meruncing, permukaan licin dan mengkilap (Poulos, 1753). Buah muda berwarna hijau atau kekuningan, setelah dewasa berwarna kuning kemerahan, oranye, merah. Perubahan warna cabai menurut Jarret dkk. (2007) tergantung pada spesies dan varietas. Biji cabai rawit berbentuk membulat, berwarna kuning, pipih, salah satu ujungnya meruncing (Pitojo, 2003). Taksonomi tanaman cabai rawit menurut Poulos (1753) adalah sebagai berikut:

Domain : Eukaryota
Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Solanales
Famili : Solanaceae
Genus : *Capsicum*
Spesies : *Capsicum frutescens* L.

Capsicum frutescens L. merupakan spesies cabai yang berasal dari Amerika Selatan. *Capsicum frutescens* L. diperkenalkan ke Asia pada abad ke-16 oleh penjelajah Portugis dan Spanyol melalui rute perdagangan dari Amerika Selatan. Distribusi geografis *Capsicum frutescens* L. telah meluas ke semua benua, khususnya pada daerah yang memiliki iklim tropis dan subtropis (Poulos, 1753).

Tanaman cabai rawit merupakan salah satu bumbu dan penyedap rasa masakan yang paling terkenal di dunia. Buahnya dikonsumsi dalam bentuk segar, kering atau olahan sebagai sayuran atau bumbu meja. Ekstrak warna dan rasa cabai digunakan baik di industri makanan. Selain itu cabai rawit juga digunakan dalam beberapa produk farmasi (Poulos, 1753). Salah satu pemanfaatan cabai rawit dalam bidang farmasi adalah dengan cara isolasi capsaicin buah cabai sebagai sediaan farmasi, senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antikanker, antibiotik, antioksidan, antiinflamasi dan lain sebagainya (Srivastava, 2013).

2.2 Syarat Tumbuh Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.)

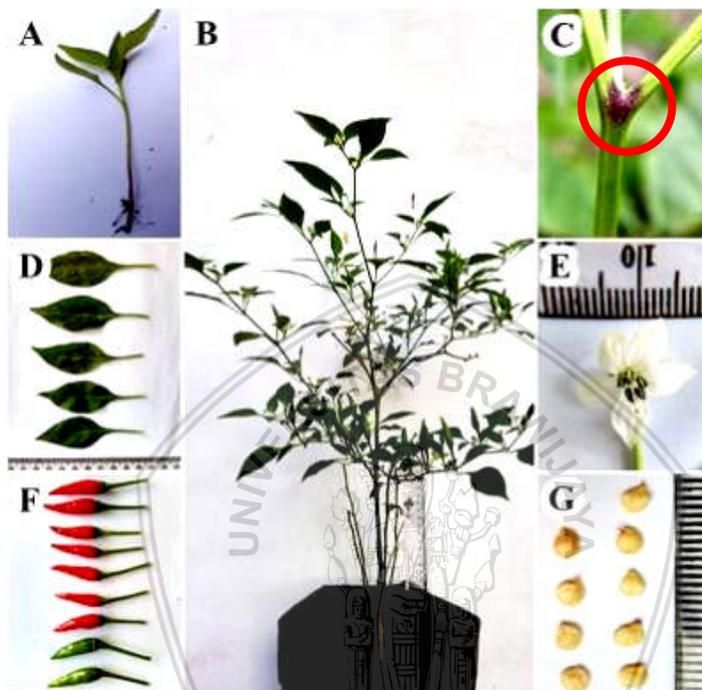
Cabai banyak ditanam di daerah tropis (2000 mdpl atau lebih). Umumnya, suhu optimum untuk pertumbuhan dan perkembangannya adalah 24 °C dan setidaknya 3 bulan cuaca hangat diperlukan untuk dapat mendapatkan hasil yang baik. Spesies cabai yang memiliki ukuran buah kecil terutama *Capsicum frutescens* L. jauh lebih toleran terhadap cuaca panas. Curah hujan tahunan 60 - 125 cm pertahun diperlukan untuk menanam cabai, akan tetapi pada negara-negara tertentu, seperti di India, tanaman ini ditanam sepanjang tahun. Tanah dengan jenis *well-drained heavy soil* merupakan jenis tanah yang paling cocok untuk menanam cabai. pH tanah yang optimum untuk menanam cabai berkisar antara 6,0 - 6,5. Tanaman cabai yang sudah dewasa dapat ditanam langsung di tanah secara langsung tanpa memerlukan pot seperti cara penanaman seperti ini banyak dilakukan di Amerika Serikat Bagian Selatan. Akan tetapi, pembibitan perlu dibesarkan di tempat khusus hingga kemudian ditransplantasikan ke lapangan. Jarak tanam antar tanaman yang paling sesuai adalah 60 cm. Setiap varietas cabai memiliki waktu

pematangan yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor di antaranya adalah kesuburan tanah, kondisi *agro-climatic*, dan garis genetik. *Capsicum frutescens* L. memiliki umur pematangan yang lebih lama (100-115 hari) dibandingkan dengan *Capsicum annum* L. (paprika) (58-82 hari) (Hui dkk., 2010).

2.3 Morfologi Cabai Rawit G1

Cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) merupakan salah satu varietas cabai yang banyak dimanfaatkan secara komersial di kota Malang. Ratih (2016) melaporkan bahwa varietas cabai rawit G1 ini memiliki morfologi yang sedikit berbeda dengan cabai rawit lainnya, di antaranya adalah kecambah memiliki hipokotil berwarna ungu dengan bulu halus yang rapat (Gambar 1A). Daun kotiledon berwarna hijau, berbentuk oblongous, panjangnya $1,815 \pm 1,29$ cm dan lebarnya $0,725 \pm 0,44$ mm, warna batang cabai ketika akan ditanam dalam ungu (Gambar 1A). Habitus cabai G1 tegak (*erect*), dengan tinggi rata-rata adalah $55,9 \pm 16,06$ cm. Lebar kanopi mencapai $51,4 \pm 5,54$ cm (Gambar 1B). Batang bersudut (*angled*) memiliki panjang $27,2 \pm 10,81$ cm dan berdiameter $0,65 \pm 0,17$ cm, pada batang tersebut terdapat bulu rapat, pada bagian nodus berwarna ungu (Gambar 1C). Daun berwarna hijau tua, berbentuk lanset (*lanceolate*), panjangnya $6,18 \pm 0,85$ cm dan lebarnya $2,62 \pm 0,37$ cm, tepi daun berbulu (*ciliate*), berbulu intermediet pada permukaan adaksialnya (Gambar 1D). Pembungaan terjadi pada hari ke-72 setelah penanaman (HST). Bunga pada bagian aksil. Tiap satu aksil hanya terdapat satu sampai dua bunga, posisi bunga tegak. Korola tersusun melingkar (*rotate*), berwarna putih, tanpa totol-totol, panjang sekitar $0,9 \pm 0,16$ cm (Gambar 1E). Anter berwarna biru, panjang sekitar 0,2 cm, filamen berwarna putih, panjang sekitar 0,2 cm. Posisi stigma lebih menonjol dibandingkan dengan anter. Buah cabai rawit ini berbentuk memanjang atau *elongate*, permukaan buah halus, tepi kaliks intermediet, tidak memiliki konstriksi anular, panjang tangkai 2,7 cm. Buah cabai yang masih muda berwarna hijau, ketika menjelang matang berwarna hijau kecoklatan dengan bercak coklat gelap. Buah yang telah matang berwarna merah tua. Panjang buah $3,06 \pm 3,0$ cm, lebar buah $0,92 \pm 0,7$ cm dan beratnya $1,21 \pm 0,20$ gram, tebal perikarp ± 1 mm, dan panjang tangkai 2,7 cm (Gambar 1F). Buah cabai memiliki lokus yang berjumlah dua lokus, plasenta buah panjangnya kurang dari setengah panjang buah. Biji

cabai berwarna kekuningan, permukaan halus, jumlah biji dari setiap buah berjumlah 38–52 biji, diameter biji berukuran sekitar $0,323 \pm 0,025$ mm (Gambar 1G).



(Ratih, 2016)

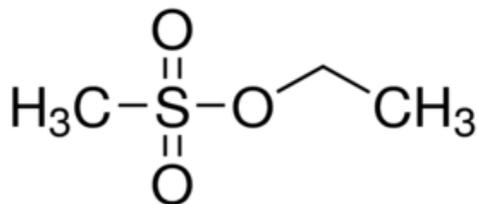
Gambar 1. Karakter morfologi cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 (Keterangan: (A.) Bibit, (B.) Habitus, (C.) Nodus, (D.) Daun, (E.) Bunga, (F.) Buah, G. Biji).

Penelitian tentang cabai rawit G1 telah dilakukan oleh Arruvitasari (2016), pada penelitian tersebut dilakukan induksi mutasi pada beberapa jenis cabai rawit komersial lokal Malang, termasuk tanaman cabai rawit G1 ini dengan menggunakan mutagen EMS dengan konsentrasi 0,01%, 0,02% dan 0,04%. Hasil dari induksi mutasi tersebut menunjukkan bahwa induksi mutasi berhasil menyebabkan perubahan morfologi maupun fisiologi dari cabai rawit G1. Perubahan morfologi meliputi jumlah daun dan jumlah cabang. Arruvitasari (2016) juga menjelaskan bahwa EMS 0,01% menghasilkan respon yang paling baik dibandingkan dengan EMS

konsentrasi 0,02%, dan 0,04%. Sifat atau respon yang ditunjukkan cabai rawit G1 mutan EMS 0,01% diantaranya adalah memiliki jumlah cabang dan daun yang lebih banyak daripada cabai rawit G1 *wild type*, masing-masing memiliki rata-rata 8 sampai 9 cabang dan ± 297 helai daun (Arruvasari, 2016).

2.4 Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

Ethyl Methanesulfonate (EMS) adalah salah satu mutagen kimia yang memiliki rumus kimia $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$ (Gambar 2) yang biasa digunakan untuk menginduksi mutasi pada tanaman untuk menghasilkan variasi genetik (Sigma-Aldrich, 2017). Mutagen EMS dapat menyebabkan terjadinya mutasi titik yang terjadi secara acak pada tanaman, yaitu substitusi dari basa guanin (G) menjadi adenin (A) atau sitosin (C) menjadi timin (T) dengan intensitas mutasi sebesar 1/3000 kb (Salinas & Sánchez-Serrano, 2006). Adanya perubahan sekuen DNA dari tanaman dapat menghasilkan perubahan karakter morfologi maupun kondisi fisiologi tanaman. Tanaman yang dihasilkan dari proses induksi mutasi ini disebut dengan tanaman mutan. Contoh penelitian tentang mutasi EMS telah dilakukan oleh Arruvasari (2016) melaporkan bahwa induksi mutasi EMS dengan konsentrasi 0,01% berpengaruh terhadap karakter jumlah cabang dan daun tanaman cabai. Induksi EMS terhadap tanaman cabai G1 dengan konsentrasi 0,01% dapat menghasilkan tanaman mutan G1 dengan jumlah cabang dan daun yang lebih banyak dibandingkan dengan G1 kontrol, yaitu masing-masing memiliki rata-rata 8,6 cabang dan 297 helai daun. Selain itu, Arruvasari (2016) juga melaporkan bahwa kandungan capsaicin pada daun tanaman mutan juga mengalami peningkatan dibandingkan dengan tanaman G1 kontrol.



(Sigma-Aldrich, 2017)

Gambar 2. Rumus kimia *Ethyl methane sulfonate* (EMS).

Penelitian tentang induksi mutasi dengan mutagen EMS juga dilakukan oleh Jabeen & Mirza (2004) melaporkan bahwa induksi mutasi dengan mutagen EMS dengan dosis 0,1% pada tanaman *Capsicum annuum* L. menunjukkan bahwa tanaman yang telah diinduksi mutasi dengan EMS memiliki karakter morfologi yang berbeda dengan karakter morfologi induknya. Pada penelitian tersebut beberapa mutan *Capsicum annuum* L. yang dihasilkan tidak menunjukkan adanya karakter yang seragam antara satu mutan dengan mutan lainnya, hal ini mendukung pendapat yang menyatakan bahwa mutagen EMS menyebabkan mutasi yang bersifat acak (Jabeen & Mirza, 2004). Jabeen & Mirza (2004) juga melaporkan lebih lanjut bahwa induksi EMS tersebut dapat meningkatkan performa karakter morfologi *Capsicum annuum* L. Pada penelitian tersebut induksi EMS dilakukan dengan cara merendam biji *Capsicum annuum* L. pada EMS dosis 0,1% selama 6 jam. Hasilnya adalah tanaman mutan yang dihasilkan mengalami peningkatan tinggi tanaman, jumlah cabang, serta lebar daun cabai (Gambar 3). Walaupun demikian, penggunaan EMS dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan mutan yang dihasilkan bersifat letal. Hal ini disebabkan karena EMS bersifat toksik apabila konsentrasi dan waktu perendamannya terlalu lama. Sifat toksik ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi atau semakin lama waktu penginduksian berkorelasi positif dengan intensitas mutasi yang terjadi. Semakin tinggi konsentrasi atau semakin lama waktu penginduksian maka sekuen yang mengalami mutasi juga semakin banyak (Salinas & Sánchez-Serrano, 2006).



(Jabeen & Mirza, 2004)

Gambar 3. Morfologi *Capsicum annuum* L.: (A) tanaman kontrol (B) tanaman mutan hasil induksi EMS konsentrasi 0,1%.

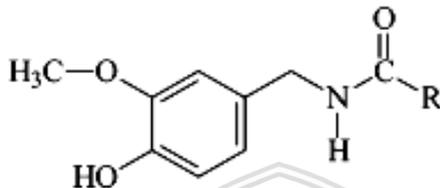
Induksi mutasi dengan mutagen EMS menyebabkan mutagenesis pada sekuen DNA pada tanaman, mutagenesis tersebut terjadi secara acak pada setiap individu. Hal ini akan menyebabkan karakter mutan yang dihasilkan memiliki keunikan pada karakter fenotip maupun karakter fisiologinya. Analisis yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi perubahan sekuens DNA yang paling sesuai dan dapat memberikan informasi secara komperhensif untuk menganalisis mutan EMS adalah analisis *Single-Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) melalui proses sekuensing (Mohd-Yusoff dkk., 2015). Munshi (2012) menyatakan bahwa dengan melakukan sekuensing maka perubahan genetik pada suatu individu (mutan) dapat diidentifikasi jenis mutasi yang terjadi (*point mutation* atau *frameshift mutation*) dan penyebabnya (misalnya berupa insersi delesi, substitusi, dll) (Munshi, 2012).

2.5 Senyawa Capsaicinoid pada Buah Cabai

Tumbuhan dari genus *Capsicum* merupakan kelompok tumbuhan yang memiliki buah pedas. Kepedasan buah ini disebabkan oleh sekelompok senyawa alkaloid yang disebut capsaicinoids. Senyawa-senyawa ini adalah metabolit sekunder yang banyak terakumulasi dalam plasenta buah. Secara rinci senyawa capsaicinoid terdiri dari beberapa jenis senyawa, di antaranya adalah capsaicin (C), dihydrocapsaicin (DHC), norcapsaicin (n-C), nordihydrocapsaicin (n-DHC), homocapsaicin (h-C), homodihydrocapsaicin (h-DHC), nornordihydrocapsaicin (nn-DHC), nornornordihydrocapsaicin (nnn-DHC), dan nonivamide (Non) (Barbero dkk., 2014). Perbedaan utama pada semua senyawa capsaicinoid-capsaicinoid tersebut adalah panjang rantai samping alifatik, keberadaan ikatan rangkap, posisi titik percabangan asam lemak, dan kepekaan relatif (Diaz dkk., 2004). Anggota terpenting dari kelompok senyawa capsaicinoid yang mempengaruhi tingkat kepedasan cabai adalah capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homocapsaicin, dan homodihydrocapsaicin (Williams dkk., 2004). Perucka & Maters (2003) melaporkan bahwa konsentrasi capsaicin dalam varietas cabai *mildly hot spicy* berkisar antara 0,01 hingga 0,3%, dan varietas *very hot spicy* lebih dari 0,3% hingga dapat mencapai 1% dari total berat. Othman dkk. (2011) menjelaskan bahwa variasi kandungan capsaicin dalam buah cabai dapat dipengaruhi beberapa faktor di antaranya adalah suhu lingkungan saat tanaman tumbuh, umur buah, dan intensitas cahaya yang diterima (Othman dkk., 2011).

2.5.1 Capsaicin dan Biosintesis

Capsaicin (*8-metil-N-vanilin-6-nonenamida*) merupakan komponen aktif utama yang menyebabkan rasa pedas pada buah cabai (Barbero dkk., 2006). Senyawa capsaicin terdiri dari cincin aromatik dan rantai samping (bersifat hidrofobik) antara cincin aromatik dan rantai sampingnya terdapat ikatan amida (Gambar 4).



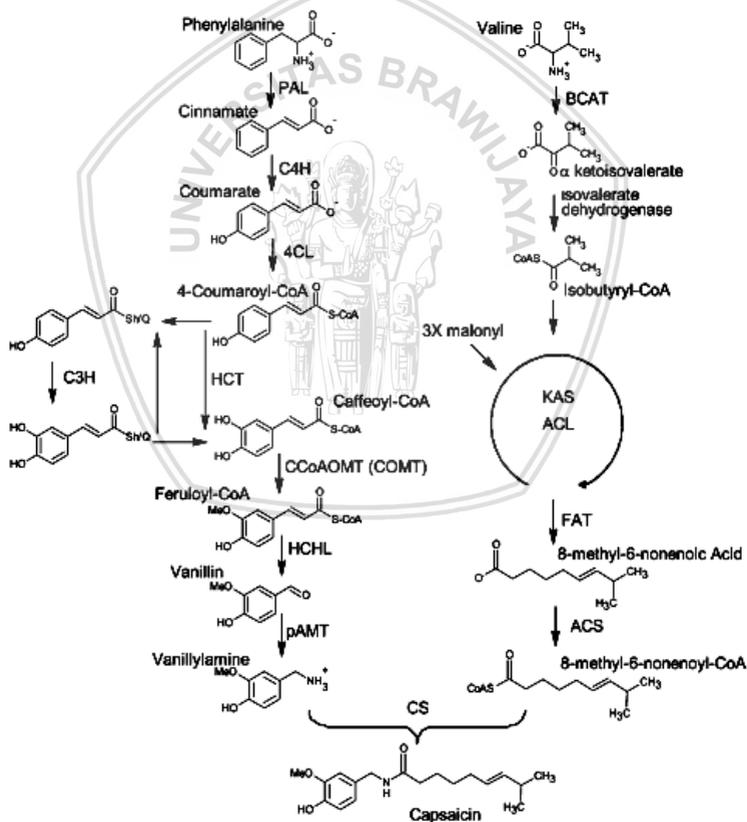
(Barbero dkk., 2006)

Gambar 4. Struktur kimia senyawa capsaicin.

Senyawa capsaicin ini banyak disintesis dalam buah cabai, tepatnya pada bagian *epidermal cells* placenta buah (Barbero dkk., 2006). Beberapa penelitian lain, juga melaporkan bahwa senyawa capsaicin ini juga dapat diperoleh atau di isolasi diorgan-organ lain, walaupun konsentrasinya rendah (Tanaka dkk., 2017). Capsaicin mulai terakumulasi pada tahap pertama perkembangan buah dan secara bertahap akumulasi meningkat hingga maksimum, terjadi ketika buah sudah berumur sekitar 30 – 40 HSP (Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo, 2015), kemudian secara bertahap akumulasi capsaicin tersebut dalam buah menurun cepat karena adanya proses seperti dekomposisi kimia seperti fotooksidasi atau reaksi enzimatik lain karena adanya pembentukan metabolit sekunder yang lain.

Capsaicin secara garis besar disintesis melalui dua jalur biosintesis yaitu jalur fenilpropanoid dan jalur *branched-fatty acid*. Jalur fenilpropanoid menggunakan fenilalanin sebagai prekursor awal dan hasilnya adalah *vanillyamine*, sedangkan jalur *branched-fatty acid* menggunakan valine sebagai prekursor awal dan hasilnya adalah *8-methyl-6-nonenoyl-CoA* (Mazourek dkk., 2009). Senyawa *vanillyamine* dan *8-methyl-6-nonenoyl-CoA* merupakan senyawa yang akan diubah menjadi capsaicin setelah mengalami kondensasi yang diregulasi oleh enzim *capsaicin synthase* (Gambar 5) (Aza-González dkk., 2011).

Aza-González dkk. (2011) menjelaskan bahwa dalam biosintesis capsaicin diregulasi oleh banyak gen, diantaranya adalah enzim *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL), *cinnamic acid 4-hydroxylase* (C4H), *caffeic acid O-methyltransferase* (COMT), *putative aminotransferase* (pAMT) dan β -*keto-acyl-[acyl-carrier-protein] synthase* (KAS) yang berhasil diidentifikasi melalui cDNA yang diperoleh dari jaringan plasenta buah cabai varietas pedas (Chapa-Oliver & Mejía-Teniente, 2016). Gen lain yang menjadi kunci keberhasilan terbentuknya capsaicin adalah gen *Pun1*, gen ini berfungsi dalam pembentukan enzim *capsaicin synthase* (CS) melalui proses kondensasi antara senyawa vanillylamine dan δ -*methyl-6-nonenoyl-CoA* (Ogawa dkk., 2015).



(Aza-González dkk., 2011)

Gambar 5. Biosintesis capsaicin

2.5.2 Pengukuran Kandungan Capsaicin

Pengukuran dan evaluasi kadar capsaicinoid dalam buah cabai dapat digunakan untuk mengetahui berbagai hal di antaranya adalah pembiakan tanaman, teknologi pangan, dan identifikasi kandungan nutrisi buah cabai, selain itu dapat digunakan untuk mengetahui garis keturunan dari cabai ataupun untuk mengetahui kadar capsaicin cabai selama masa penyimpanan maupun setelah diolah. Metode HPLC merupakan metode yang umum digunakan untuk evaluasi dan kuantifikasi capsaicinoid dari buah cabai, akan tetapi metode ini membutuhkan biaya yang mahal dan hanya dapat dilakukan oleh operator yang terlatih (González-Zamora dkk., 2015). Metode lain yang lebih praktis dan mudah untuk dilakukan adalah metode spektrofotometer UV-vis dengan menggunakan panjang gelombang tunggal, namun sebelum dilakukan pengukuran nilai absorpsi perlu dilakukan pemisahan analit dari konstituen penyerap lainnya dalam matriks sampel. Davis dkk. (2007) telah mengembangkan metode ini, percobaannya dilakukan dengan sampel cabai habanero tanpa melakukan pemisahan analit dari konstituen penyerap, cara yang dilakukan adalah dengan menggunakan larutan standar capsaicin dan dihidrocapsaicin menentukan konsentrasi capsaicin dari sampel tanaman berdasarkan nilai absorbansinya.

2.6 *3-oxoacyl-ACP (Acyl Carrier Protein) Synthase (KasI)*

3-oxoacyl-ACP (acyl carrier protein) synthetase (KasI) adalah gen yang memiliki panjang sekuen 3456 bp, sekuen gen tersebut terdiri dari delapan ekson dan dua domain (*KasI* dan *KasII*) (Aluru dkk., 2003; Reddy dkk., 2014). Mazourek dkk. (2009) menjelaskan bahwa gen *KasI* dapat ditemukan dalam tujuh lokasi yang berbeda dalam kromosom, hal ini berhasil diketahui dengan metode AFLP dan RFLP. Gen *KasI* pada cabai memiliki peran dalam biosintesis capsaicin. Aluru dkk. (2003) berhasil menunjukkan bahwa ekspresi gen *Kas* berkorelasi positif dengan tingkat kepedasan cabai, *silencing* gen *Kas* dapat menyebabkan penurunan level zat capsaicinoid secara nyata. Hal ini disebabkan karena gen *Kas* berperan untuk mengkode pembentukan enzim *3-oxoacyl-ACP (acyl carrier protein) synthetase*. Enzim ini bertanggung jawab dalam tahap perpanjangan rantai asam lemak selama proses biosintesis, pemanjangan ini dilakukan dengan cara menambah dua atom C ke rantai sampingnya, sehingga ketika gen ini tidak berfungsi maka

prekursor capsaicin *8-methyl-6-nonenic acid* tidak terbentuk sehingga biosintesis capsaicin pun tidak dapat berlangsung dengan baik atau bahkan gagal terjadi. Reddy dkk. (2014) menunjukkan bahwa sebagian besar jumlah prekursor pembentuk senyawa capsaicinoid (*acyl moieties*) pada buah cabai sebanding dengan ekspresi dari gen *Kas*, semakin kuat ekspresi gen *Kas* tersebut maka jumlah prekursor capsaicin juga semakin tinggi dan sebaliknya. Contoh penelitian yang mendukung hal ini adalah penelitian Dehesh dkk. (2001) yang membuktikan bahwa ekspresi kuat gen *KasIII* pada tanaman tembakau, arabidopsis, dan *rapeseed* meningkatkan level 16:0 *fatty acid*. Penelitian lain melaporkan bahwa percobaan transformasi gen *KasII Arabidopsis sp.* dengan mengintroduksi gen *Kas* yang diisolasi dari *Cuphea wrightii* menunjukkan hasil perubahan profil *fatty acid* yang mulanya memiliki panjang rantai 16:0 menjadi 8:0 dan 10:0 (Leonard dkk., 1998). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa adanya mutasi pada gen ini akan menyebabkan produk capsaicinoid yang dihasilkan menjadi kekurangan gugus asam lemak tidak jenuh, sehingga produk akhir yang dihasilkan bukan senyawa capsaicin, akan tetapi senyawa analog dari capsaicin yaitu senyawa capsinoid (Barbero dkk., 2014).

2.7 Analisis Variasi Genetik pada Tanaman

Analisis variasi genetik tanaman dapat ditinjau berdasarkan pada karakter morfologi, analisis biokimia, analisis fisiologi, analisis anatomi, dan analisis molekular (Mondini dkk., 2009; Diaz dkk., 2013). Analisis karakter morfologi merupakan metode analisis yang paling sederhana dan mudah dilakukan dibandingkan dengan metode analisis variasi genetik lainnya. Peeraulee & Ranghoo-Sanmukhiya (2013) menyatakan bahwa evaluasi dan karakterisasi varietas tanaman secara sederhana dapat dilakukan dengan mengkombinasikan karakter morfologi dan agronominya, akan tetapi metode ini rentan terhadap adanya pengaruh lingkungan. Hal ini disebabkan karena karakter morfologi tanaman mudah berubah menyesuaikan dengan lingkungan hidupnya. Analisis karakter morfologi dapat dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan cara pengukuran tinggi, panjang, lebar, dan jumlah organ atau bagian tanaman, sedangkan pengamatan kualitatif dapat dilakukan dengan cara

pengamatan warna, bentuk, dan susunan dari suatu organ atau bagian tanaman (Ratih, 2016).

Analisis biokimia dan fisiologi merupakan analisis genetik berdasarkan pada kandungan senyawa metabolit sekunder dan proses biosintesisnya. Analisis dengan menggunakan metode ini tergolong cepat untuk dilakukan dan membutuhkan sedikit sampel yang digunakan, akan tetapi metode ini memiliki keterbatasan pada ketersediaan enzim dan senyawa metabolit sekunder (Ratih, 2016). Hal ini disebabkan karena enzim dan senyawa metabolit sekunder tidak diproduksi setiap waktu oleh tanaman, akan tetapi diproduksi pada kondisi dan waktu-waktu tertentu.

Analisis variasi secara molekular mengacu materi genetik tanaman, metode ini cenderung lebih stabil dan tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Mondini dkk., 2009). Menurut Azrai (2006) terdapat beberapa jenis analisis molekular yang biasa digunakan dalam analisis variasi genetik tanaman yaitu analisis berdasarkan hibridisasi DNA seperti *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), analisis berdasarkan reaksi polimerase DNA PCR, seperti *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) dan *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *sequence tagged sites* (STS), *sequence characterized amplified regions* (SCARs), *simple sequence repeats* (SSRs), dan *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Analisis variasi genetik molekular yang dianggap paling komperhensif adalah metode sekuensing. Metode ini dilakukan dengan cara mengurutkan basa nukleotida dari sekuen DNA. Metode sekuensing yang paling umum digunakan adalah metode dideoksi Sanger. Metode Sanger adalah dasar dari sebagian besar sekuensing otomatis, yang saat ini menjadi metode yang disukai untuk sekuensing. Urutan nukleotida dari hasil sekuensing dapat digunakan untuk mengetahui secara pasti lokasi dan bagaimana urutan nukleotida suatu individu dapat mengalami perbedaan atau perubahan (Kumar dkk., 2016). Urutan nukleotida juga dapat membantu memahami sifat, struktur, fungsi materi genetik suatu makhluk hidup, serta dapat digunakan untuk mengidentifikasi hubungan evolusi makhluk hidup dan analisis lainnya.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

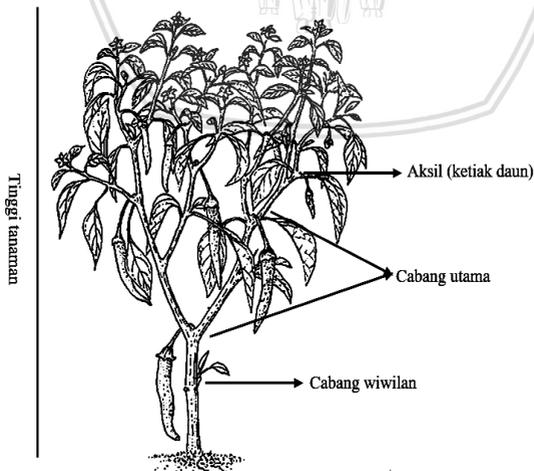
Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2017 sampai Mei 2018. Penanaman, perawatan, dan pengamatan morfologi sampel tanaman cabai rawit dilakukan di kebun cabai di Jalan Margobasuki nomor 31, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang. Analisis secara fisiologi dan molekular dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan Tumbuhan, Mikroteknik dan Laboratorium Biologi Molekular Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

3.2 Penyemaian Biji dan Penanaman Cabai Rawit G1 Kontrol dan Mutan G1M1

Sampel yang digunakan adalah biji cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1 generasi kedua (F_2). Media semai yang digunakan untuk menyemaikan biji cabai dari masing-masing tanaman terdiri atas campuran tanah, sekam, kompos (2:1:1). Pembuatan media dilakukan dengan cara masing-masing komponen media dimasukkan ke dalam 2 polybag dengan ukuran 4500 gram. Polybag 1 digunakan untuk menyemaikan cabai rawit G1 kontrol, sedangkan Polybag 2 digunakan untuk menyemaikan cabai rawit mutan G1M1. Perkecambah dari biji yang telah disemaikan dapat diamati setelah 21 hari setelah tanam (HST). Masing-masing bibit cabai rawit yang telah memiliki 4-5 helai daun (berumur ≥ 21 HST atau ± 3 minggu) dipindah ke dalam pot yang berisi media tanam dengan komponen yang sama dengan komponen media semai. Pada setiap pot digunakan untuk menanam satu bibit cabai. Prosedur untuk memindahkan benih dilakukan dengan cara, media digemburkan terlebih dahulu, selanjutnya bibit cabai rawit ditanam pada media. Pertumbuhan bibit cabai rawit ini dipelihara dengan cara disiram setiap hari, diberikan pupuk organik selama seminggu sekali, dan disemprot dengan larutan campuran antara pestisida alami dan perekat untuk menghindari serangan hama. Tanaman yang memiliki pertumbuhan yang baik akan dipilih untuk dianalisis secara morfologi, fisiologis, dan molekular. Evaluasi karakter morfologi dan pengukuran kandungan capsaicin dilakukan terhadap 3 tanaman cabai rawit G1 kontrol dan 14 tanaman cabai rawit mutan G1M1.

3.3 Analisis Morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan pada 3 tanaman cabai rawit G1 kontrol dan 14 tanaman cabai rawit mutan G1M1. Karakter morfologi yang diamati meliputi tinggi tanaman, jumlah percabangan, hari pembungaan pertama, jumlah bunga pada setiap aksil, panjang buah, diameter buah, berat buah dan jumlah biji dalam setiap buah. Tinggi tanaman, jumlah percabangan, jumlah bunga pada setiap aksil diamati ketika tanaman berumur 120 HST. Tinggi tanaman diukur mulai dari atas tanah sampai titik tertinggi dari tanaman (Gambar 6). Jumlah cabang dihitung dengan cara menjumlah cabang utama dan cabang wiwilan (Gambar 6). Hari pembungaan dihitung dari awal penanaman bibit dalam media tanam sampai dengan tanaman memunculkan bunga. Jumlah bunga pada setiap aksil dihitung pada cabang dikotomik, cabang tingkat pertama, dan cabang tingkat kedua, hasilnya akan dihitung rata-ratanya. Panjang buah, diameter buah, jumlah biji dan berat buah diamati dan dihitung pada 3 buah setiap tanaman. Buah yang dipilih merupakan buah yang berumur antara 30-35 HSP. Panjang buah ($n=3$) dihitung mulai dari bagian basal buah sampai ujung buah (apeks). Diameter buah ($n=3$) dihitung pada bagian tengah buah (dekat dengan bagian basal buah). Jumlah biji dihitung dari 3 buah kemudian hasilnya dirata-rata. Berat buah ($n=3$) ditimbang dengan cara menghilangkan tangkai terlebih dahulu.



(Paulos, 1973)

Gambar 6. Morfologi cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.)

3.4 Analisis Fisiologis

3.4.1 Pengukuran kandungan capsaicin

Buah cabai rawit dari masing-masing tanaman diambil sebanyak 3 buah. Buah cabai rawit yang dipilih adalah buah cabai rawit yang berwarna hijau gelap dan sudah berumur antara 30-35 HSP. Penetapan umur buah tersebut disebabkan karena pada umur 30–40 kandungan capsaicin buah berada pada titik tertinggi, dan setelah itu akan menurun (Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo, 2015). Ekstraksi capsaicin dilakukan dengan cara 0,5 gram buah cabai rawit yang sudah dihilangkan bijinya dihaluskan dengan menggunakan mortar dan *pestle*. Buah cabai yang telah halus ditambahkan dengan 5 mL etanol absolut. Homogenat yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring yang telah diletakkan di atas flakon. Filtrat yang diperoleh diencerkan sebanyak 10 kali dengan menggunakan etanol absolut. Sampel selanjutnya diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm (González-Zamora dkk., 2015). Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung kandungan capsaicin sampel berdasarkan persamaan linear antara nilai absorbansi dan konsentrasi larutan standar capsaicin yang telah diketahui sebelumnya.

Persiapan larutan standar capsaicin dilakukan dengan cara bubuk capsaicin murni dilarutkan dalam etanol absolut 1:1 (v/v) dan digunakan sebagai stok. Larutan stok standar capsaicin dibuat dalam 5 seri konsentrasi yang berbeda, yaitu 0 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing konsentrasi tersebut diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm (González-Zamora dkk., 2015). Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan *Microsoft Excel* 2016, sehingga didapatkan persamaan linear (Persamaan 1) sebagai berikut:

$$y = ax + b \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan:

- y : absorbansi larutan (Å)
- x : konsentrasi capsaicin (ppm)

Persamaan linear di atas digunakan untuk mengetahui konsentrasi capsaicin dari masing-masing sampel buah cabai dengan cara



mensubstitusi nilai y dengan nilai absorbansi sampel, kemudian akan diperoleh nilai x yang merupakan konsentrasi capsaicin yang terkandung pada sampel dalam satuan ppm. Berdasarkan nilai konsentrasi capsaicin dalam satuan ppm yang diperoleh, maka konsentrasi capsaicin dalam satuan mg/g buah cabai rawit dapat dihitung dengan rumus (Persamaan 2) sebagai berikut:

$$\text{Capsaicin (mg/g)} = \frac{(C \times F \times V) \times 10^{-6}}{W} \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

- C : Konsentrasi capsaicin sampel (mg/L) atau (ppm)
- F : Faktor pengenceran
- W : Berat sampel (mg)
- V : Volume pelarut (L)

3.5 Analisis Profil Gen *KasI*

3.5.1 Isolasi DNA

Sampel DNA diambil dari daun dari masing-masing tanaman cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1. Prosedur yang dilakukan adalah daun cabai rawit ditimbang seberat 0,1 gram, selanjutnya sampel daun cabai rawit tersebut dihaluskan dalam nitrogen cair menggunakan mortar dan *pestle* steril. Homogenat sampel dipindahkan dalam mikrotube steril, kemudian ditambahkan 700 μ L buffer ekstraksi (*pre-heated* CTAB). Mikrotube selanjutnya divortex, lalu diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60 $^{\circ}$ C selama \pm 30 menit. Sampel kemudian disentrifugasi (1300 rpm, 15 menit, 4 $^{\circ}$ C). Supernatan yang diperoleh dipindahkan dalam mikrotube baru dan ditambahkan PCI sebanyak 1x (v/v) supernatan, lalu sampel divorteks. Sampel kemudian disentrifugasi (1300 rpm, 15 menit, 4 $^{\circ}$ C). Supernatan yang diperoleh dipindahkan dalam mikrotube baru dan ditambahkan Cl sebanyak 1x (v/v) supernatan, lalu dihomogenkan dengan *inverting*. Sampel kemudian disentrifugasi (1300 rpm, 15 menit, 4 $^{\circ}$ C). Supernatan yang diperoleh dipindahkan dalam mikrotube baru dan ditambahkan amonium asetat sebanyak 0.1x (v/v) supernatan, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Sampel kemudian ditambah dengan larutan etanol absolut sebanyak 2.5x (v/v), lalu dihomogenkan dengan *inverting*. Sampel kemudian disimpan dalam suhu -20 $^{\circ}$ C selama *overnight* (\pm 17 jam).

Sampel kemudian di-*thawing*, lalu disentrifugasi (1300 rpm, 15 menit, 4 °C). Supernatan yang diperoleh dibuang, sedangkan peletnya ditambahkan dengan larutan etanol 70% sebanyak 500 µL. Sampel disentrifugasi kembali (1300 rpm, 15 menit, 4 °C). Supernatan yang diperoleh dibuang, sedangkan peletnya dikeringanginkan di dalam suhu ruang sampai bersih dari etanol. Pelet yang mengandung DNA tersebut kemudian dilarutkan dalam 50 µL buffer TE dan selanjutnya isolat DNA disimpan dalam *freezer* pada suhu -20 °C sampai isolat DNA akan digunakan untuk analisis lanjutan.

3.5.2 Uji kualitatif dan kuantitatif

Isolat DNA perlu dikonfirmasi secara kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui keberhasilan isolasi DNA yang telah dilakukan. Uji kualitatif dilakukan dengan elektroforesis gel agarose, sedangkan uji kuantitatif dilakukan dengan metode spektrofotometri. Prosedur uji kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose (konsentrasi gel 1%) dilakukan dengan cara 0,4 gram gel agarose dilarutkan dalam 40 mL TBE 1X, lalu dipanaskan hingga mendidih. Cairan gel yang sudah turun suhunya (± 80 °C) ditambahkan dengan 2 µL EtBr, lalu cairan gel tersebut langsung dituangkan pada cetakan yang telah dipasang sisir dan didiamkan sampai gel padat. Gel agarose yang telah memadat, dipindahkan pada *chamber*, lalu ditambahkan larutan TBE 1X sampai semua bagian gel terendam. Isolat DNA yang telah dicampur dengan *loading dye* (2:1) dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran gel agarose. Elektroda dihubungkan ke *power supply*, kemudian listrik dinyalakan. Proses running DNA pada gel agarose dilakukan dengan kuat arus 60 V selama 45 menit. Listrik kemudian dimatikan, lalu gel diambil dan divisualisasikan dengan UV-Transiluminator *GelDoc*.

Uji kuantitatif adalah dengan metode spektrofotometri, dilakukan dengan cara isolat DNA diencerkan 1000x dengan menggunakan ddH₂O, kemudian diukur nilai absorbansinya pada tiga panjang gelombang yaitu 230, 260, dan 280. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk mengetahui nilai kemurnian DNA dari kontaminan (RNA, protein, dan polisakarida) dan konsentrasi DNA. Kemurnian DNA dari RNA dan protein dapat dihitung dengan mencari rasio A_{260}/A_{280} sedangkan kemurnian DNA dari polisakarida ditentukan dengan rasio A_{260}/A_{230} . Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1.8-

2.0 (Fatchiyah dkk., 2011). Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus (Persamaan 3) sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi DNA (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} \times 50 \text{ (ng/}\mu\text{L)} \times F \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

F : Faktor pengenceran (1000x)

3.5.3 Amplifikasi Gen *KasI*

Prosedur yang dilakukan dalam metode PCR adalah sebagai berikut, sampel DNA diamplifikasi dengan primer spesifik untuk gen *KasI* (KasIF-CTCGTGCTGATGGACTTGGA dan KasIR-AATGTTTCTTGCTCGGACTCTCT) dengan produk sepanjang 964 bp. Larutan PCR *mix* memiliki total volume 40 μl , yang terdiri dari 14 μl akuades steril, 20 μl PCR mix, 2 μl primer *forward* (10 pmol), 2 μl primer *reverse* (10 pmol), dan 2 μl sampel DNA. Proses amplifikasi DNA dilakukan dalam 35 siklus, *hotstart* pada suhu 95 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}\text{C}$ selama 60 detik, *annealing* pada suhu 61,3 $^{\circ}\text{C}$ selama 60 detik, ekstensi pada suhu 72 $^{\circ}\text{C}$ selama 60 detik, dan *post extention* pada suhu 72 $^{\circ}\text{C}$ selama 7 menit. Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa dengan konsentrasi 1% pada tegangan 60 V selama 45 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV-Vis transiluminator GelDoc. Amplikon yang diperoleh disekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotida gen *KasI* dan mendeteksi adanya mutasi.

3.6 Analisis Data

Data karakter morfologi tanaman dan kandungan capsaicin cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1 diuji normalitasnya terlebih dahulu dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov. Data yang memiliki distribusi normal dianalisis secara statistik parametrik dengan uji *t-independent* dengan taraf signifikansi 0,05 sedangkan data yang memiliki distribusi tidak normal dianalisis secara statistik non-parametrik dengan uji Mann-Whitney dengan taraf signifikansi 0,05. Similaritas genetik berdasarkan karakter morfologi dan kandungan capsaicin dari masing-masing tanaman dapat diketahui dengan cara membuat dendrogram berdasarkan indeks similaritas Bray-Curtis. Data karakter morfologi dan kandungan capsaicin dari masing-masing tanaman di-*scoring* berdasarkan kategori-kategori

tertentu dengan *range* yang telah ditetapkan oleh IPGRI, AVRDC, & CATIE (1995), Arisha dkk. (2015) dan Usman dkk. (2014). *Cluster* yang terbentuk dari dendrogram dan *score* dari masing-masing tanaman digunakan sebagai dasar atau acuan pemilihan tanaman yang akan disekuensing. Data hasil sekuensing diolah dan disejajarkan. Hasil *multiple alignment* dari masing-masing sampel dibandingkan dengan sekuen *Capsicum annuum 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (KasI) gene, KasI-a allele, complete cds* (KM037709.1) yang terdapat pada NCBI.



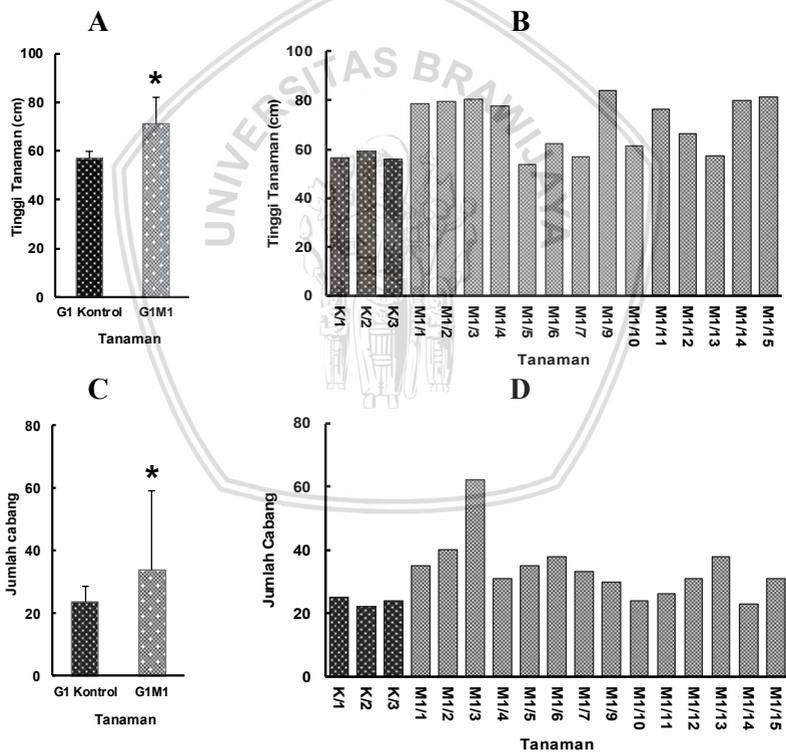
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Variasi Karakter Morfologi Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1

Tinggi tanaman mutan G1M1 menunjukkan variasi yang berkisar antara 53,8-84,2 cm, sedangkan tinggi tanaman G1 kontrol berkisar antara 55-58 cm (Gambar 7A-B). Berdasarkan uji beda nyata karakter tinggi kelompok tanaman G1 kontrol dan mutan G1M1 memiliki perbedaan yang signifikan (Gambar 7A) (LT6). Arisha dkk. (2010) menyatakan bahwa tinggi tanaman cabai rawit dapat dikelompokkan dalam 5 kategori yaitu *dwarf* (<20 cm), *short* (20-40 cm), *normal* (41-80 cm), *long* (81-100 cm), *very long* (>100 cm) (LT7). Berdasarkan pengelompokan tanaman tersebut, maka mayoritas tanaman mutan G1M1 dan G1 kontrol merupakan tanaman yang termasuk dalam kategori *normal* (41-80 cm). Sedangkan tanaman mutan G1M1/3, G1M1/9, G1M1/14, G1M1/15 merupakan tanaman yang termasuk dalam kategori *long* (80-100 cm) (Gambar 7B). Perbedaan yang signifikan antara tanaman kontrol dan mutan menunjukkan bahwa induksi mutasi menyebabkan terjadinya peningkatan tinggi tanaman mutan yang signifikan.

Tanaman mutan G1M1 menunjukkan variasi jumlah cabang yang berkisar antara 23-62, sedangkan tanaman kontrol berkisar antara 22-25 (Gambar 7C-D). Berdasarkan uji beda nyata karakter jumlah cabang antara kelompok tanaman G1 kontrol dan mutan G1M1 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 7C) (LT6). IPGRI, AVRDC, & CATIE (1995) mengelompokkan tanaman cabai berdasarkan jumlah cabangnya menjadi lima kategori, yaitu memiliki jumlah cabang sedikit (<20 cabang), sedang (31-40 cabang), banyak (41-50 cabang), dan sangat banyak (>50 cabang) (LT7). Berdasarkan pengelompokan tersebut maka tanaman G1 kontrol, G1M1/10, G1M1/11, dan G1M1/14 termasuk dalam kategori tanaman yang memiliki cabang sedikit dan tanaman mutan lainnya termasuk dalam kategori tanaman yang memiliki cabang sedang (Gambar 5D). Hal ini menunjukkan bahwa jumlah cabang tanaman mutan G1M1 mengalami peningkatan secara signifikan setelah diberikan induksi mutasi dengan menggunakan EMS 0,01%. Hal ini sesuai dengan pendapat Cline (1994) yang menyatakan bahwa peningkatan jumlah cabang tanaman dapat dipengaruhi

mutasi yang terjadi pada gen-gen yang terkait dengan percabangan. Hal ini telah dibuktikan pada penelitian terhadap biji tanaman kenaf (*Hibiscus cannabinus*) yang direndam mutagen EMS, hasilnya menunjukkan adanya perubahan jumlah percabangan pada tanaman yang tumbuh dari biji yang telah direndam EMS (Arumingtyas dkk., 2010). Perubahan juga kemungkinan terjadi pada sekuen gen yang meregulasi hormon pertumbuhan. Perubahan pada gen ini dapat menyebabkan perubahan kandungan hormon yang mempengaruhi jumlah cabang tanaman, hal ini telah dibuktikan oleh Cline (1994) yang menyatakan bahwa tanaman yang memiliki kandungan auksin tinggi mengalami dominasi apikal yang kuat sehingga pembentukan dan pertumbuhan cabang lateral menjadi terhambat.



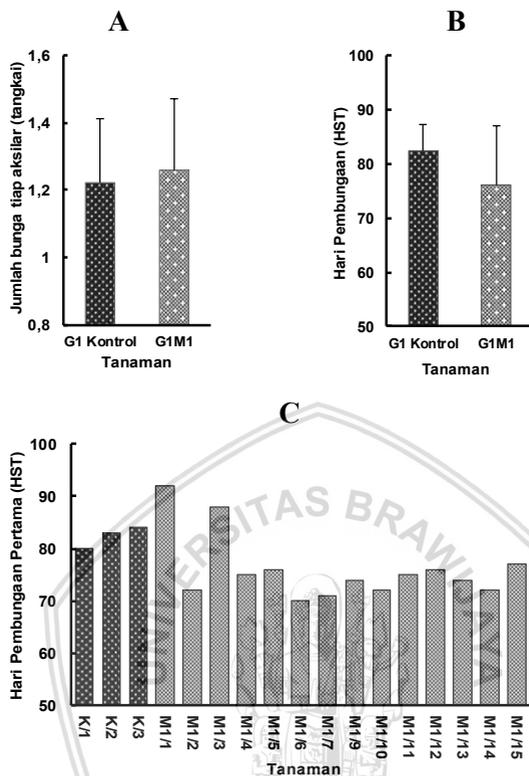
Gambar 7. Karakter vegetatif cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 kontrol dan mutan G1M1: tinggi tanaman dan jumlah cabang tanaman pada umur 120 HST (Keterangan: notasi (*) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok tanaman G1M1 dengan G1 kontrol).

Karakter vegetatif tinggi dan jumlah cabang tanaman merupakan karakter yang saling berkaitan, kedua karakter ini merupakan karakter yang menyusun arsitektur tanaman, pada tanaman yang memiliki mengalami pengkerdilan cenderung memiliki jumlah cabang yang lebih banyak dibandingkan dengan tanaman normal, selain itu juga memiliki internodus yang lebih pendek (Mauro-Herrera & Doust, 2016). Hal ini dapat disebabkan karena pada tanaman kerdil pengaruh dominasi apikal tidak terlalu besar sehingga antara pertumbuhan tunas apikal dan lateral saling berdampingan dan tidak saling mendominasi, sedangkan pada tanaman normal pengaruh dominasi apikal sangat dominan sehingga tunas lateral pertumbuhannya mengalami penghambatan. Bidgoli dkk. (2006) juga menjelaskan bahwa tinggi tanaman berkorelasi positif dengan biomassa tanaman, sedangkan jumlah percabangan berkorelasi positif dengan jumlah bunga pada tiap aksil dan jumlah buah yang dihasilkan. Hal ini terjadi karena tanaman yang memiliki banyak cabang, secara otomatis juga memiliki jumlah aksil yang banyak. Pada tanaman yang memiliki pembungaan pada bagian aksil seperti tanaman cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) peningkatan jumlah cabang akan sangat menguntungkan karena produktivitasnya meningkat.

Karakter lain yang diamati adalah jumlah bunga pada tiap aksil. Pengamatan karakter ini menunjukkan bahwa kelompok tanaman mutan G1M1 maupun kelompok tanaman G1 kontrol keduanya memiliki variasi yang sama, yaitu antara 1 sampai 2 bunga pada tiap aksil. Berdasarkan uji beda nyata pada karakter jumlah bunga per aksil antara kedua kelompok tersebut tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 8A) (LT6). IPGRI, AVRDC, & CATIE (1995) menjelaskan bahwa pada tanaman dari genus *Capsicum* dikelompokkan dalam lima kategori, yaitu tanaman yang memiliki satu bunga per aksil, dua bunga per aksil, tiga bunga per aksil, banyak bunga per aksil, dan lainnya (2 pada pembungaan pertama, dan 1 pada pembungaan selanjutnya) (LT7). Akan tetapi, Ratih (2016) melaporkan bahwa pada tanaman cabai rawit G1 ini memiliki 1 sampai 2 bunga per aksil. Berdasarkan hal ini maka induksi mutasi EMS 0,01% tidak mempengaruhi karakter jumlah bunga pada setiap aksil pada tanaman G1, walaupun demikian dapat diketahui bahwa kelompok tanaman mutan G1M1 memiliki variasi karakter jumlah bunga pada setiap aksil yang lebih besar daripada tanaman G1 kontrol. Arisha dkk. (2015) menjelaskan bahwa

mutagen EMS lebih mudah mempengaruhi gen-gen yang meregulasi perkembangan organ generatif tanaman. Penelitian lain yang telah dilakukan oleh Jabeen & Mirza (2004) juga menyatakan bahwa induksi mutasi dengan EMS dapat mempengaruhi gen-gen yang bekerja dalam mekanisme pembungaan dan pematangan buah.

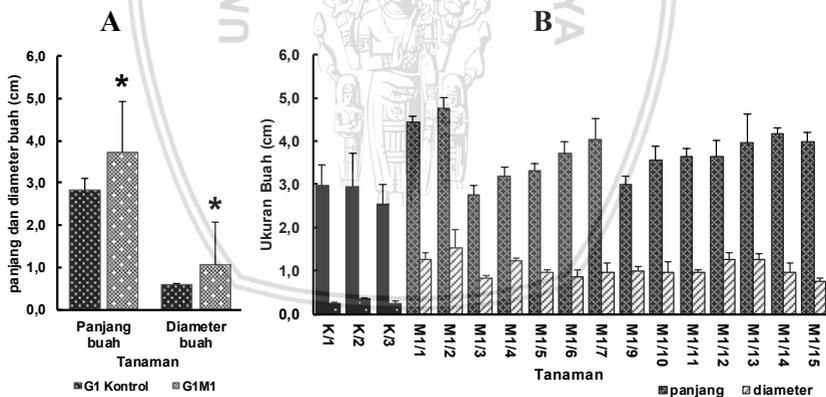
Hari pembungaan pertama dari kelompok tanaman mutan G1M1 memiliki variasi yang berkisar antara 70-92 HST, sedangkan tanaman G1 kontrol berkisar antara 80-84 HST (Gambar 8B-C). Berdasarkan hasil uji beda nyata karakter hari pembungaan pertama antara kelompok tanaman mutan G1M1 dan tanaman kontrol tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 8B) (LT5). Arisha dkk. (2015) membagi hari pembungaan pertama tanaman cabai dalam lima kategori yaitu sangat cepat (<70 HST), cepat (70–80 HST), normal (81–100 HST), lambat (101–120 HST), sangat lambat (>120 HST) (LT7). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tanaman mutan G1M1 mayoritas memiliki hari pembungaan yang termasuk dalam kategori cepat (70–80 HST) kecuali tanaman mutan G1M1/1 dan G1M1/3 memiliki hari pembungaan yang termasuk dalam kategori normal (81–100 HST) sama dengan tanaman G1 kontrol (Gambar 8C). Tanaman G1M1/6 merupakan tanaman mutan yang paling cepat berbunga (70 HST) (Gambar 8C). Hasil ini menunjukkan bahwa sebagian besar tanaman mutan G1M1 (kecuali G1M1/1 dan G1M1/3) memiliki hari pembungaan yang lebih cepat dibandingkan dengan tanaman G1 kontrol. Jung & Müller (2009) menjelaskan bahwa pembungaan pertama pada tanaman dipengaruhi oleh faktor genetik, faktor fisiologi, dan faktor lingkungan, berdasarkan hal tersebut kemungkinan induksi mutasi dengan EMS 0,01% yang telah dilakukan tidak menyebabkan adanya mutasi pada gen-gen yang berperan dalam proses pembungaan, akan tetapi kemungkinan mempengaruhi gen-gen lain yang meregulasi sifat lain yang tidak diamati dalam penelitian ini. Akan tetapi gen yang mengalami mutasi tersebut kemungkinan meregulasi sifat atau karakter yang masih berhubungan dengan proses pembungaan tanaman, misalnya seperti gen-gen yang terkait dalam proses vernalisasi, fotoperiode, dan gen-gen yang terkait dalam proses biosintesis dan akumulasi hormon giberelin pada tumbuhan (Michaels, 2009). Akibatnya walaupun tidak berpengaruh secara langsung pada gen yang meregulasi hari pembungaan tanaman, tetapi hari pembungaan mutan tetap mengalami perubahan dibandingkan dengan tanaman *original type*.



Gambar 8. Karakter jumlah bunga tiap aksil (120 HSP) dan hari pembungaan tanaman cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 kontrol dan mutan G1M1 (Keterangan: notasi (*) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok tanaman G1M1 dengan G1 kontrol).

Karakter generatif yang diamati dalam penelitian ini meliputi ukuran (panjang dan diameter) buah, berat buah, dan jumlah biji. Hasil pengukuran panjang dan diameter buah menunjukkan bahwa tanaman mutan G1M1 memiliki variasi panjang buah yang berkisar antara 1,5-5 cm dan variasi diameter yang berkisar antara 1-2 cm, sedangkan tanaman G1 kontrol memiliki variasi panjang yang berkisar antara 2-3 cm dan variasi diameter yang berkisar antara 0,5-1 cm (Gambar 9A-B). Hasil uji beda nyata karakter panjang dan diameter buah antara kelompok tanaman mutan G1M1 dan G1 kontrol menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 9A) (LT5). IPGRI, AVRDC, & CATIE (1995) mengelompokkan

panjang buah cabai menjadi lima kategori yaitu buah yang sangat pendek (<0,1 cm), pendek (0,1-1 cm), normal (1-5 cm), panjang (5-10 cm), sangat panjang (10-15 cm) (LT7). Berdasarkan kategori tersebut panjang buah tanaman G1 kontrol dan mutan G1M1 memiliki panjang buah normal, dengan kisaran antara 2,5-5 cm. Selanjutnya IPGRI, AVRDC, & CATIE. (1995) juga mengelompokkan diameter buah cabai menjadi 5 kategori yaitu buah yang sangat sempit (<0,1 cm), sempit (0,1-0,5 cm), normal (0,5-1 cm), lebar (1-2 cm), sangat lebar (>2 cm) (LT8). Berdasarkan kategori tersebut menunjukkan bahwa semua tanaman G1 kontrol dan tanaman mutan G1M1/3, G1M1/5, G1M1/6, G1M1/7, G1M1/10, G1M1/11, G1M1/14, G1M1/15 memiliki buah berdiameter normal, sedangkan lainnya memiliki diameter yang lebar (Gambar 9B). Tanaman mutan G1M1 memiliki ukuran buah yang lebih besar dibandingkan dengan tanaman kontrol. Tanaman mutan G1M1/1 dan G1M1/2 merupakan tanaman mutan yang memiliki ukuran buah paling besar di antara tanaman lainya (Gambar 9B).

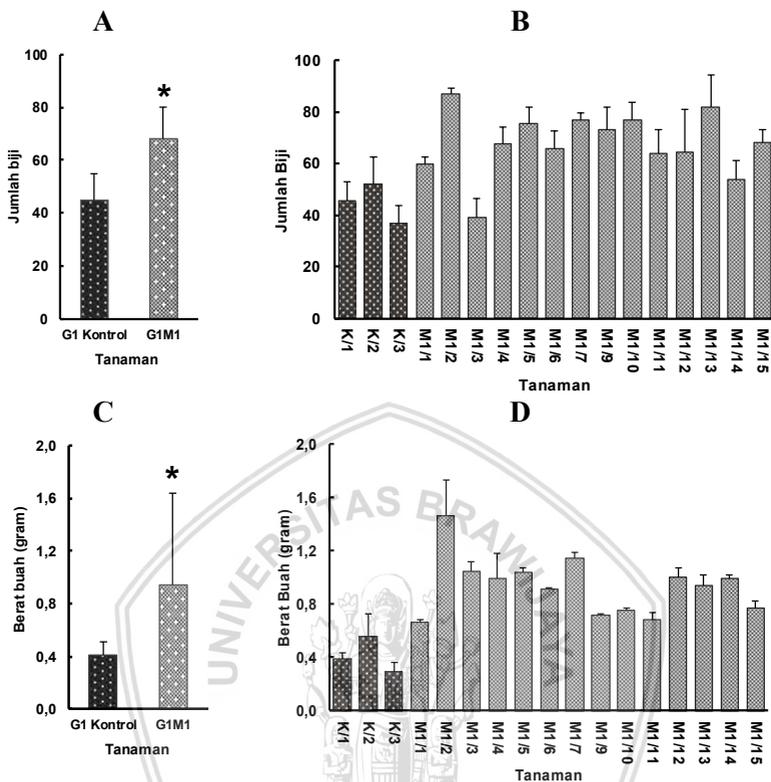


Gambar 9. Ukuran buah cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 kontrol dan mutan G1M1 pada umur 30 HSP (Keterangan: notasi (*) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok tanaman G1M1 dengan G1 kontrol) (n=3).

Jumlah biji pada kelompok tanaman mutan G1M1 memiliki variasi yang berkisar antara 32 sampai 87 biji, sedangkan pada kelompok tanaman G1 kontrol memiliki variasi antara 34 sampai 54 biji (Gambar 8A-B.). Hasil uji beda nyata karakter jumlah biji antara

kelompok tanaman mutan G1M1 dan G1 kontrol menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 10A) (LT5). Arisha dkk. (2015) membagi jumlah biji dalam setiap buah cabai ke dalam lima kategori, yaitu kosong (0), rendah (<50 biji), normal (50–199 biji), tinggi (200–300 biji), dan sangat tinggi (>300 biji) (LT7). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa tanaman mutan G1M1 memiliki jumlah biji normal (50–199 biji), sedangkan tanaman G1 kontrol memiliki jumlah biji yang rendah. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tanaman G1M1/2 dan G1M1/13 merupakan tanaman mutan yang memiliki jumlah biji paling banyak di antara tanaman lain, masing-masing $87 \pm 2,0$ biji dan $82 \pm 12,1$ biji (Gambar 10B).

Berat buah pada kelompok tanaman G1M1 memiliki variasi yang berkisar antara 0,6–1,4 gram, sedangkan pada kelompok tanaman G1 kontrol memiliki variasi antara 0,3–0,6 gram (Gambar 10C-D). Hasil uji beda nyata karakter berat buah antara kelompok tanaman mutan G1M1 dan G1 kontrol menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 10C) (LT5). IPGRI, AVRDC, & CATIE. (1995) mengelompokkan diameter buah cabai menjadi 5 kategori yaitu buah yang sangat ringan (<0,1 gram), ringan (0.1–2 gram), normal (2–4 gram), berat (4–6 gram), sangat berat (6–8 gram) (LT7). Berdasarkan kategori tersebut tanaman G1 kontrol maupun mutan G1M1 memiliki berat buah yang ringan dengan kisaran antara 0,4–1,5 gram. Tanaman mutan G1M1/2 merupakan tanaman yang memiliki berat buah paling besar yaitu $1,463 \pm 0,267$ cm (Gambar 10D). Berdasarkan karakter berat buah dapat diketahui bahwa walaupun antara tanaman G1 kontrol dan mutan G1M1 memiliki berat buah yang ringan, akan tetapi mutan memiliki berat buah yang lebih berat secara signifikan dibandingkan dengan kontrol. Tiwari dkk. (2011) menyatakan bahwa berat buah berkorelasi positif dengan ukuran (panjang dan diameter) buah dan jumlah biji. Carvalho dkk. (2014) juga menyatakan bahwa ukuran buah berkorelasi positif dengan jumlah biji dan berat buah. Jumlah biji berkorelasi positif dengan berat buah, tetapi tidak berkorelasi erat dengan ukuran buah, dan berat buah berkorelasi positif dengan ukuran buah dan jumlah biji. Berdasarkan hasil ini dapat diketahui bahwa buah yang berukuran besar cenderung memiliki jumlah biji yang banyak dan mengalami peningkatan berat buah, selain itu buah yang berukuran besar juga diketahui memiliki ukuran perikarp yang tebal, hal ini juga akan menyebabkan peningkatan berat buah.



Gambar 10. Karakter buah cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 kontrol dan mutan G1M1: jumlah biji dan berat buah umur 30 HSP (Keterangan: notasi *) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok tanaman G1M1 dengan G1 kontrol) (n=3).

Analisis karakter morfologi merupakan salah satu cara untuk mengetahui adanya variasi genetik yang terdapat pada suatu individu. Pada penelitian ini analisis morfologi dilakukan pada karakter tinggi tanaman, jumlah cabang tanaman, hari pembungaan pertama, jumlah bunga pada setiap aksil, ukuran buah (panjang dan diameter), jumlah biji, dan berat buah. Pemilihan karakter ini didasarkan pada penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa karakter-karakter tersebut merupakan karakter yang sering menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok genotip (Sarkar dkk., 2009). Karakter-karakter tersebut dilaporkan juga

merupakan karakter yang memiliki heritabilitas yang tinggi yaitu sekitar 85% (Choudhary & Samadia, 2004). Heritabilitas merupakan gambaran besarnya kontribusi genetik pada suatu sifat yang terlihat dalam suatu populasi, Nilai heritabilitas yang tinggi menunjukkan bahwa penampilan karakter (fenotipe) tersebut lebih ditentukan oleh genetik tanaman dibandingkan dengan lingkungan, sehingga dapat dijadikan sebagai kriteria seleksi yang baik (Cahya, 2014).

Hasil dari pengamatan beberapa karakter morfologi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa mayoritas tanaman G1M1 memiliki karakter yang lebih unggul daripada tanaman kontrol. Induksi mutasi dengan EMS 0,01% pada tanaman cabai rawit dapat meningkatkan variasi morfologi yang cenderung lebih baik dibandingkan dengan tanaman kontrol. Mutasi yang diinduksi dengan mutagen EMS dapat menyebabkan mutasi titik yang bersifat acak, jenis mutasi yang dihasilkan adalah substitusi dari basa GC menjadi AT dengan intensitas mutasi sebesar 1/3000 bp, sehingga setiap tanaman yang diinduksi dengan EMS dengan konsentrasi dan durasi induksi yang sama belum tentu menghasilkan tanaman yang memiliki fenotipe yang sama (Salinas & Sánchez-Serrano, 2006). Pada penelitian ini tanaman mutan yang digunakan merupakan F₂ dari cabai yang diinduksi mutasi dengan cara direndam dalam larutan EMS 0,01% (Arruvitasari, 2016). Hasil induksi mutasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa mutasi yang dihasilkan banyak mempengaruhi organ generatif tanaman, hal ini ditunjukkan adanya perbedaan signifikan antara tanaman mutan G1M1 dan kontrol pada karakter ukuran buah (panjang dan diameter), jumlah biji, dan berat buah. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena EMS menyebabkan terjadinya mutasi pada gen-gen yang bekerja atau berperan dalam proses atau mekanisme pembentukan dan perkembangan organ generatif tanaman cabai. Vrebalov dkk. (2002) menyatakan bahwa salah satu gen yang berperan dalam pematangan buah pada tumbuhan dari famili Solanaceae adalah gen MADS-box (*LeMADS-RIN* dan *LeMADS-MC*), adanya gangguan pada gen ini menyebabkan adanya kegagalan pematangan buah.

Jabeen & Mirza (2004) menyatakan bahwa induksi mutasi dengan mutagen EMS banyak mempengaruhi gen-gen yang berperan selama proses pembungaan dan pematangan buah pada tanaman cabai. Karakter lain yang diamati (tinggi tanaman, percabangan, jumlah bunga pada tiap aksil) walaupun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sebagian karakter menunjukkan bahwa

tanaman mutan G1M1 memiliki karakter fenotipe yang lebih unggul dibandingkan dengan tanaman kontrol. Hal ini kemungkinan dapat terjadi karena tanaman G1M1 memiliki respon individu terhadap lingkungan yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol, sehingga berdasarkan karakter morfologinya, pertumbuhan dan perkembangan tanaman mutan lebih baik dibandingkan dengan kontrol (Roy, 2000). Beberapa faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi karakter fenotipe tanaman di antaranya adalah air, suhu, intensitas cahaya matahari, nutrisi, dan kompetisi dengan tanaman lain (Haferkamp, 1987). Sarkar dkk. (2009) menjelaskan bahwa variasi karakter morfologi maupun fisiologi dari tanaman dapat dipengaruhi oleh adanya interaksi antara faktor genetik dan faktor lingkungan. Interaksi ini akan menyebabkan tumbuhan memiliki fenotipe dan respon individu yang berbeda-beda terhadap kondisi lingkungan.

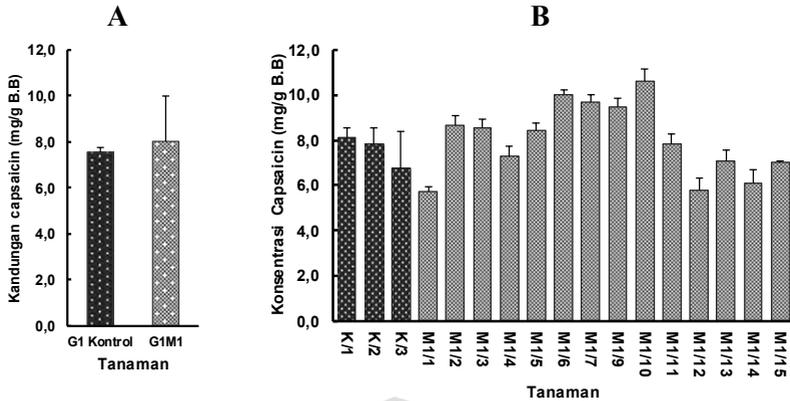
Kemungkinan lain yang menjadi penyebab peningkatan performa karakter mutan adalah mutasi yang terjadi menyebabkan tanaman mutan memiliki daya tahan yang lebih baik terhadap kondisi lingkungan dan cuaca yang kurang mendukung pertumbuhan dan perkembangannya. Hal ini dapat diketahui dari *scoring* yang dilakukan pada semua tanaman yang diamati menunjukkan bahwa semua tanaman mutan memiliki *score* yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (LT8). Selain itu sebagian besar tanaman mutan dapat tumbuh normal, sedangkan tanaman G1 kontrol pertumbuhannya cenderung mengalami pengkerdilan (LG2). Tanaman yang dapat tumbuh dengan baik pada kondisi lingkungan yang buruk mengindikasikan tanaman tersebut dapat meregulasi aktivitas metabolismenya dengan baik, sehingga adanya kondisi lingkungan yang buruk tidak banyak mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangannya.

4.2 Kandungan Capsaicin Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1

Kandungan capsaicin pada kelompok tanaman mutan G1M1 memiliki variasi yang berkisar antara 5,36 sampai 10,17 mg/gram B.B, sedangkan pada kelompok tanaman kontrol memiliki variasi antara 4,52 sampai 7,96 mg/gram B.B (Gambar 11). Hasil uji beda nyata kandungan capsaicin antara kelompok tanaman mutan G1M1 dan G1 kontrol menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 11A) (LT5). Walaupun demikian, kandungan

capsaicin pada kelompok tanaman mutan G1M1 memiliki kandungan capsaicin yang lebih tinggi (G1M1/2, G1M1/3, G1M1/5, G1M1/6, G1M1/7, G1M1/9, G1M1/10) dibandingkan kelompok tanaman kontrol dan beberapa tanaman mutan (G1M1/1, G1M1/4, G1M1/11, G1M1/12, G1M1/13, G1M1/14, G1M1/15) memiliki kandungan capsaicin yang lebih rendah daripada tanaman kontrol (Gambar 11B). Tanaman mutan G1M1/10 merupakan tanaman yang memiliki kandungan capsaicin yang paling besar dibandingkan tanaman lainnya yaitu $10,17 \pm 0,356$ mg/gram B.B.

Othman dkk. (2011) menyebutkan bahwa *Capsicum frutescens* L. ($4,24 \pm 0,19$ mg/gram B.B) memiliki kandungan capsaicin yang lebih tinggi dibandingkan *Capsicum annum* ($1,38 \pm 0,05$ mg/gram B.B). Usman dkk. (2014) mengelompokkan tingkat kepedasan cabai kedalam lima kelompok yaitu *non-pungent* (0-700 SHU), *mildly pungent* (700-3000 SHU), *moderately pungent* (3000-25000 SHU), *highly pungent* (25000-70000 shu) *very highly pungent* (>80000). Berdasarkan nilai SHU maka dapat digunakan untuk memprediksi kandungan capsaicin dengan cara dapat dikonversi dengan cara membagi nilai SHU dengan faktor konversi yaitu 16,1 (Todd dkk., 1977). Hasil dari konversi tersebut maka dapat diketahui bahwa kelompok cabai *non-pungent* memiliki kandungan capsaicin 0-0,1 mg/gram B.B, *mildly pungent* memiliki kandungan capsaicin 0,1-0,9 mg/gram B.B, *moderately pungent* memiliki kandungan capsaicin 1-2,4 mg/gram B.B, *highly pungent* memiliki kandungan capsaicin 2,5-5 mg/gram B.B, dan *very highly pungent* memiliki kandungan capsaicin lebih dari 5 mg/gram B.B (LT7). Berdasarkan hasil pengelompokan tersebut maka dapat diketahui bahwa semua tanaman mutan maupun kontrol memiliki kandungan capsaicin yang sangat tinggi (*very highly pungent*). Dari semua populasi sampel tanaman yang diukur, kandungan capsaicin dari G1 kontrol sekitar 7 mg/gram, sedangkan tanaman mutan dengan kandungan capsaicin tertinggi sekitar 10 mg/gram dan yang terendah sekitar 5 mg/gram. Variasi kandungan capsaicin yang besar ini kemungkinan dapat terjadi karena adanya induksi mutasi yang telah diberikan. Kandungan capsaicin dari buah cabai dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya adalah ekspresi gen pengkode enzim-enzim atau senyawa-senyawa yang berperan dalam biosintesis capsaicin, umur buah, ukuran plasenta, dan kondisi lingkungan (suhu, intensitas cahaya) (Othman dkk., 2011; Aruldoss & Mullainathan, 2015).



Gambar 11. Kandungan capsaicin buah cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 kontrol dan mutan G1M1 pada umur 30 HSP (Keterangan: notasi (*)) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok tanaman G1M1 dengan G1 kontrol) (n=3).

Mubarokah dkk. (2015) menjelaskan bahwa secara dominan, kandungan capsaicin buah cabai banyak dipengaruhi oleh faktor genetik daripada pengaruh faktor lingkungan. Pendapat tersebut mendukung hasil yang diperoleh dari penelitian ini, karena pada penelitian ini semua tanaman cabai diletakkan pada kondisi lingkungan sama, akan tetapi kandungan capsaicin dari masing-masing tanaman menunjukkan variasi yang besar, berkisar antara 5,36 sampai 10,17 mg/gram B.B. Variasi yang besar pada tanaman mutan ini kemungkinan disebabkan sebagai akibat dari pengaruh mutagen EMS yang diberikan. Mutagen EMS menyebabkan mutasi titik melalui transisi pada DNA, melalui perubahan pasangan basa GC menjadi AT yang mengakibatkan perubahan asam amino (Chopra, 2005). Kemungkinan lain adalah mutagen EMS menyebabkan mutasi yang berbeda-beda pada masing-masing tanaman, akibatnya masing-masing tanaman memiliki karakter yang berbeda-beda. Akan tetapi, perbedaan kandungan capsaicin antara mutan dan kontrol tidak berbeda signifikan. Hal ini sesuai dengan pendapat Salam & Thoppil (2010) yang menyatakan bahwa mutasi yang disebabkan oleh EMS adalah mutasi titik sehingga mutasi tersebut tidak berpengaruh besar terhadap tanaman. Kemungkinan lain adalah EMS yang diberikan tidak mempengaruhi pada gen-gen yang berperan dalam biosintesis capsaicin, akan tetapi

berpengaruh pada gen yang meregulasi karakter fisiologi maupun morfologi lain yang tidak diamati pada penelitian ini.

4.3 Similaritas Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1

Karakter morfologi dan kandungan capsaicin dari tanaman G1 kontrol dan mutan G1M1 dapat digunakan untuk menganalisis *distance* maupun similaritas genetik antar tanaman. Hasil rekonstruksi filogenetik berdasarkan karakter morfologi dan kandungan capsaicin dari tanaman cabai rawit G1 kontrol dan G1M1 adalah seperti pada dendrogram (Gambar 12). Dendrogram tersebut menunjukkan similaritas antar tanaman. Analisis similaritas berdasarkan karakter morfologi dan kandungan capsaicin pada tanaman G1M1 dan G1 kontrol menunjukkan bahwa pada dendrogram tersebut terbentuk 6 *cluster* pada indeks similaritas 0,92, *cluster-cluster* tersebut diantaranya adalah *cluster 1* (G1M1/4, G1M1/15, G1M1/11, G1M1/12, G1M1/14, G1M1/1), *cluster 2* (G1M1/5, G1M1/13), *cluster 3* (G1M1/6, G1M1/7, G1M1/10), *cluster 4* (G1M1/2, G1M1/9), *cluster 5* (G1WT/1, G1WT/2, G1WT/3), *cluster 6* (G1M1/3) (Gambar 12). Dendrogram tersebut menunjukkan bahwa *cluster 4* merupakan kelompok kontrol, *cluster* yang memiliki similaritas paling besar adalah *cluster 1* dengan nilai similaritas 0,93, kemudian *cluster 2* dan *cluster 3* dengan nilai similaritas sebesar 0,92, dan *cluster 3* merupakan *cluster* dengan nilai similaritas paling kecil yaitu 0,86 (Gambar 12).

Tanaman dari *cluster1* diketahui merupakan kelompok tanaman yang memiliki tinggi tanaman cenderung lebih tinggi dibandingkan *cluster* lain, kandungan capsaicin cenderung yang lebih rendah atau setara dengan kandungan capsaicin dari tanaman G1 kontrol ($\geq \pm 7$ mg/g B.B). Tanaman dari *cluster2* diketahui merupakan kelompok tanaman yang memiliki tinggi tanaman yang cenderung lebih pendek dibandingkan *cluster1*, 4, dan 6, akan tetapi setara dengan *cluster 3*. kandungan capsaicin cenderung yang lebih tinggi atau setara dengan kandungan capsaicin dari tanaman G1 kontrol ($\leq \pm 7$ mg/g B.B). Tanaman dari *cluster3* diketahui merupakan kelompok tanaman yang memiliki tinggi tanaman yang cenderung lebih pendek dibandingkan *cluster1*, 4, dan 6, akan tetapi setara dengan *cluster2*. yang memiliki kandungan capsaicin cenderung yang lebih tinggi dari kandungan capsaicin tanaman G1 kontrol ($> \pm 7$ mg/g B.B). Tanaman

dari *cluster4* diketahui merupakan kelompok tanaman yang memiliki jumlah biji yang cenderung lebih banyak dibandingkan dengan *cluster* lain, kandungan capsaicin cenderung yang lebih tinggi atau setara dengan kandungan capsaicin dari tanaman G1 kontrol ($\leq \pm 7$ mg/g B.B). Tanaman dari *cluster5* diketahui merupakan *cluster* yang beranggota semua tanaman G1 kontrol. *Cluster6* hanya beranggotakan satu tanaman yaitu tanaman G1M1/3 yang merupakan tanaman yang memiliki similaritas paling kecil dengan kelompok G1 kontrol (*cluster5*). Hal ini menunjukkan bahwa tanaman G1M1/3 memiliki kemungkinan mutasi paling besar dibandingkan tanaman yang lain. Kemungkinan yang lain adalah tanaman G1M1/3 ini memiliki respon individu yang berbeda terhadap kondisi lingkungan, hal ini menyebabkan terjadinya perbedaan karakter morfologi maupun kandungan capsaicin dari tanaman tersebut.



Gambar 12. Dendrogram tanaman cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 kontrol dan mutan G1M1

Dendrogram (Gambar 12) juga menunjukkan bahwa mutan memiliki karakter yang berbeda dengan tanaman kontrol, hal ini

ditunjukkan dengan tidak adanya mutan yang berada dalam satu *cluster* dengan tanaman kontrol. Hal tersebut menunjukkan bahwa karakter mutan telah mengalami perubahan. Perubahan yang terjadi diketahui menyebabkan perubahan yang bersifat menguntungkan, karena karakter-karakter morfologi dari tanaman mutan cenderung lebih unggul dibandingkan dengan tanaman kontrol. Hal ini didukung dengan data *scoring* yang dihitung dari masing-masing tanaman (LT9), semua tanaman mutan G1M1 memiliki rangking diatas tanaman G1 kontrol. Peningkatan variasi ini dapat disebabkan karena adanya peristiwa segregasi yang tinggi pada tanaman pada generasi kedua (F_2). Segregasi adalah proses pemisahan alel dari suatu gen ketika pembelahan meiosis (Kohmetscher & Lee, 2013), alel yang telah berpisah dan berpasangan dengan alel lain secara bebas sehingga sel yang terbentuk akan memperoleh sifat dari kedua induknya (Bateson & Mendel, 2013). Variasi tanaman cabai pada penelitian ini juga dapat meningkat dengan adanya penyerbukan silang yang terjadi antar genotipe. Walaupun sebagian besar spesies *Capsicum* bersifat menyerbuk sendiri (*self pollination*) tetapi penyerbukan silang (*cross pollination*) secara alami dapat pula terjadi dengan bantuan lebah dengan persentase persilangan berkisar 7,6-36,8% (Greenleaf, 1986). Kim dkk. (2009) melaporkan bahwa penyerbukan silang alami pada tanaman cabai dapat terjadi dalam jarak 18 m. Persilangan antar spesies cabai bisa dilakukan secara alami maupun dengan bantuan manusia, hal ini disebabkan karena antar spesies cabai mempunyai kesamaan kromosom yaitu diploid ($2n = 2x = 24$) (Wang & Bosland, 2006). Akan tetapi, Greenleaf (1986) melaporkan bahwa persilangan antar spesies tanaman cabai ada yang relatif mudah misalnya seperti antara *Capsicum annuum* x *Capsicum chinense* dan *Capsicum frutescens* x *Capsicum pendulum*, namun ada juga yang sangat sulit untuk melakukan persilangan misalnya seperti antara *Capsicum annuum* x *Capsicum frutescens*, *Capsicum annuum* x *C. pubescens* dan *Capsicum pendulum* x *Capsicum pubescens*.

Konfirmasi adanya mutasi dengan metode sekuensing dilakukan dengan memilih satu perwakilan tanaman dari masing-masing *cluster* dan berdasarkan ranking tanaman dari hasil analisis *scoring* (LT8). Pemilihan tanaman juga didasarkan pada karakter morfologi maupun karakter fisiologi (kandungan capsaicin) yang unggul dari masing-masing tanaman pada setiap *cluster*. Hal ini bertujuan untuk

mengetahui profil gen *KasI* tanaman mutan yang memiliki karakter unggul.

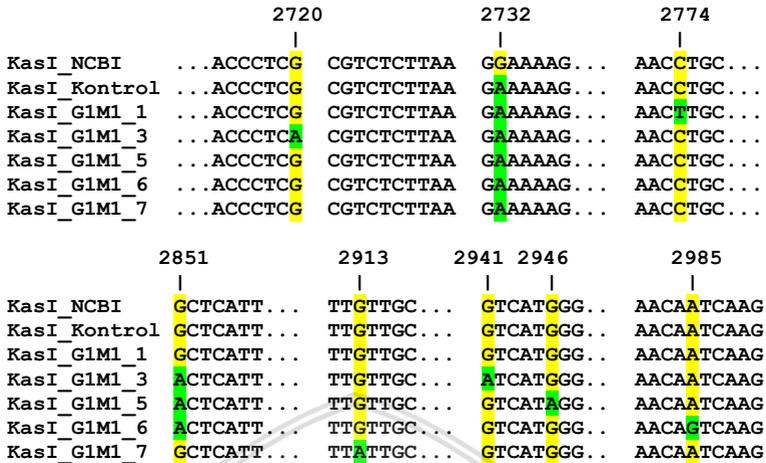
4.4 Profil Gen *KasI* pada Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) G1 Kontrol dan Mutan G1M1

Gen *KasI* merupakan gen yang berperan dalam pembentukan enzim *3-oxoacyl-ACP (acyl carrier protein) synthetase*. Enzim ini bertanggung jawab dalam tahap perpanjangan rantai asam lemak selama proses biosintesis (Aluru dkk., 2003). Gen *KasI* secara utuh memiliki panjang sekuens 3456 bp, yang terbagi dalam delapan ekson (Reddy dkk., 2014), akan tetapi pada penelitian ini gen *KasI* diamplifikasi secara parsial hingga menghasilkan produk sepanjang 964 bp (LG4). Hasil amplifikasi disekuensing kemudian di-*trimming* dan *alignment* hingga diperoleh produk pada bagian ekson 6 dan ekson 7 sepanjang sepanjang 314 bp, mulai basa nomor 2695 sampai 3008. Hasil analisis *Basic Local Alignments Search Tool* (BLAST) antara sekuens gen *KasI* pada masing-masing tanaman dengan sekuens *Capsicum annum 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (KasI) gene, KasI-a allele, complete cds* (kode akses GeneBank KM037709.1) yang terdapat pada NCBI menunjukkan homologi yang tinggi, yaitu sebesar 99% (LT10). Hasil *alignment* menunjukkan adanya beberapa perubahan atau perbedaan pada basa dan beberapa disertai dengan adanya perubahan komposisi asam amino dari masing-masing sekuens (Gambar 13; Gambar 14; LG5).

Tanaman kontrol maupun mutan menunjukkan adanya satu perbedaan basa dengan sekuens gen *KasI* pembandingan dari NCBI, perbedaan tersebut terjadi karena substitusi guanin (G) menjadi adenin (A) pada basa nomor 2732. Perubahan basa ini menyebabkan adanya perubahan asam amino yang dikode yaitu glisin (GGA) menjadi glutamat (GAA). Pada tanaman G1M1/1 terdapat satu basa yang berbeda dengan sekuens gen *KasI* kontrol, perbedaan tersebut terdapat pada basa nomor 2774, perbedaan tersebut terjadi karena adanya substitusi sitosin (C) menjadi timin (T), akibatnya asam amino yang dikode juga ikut berbeda yaitu prolin (CCT) menjadi leusin (CTT). Pada tanaman G1M1/3 terdapat tiga perubahan basa yaitu terjadi substitusi guanin (G) menjadi adenin (A) pada basa nomor 2720, 2851, dan 2941. Mutasi tersebut menyebabkan perubahan asam amino, yaitu pada basa nomor 2720, terjadi perubahan asam amino arginin (CGC) menjadi histidin (CAC), pada basa nomor

2851, terjadi perubahan asam amino alanin (GCT) menjadi threonin (ACT), pada basa nomor 2941 terjadi perubahan asam amino valin (GTC) menjadi isoleusin (ATC). Pada tanaman G1M1/5 terdapat dua perubahan basa yaitu substitusi guanin (G) menjadi adenin (A) pada basa nomor 2851 dan 2941. Kedua perubahan basa ini menyebabkan perubahan asam amino yang terbentuk yaitu pada basa nomor 2851, terjadi perubahan asam amino alanin (GCT) menjadi threonin (ACT), dan pada basa nomor 2964 terjadi perubahan asam amino metionin (ATG) menjadi isoleusin (ATA). Pada tanaman G1M1/6 terdapat dua perubahan basa yaitu substitusi guanin (G) menjadi adenin (A) pada basa nomor 2851 dan 2985. Mutasi pada basa nomor 2851 menyebabkan perubahan asam amino alanin (GCT) menjadi threonin (ACT), sedangkan mutasi pada basa nomor 2985 tidak menyebabkan adanya perubahan asam amino. Pada tanaman G1M1/7 terdapat satu perubahan basa yaitu substitusi guanin (G) menjadi adenin (A) pada basa nomor 2913. Mutasi yang terjadi ini tidak menyebabkan adanya perubahan asam amino (Gambar 10) (Gambar 11) (Gambar 13; Gambar 14; Tabel 2). Semua perubahan basa yang terjadi merupakan substitusi basa guanin (G)/sitosin (C) menjadi adenin (A)/timin (T). Substitusi merupakan salah satu bentuk dari terjadinya mutasi titik. Perubahan ini kemungkinan terjadi karena adanya pengaruh EMS yang diberikan.

Salinas & Sánchez-Serrano (2006) menjelaskan bahwa mutagen EMS merupakan mutagen penyebab mutasi titik yang terjadi secara acak, jenis mutasi yang dihasilkan adalah substitusi dari basa guanin (G) menjadi adenin (A) atau dari basa sitosin (C) menjadi timin (T) dengan intensitas mutasi sebesar 1/3000 bp. Mutasi yang terjadi pada gen *KasI* dapat mempengaruhi biosintesis capsaicin, kemungkinan pengaruh dari mutasi yang terjadi menyebabkan antara tanaman G1M1 memiliki variasi kandungan capsaicin yang cukup tinggi, antara 5,36-10,17 mg/gram B.B. Hal ini disebabkan karena gen *KasI* merupakan gen yang memiliki peran dalam proses biosintesis capsaicin pada jalur *branched-fatty acid*. Gen ini berfungsi untuk meregulasi sekresi enzim *3-oxoacyl-ACP synthetase*, yang bertanggung jawab dalam tahap perpanjangan rantai asam lemak, pemanjangan ini dilakukan dengan cara menambah dua atom C ke rantai sampingnya, sehingga ketika gen ini tidak berfungsi maka prekursor capsaicin *8-methyl-6-nonenic acid* tidak terbentuk sehingga biosintesis capsaicin pun tidak dapat berlangsung dengan baik atau bahkan gagal terjadi (Aluru dkk., 2003).



Gambar 13. Profil gen *KasI* antara cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1 yang mengalami mutasi. Keterangan: warna ■ menunjukkan adanya perubahan basa; warna □ menunjukkan basa yang tidak mengalami perubahan; (...) sekuen di-trimming.

Spesies *Capsicum annum* yang digunakan sebagai pembandingan dalam analisis sekuens merupakan tanaman cabai yang memiliki kandungan capsaicin yang rendah berkisar antara 0,1 – 2,5 mg/gram B.B (Othman dkk., 2011), sedangkan tanaman mutan G1M1 yang diamati pada penelitian ini memiliki kandungan capsaicin berkisar antara 5,36 sampai 10,17 mg/gram B.B. Analisis sekuens gen *KasI* antara *Capsicum annum* (KM037709.1) dan G1 mutan maupun kontrol menunjukkan adanya satu basa yang berbeda dan berakibat pada perubahan satu asam amino yang berubah yaitu glisin menjadi glutamat (Tabel 2). Perubahan asam amino ini kemungkinan merupakan salah satu penyebab perbedaan kandungan capsaicin antara *Capsicum annum* dan G1. Hal didasarkan pendapat Mazourek dkk. (2009) yang menyatakan bahwa glutamat banyak berperan dalam sebagai kofaktor enzim *branched chain amino acid amino transferase* (BCAT), enzim ini berfungsi untuk mengubah glutamat menjadi α -ketoglutarat (α -KG) (Li dkk., 2003). α -ketoglutarat selanjutnya berperan sebagai substrat untuk pembentukan gugus *acyl*, semakin panjang rantai C yang terbentuk akan berpengaruh pada peningkatan kepedasan cabai (Mazourek dkk., 2009). Berdasarkan hal ini kemungkinan yang menjadi salah satu penyebab

perbedaan kandungan capsaicin yang cukup besar antara tanaman *Capsicum annuum* dan G1 mutan maupun kontrol adalah adanya perbedaan satu asam amino pada sekuen partial gen *KasI* ini.

		2720		2732		2774		2851				
KasI_NCBI	Pro-	Arg-	Val-	Ser-	Gly-	Lys-...	Gln-	Pro-	Ala-...	Glu-	Ala-	His
KasI_Kontrol	Pro-	Arg-	Val-	Ser-	Glu-	Lys-...	Gln-	Pro-	Ala-...	Glu-	Ala-	His
KasI_G1M1_1	Pro-	Arg-	Val-	Ser-	Glu-	Lys-...	Gln-	Leu-	Ala-...	Glu-	Ala-	His
KasI_G1M1_3	Pro-	His-	Val-	Ser-	Glu-	Lys-...	Gln-	Pro-	Ala-...	Glu-	Thr-	His
KasI_G1M1_5	Pro-	Arg-	Val-	Ser-	Glu-	Lys-...	Gln-	Pro-	Ala-...	Glu-	Thr-	His
KasI_G1M1_6	Pro-	Arg-	Val-	Ser-	Glu-	Lys-...	Gln-	Pro-	Ala-...	Glu-	Thr-	His
KasI_G1M1_7	Pro-	Arg-	Val-	Ser-	Glu-	Lys-...	Gln-	Pro-	Ala-...	Glu-	Ala-	His
		2913		2941	2946		2985					
KasI_Comp1	Leu-...	His-	Leu-	Leu-...	Leu-	Val-	Met-	Gly-...	Leu-	Gln-	Gln	
KasI_Kontrol	Leu-...	His-	Leu-	Leu-...	Leu-	Val-	Met-	Gly-...	Leu-	Gln-	Gln	
KasI_G1M1_1	Leu-...	His-	Leu-	Leu-...	Leu-	Val-	Met-	Gly-...	Leu-	Gln-	Gln	
KasI_G1M1_3	Leu-...	His-	Leu-	Leu-...	Leu-	Ile-	Met-	Gly-...	Leu-	Gln-	Gln	
KasI_G1M1_5	Leu-...	His-	Leu-	Leu-...	Leu-	Val-	Ile-	Gly-...	Leu-	Gln-	Gln	
KasI_G1M1_6	Leu-...	His-	Leu-	Leu-...	Leu-	Val-	Met-	Gly-...	Leu-	Gln-	Gln	
KasI_G1M1_7	Leu-...	His-	Leu-	Leu-...	Leu-	Val-	Met-	Gly-...	Leu-	Gln-	Gln	

Gambar 14. Profil asam amino gen *KasI* cabai rawit G1 kontrol dan mutan G1M1 yang mengalami perubahan. Keterangan: warna ■ menunjukkan adanya perubahan basa; warna ■ menunjukkan asam amino yang tidak mengalami perubahan; (-) merupakan simbol pembatas antara asam amino satu drngan asam amino selanjutnya; (...) merupakan sekuen asam amino di-trimming.

Analisis profil gen *KasI* pada tanaman mutan G1M1 menunjukkan bahwa homologi sekuens gen *KasI* tanaman G1 kontrol dan mutan G1M1 dengan sekuens gen *KasI* pembanding sebesar 99% (Lampiran 10). Jumlah perubahan basa nukleotida dan asam amino yang terjadi pada gen *KasI* ternyata tidak mempengaruhi kandungan capsaicin pada tanaman mutan G1M1. Hal ini dapat dilihat pada tanaman G1M1/7 yang tidak memiliki perbedaan komposisi asam amino dengan G1 kontrol, akan tetapi kandungan capsaicinnya berbeda. Tanaman G1M1/6 diketahui merupakan tanaman yang memiliki kandungan capsaicin tertinggi dibandingkan tanaman lainnya, berdasarkan sekuens gen *KasI* dari tanaman ini dapat diketahui bahwa terdapat satu perubahan asam amino dibandingkan dengan G1 kontrol, yaitu perubahan alanin menjadi threonin. Threonin diketahui merupakan asam amino yang biasa berperan sebagai katalis dalam biosintesis *branched-fatty acid* pada

tanaman (Binder, 2010), sehingga kemungkinan dengan adanya threonin ini maka reaksi pemanjangan asam lemak pada proses pembentukan prekursor capsaicin menjadi lebih optimal akibatnya capsaicin yang dihasilkan menjadi lebih banyak.

Tabel 1. Perubahan basa dan asam amino pada sekuens gen *KasI* masing-masing tanaman dibandingkan dengan sekuens *Capsicum annuum KasI gene, complete cds* (KM037709.1).

Sekuen <i>KAS1</i>	Situs Mutasi (bp)	Jenis mutasi	Perubahan codon	Perubahan Asam amino	Kandungan capsaicin (mg/g B.B)
G1M1/1	2774	Substitusi	CCT → CTT	Prolin → Leusin	5,737
	2720	Substitusi	CGC → CAC	Arginin → Histidin	
G1M1/3	2851	Substitusi	GCT → ACT	Alanin → Threonin	8,525
	2941	Substitusi	GTC → ATC	Valin → Isoleusin	
G1M1/5	2851	Substitusi	GCT → ACT	Alanin → Threonin	8,435
	2946	Substitusi	ATG → ATA	Metionin → Isoleusin	
G1M1/6	2851	Substitusi	GCT → ACT	Alanin → Threonin	10,001
	2985	Substitusi	CAA → CAG	Glutamin → Glutamin	
G1M1/7	2913	Substitusi	TTG → TTA	Leusin → Leusin	9,689

Tanaman G1M1/3 merupakan tanaman yang memiliki perbedaan dengan tanaman kontrol paling besar, baik secara morfologi, fisiologi. Analisis sekuens gen *KasI* pada tanaman G1M1/3 juga menunjukkan bahwa tanaman ini mengalami perubahan basa yang paling banyak dibandingkan dengan kontrol maupun NCBI (Tabel 1). Berdasarkan analisis morfologi dan fisiologi juga menunjukkan bahwa G1M1/3 memiliki sifat yang paling banyak perbedaannya dibandingkan dengan kontrol, hal ini ditunjukkan dengan analisis similaritas dengan dendrogram yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tanaman ini terpisah ke dalam satu *cluster* tersendiri dengan tingkat similaritas terendah dengan kontrol yaitu 0,86 (Gambar 12). Hal ini kemungkinan dapat disebabkan karena EMS yang diberikan menyebabkan perubahan yang besar pada tanaman G1M1/3.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Tanaman G1M1 memiliki karakter tinggi tanaman, jumlah cabang, panjang dan diameter buah, jumlah biji dan berat buah yang meningkat secara signifikan dibandingkan dengan G1 kontrol, sedangkan karakter jumlah bunga tiap aksil dan hari pembungaan tidak berbeda signifikan dengan G1 kontrol, akan tetapi mutan G1M1 cenderung memiliki karakter yang lebih unggul dibandingkan dengan G1 kontrol. Kandungan capsaicin tanaman G1M1 tidak berbeda signifikan dengan tanaman G1 kontrol, kandungan capsaicin mutan G1M1 memiliki variasi yang lebih besar dibandingkan kontrol. Profil gen *KasI* tanaman G1M1 dan kontrol memiliki beberapa perbedaan. Perbedaan tersebut disebabkan karena adanya mutasi titik berupa substitusi. Substitusi ini menyebabkan terjadinya perubahan komposisi asam amino pada sekuen gen *KasI* pada masing-masing mutan. Hal ini kemungkinan mengakibatkan peningkatan variasi kandungan capsaicin pada tanaman mutan G1M1.

5.2 Saran

Penyilangan antar tanaman mutan yang memiliki karakter unggul perlu dilakukan supaya dapat diperoleh anakan yang memiliki karakter unggul dari kedua induknya. Penelitian terhadap gen-gen lain yang berperan dalam biosintesis capsaicin juga perlu dilakukan karena dalam biosintesis capsaicin diregulasi oleh banyak gen, sehingga untuk dapat mengetahui pengaruh mutasi terhadap kandungan capsaicin belum cukup apabila yang dikaji satu gen saja. Pengukuran dihidrocapsaicin juga perlu dilakukan untuk dapat mengetahui tingkat kepedasan cabai secara tepat.

DAFTAR PUSTAKA

- Aluru, M. R., M. Mazourek, L. G. Landry, J. Curry, M. Jahn, & M. A. O'connell. 2003. Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in Capsicum fruit. *Journal of Experimental Botany*. 54(388): 1655-1664.
- Arce-Rodríguez, M. L., & N. Ochoa-Alejo. 2015. Silencing AT3 gene reduces the expression of *pAmt*, *BCAT*, *Kas*, and *Acl* genes involved in capsaicinoid biosynthesis in chili pepper fruits. *Biologia Plantarum*. 59(3): 477-484.
- Arisha., M. H., S. N. M. Shah, Z. H. Gong, H. Jing, C. Li & H. X. Zhang. 2015. Ethyl methane sulfonate induced mutations in M2 generation and physiological variations in M1 generation of peppers (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Plant Science*. 8(399): 1-11.
- Arruvasari, P. N. 2016. **Pengaruh induksi mutagen *ethyl methane sulfonat* (EMS) terhadap karakter morfologi dan kandungan capsaicin tiga genotip cabai rawit lokal (*Capsicum frutescens* L.)**. Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.
- Aruldoss, T. & L. Mullainathan. 2015. effect of gamma rays and EMS on phytochemical constituents in chilli (*Capsicum annuum* L.). Var-K₁ on M₂ generation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*. 4(3): 92-101.
- Arumingtyas, E. L., A. Munawarti, & S. Indriyani. 2010. Polymorphism analysis of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) mutants based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Journal of Materials Science and Engineering*. 4(2).
- Aza-González, C., H. G. Núñez-Palenius, N. Ochoa-Alejo. 2011. Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant cell reports*. 30(5): 695-706.
- Azrai, M. 2006. **Sinergi teknologi marka molekular dalam pemuliaan tanaman jagung**. Pustaka. Litbang. Deptan. Bogor.
- Barbero, G. F., M. Palma, & C. G. Barroso. 2006. Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 578(2): 227-233.
- Barbero, G. F., A. G. Ruiz, A. Liazid, M. Palma, J. C. Vera, & C. G. Barroso. 2014. Evolution of total and individual capsaicinoids in

- peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*. 153: 200-206.
- Bateson, W., & G. Mendel. 2013. **Mendel's principles of heredity**. Dover Publication Inc. New York.
- Bidgoli, A. M., G. A. Akbari, M. J. Mirhadi, E. Zand, & S. Soufizadeh. 2006. Path analysis of the relationships between seed yield and some morphological and phenological traits in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Euphytica*. 148(3): 261-268.
- Binder, S. 2010. **Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana***. *Arabidopsis Book*. Washington.
- Bosland, P. W., E. J. Votava, & E. M. Votava. 2012. **Peppers: vegetable and spice capsicums (Vol. 22)**. CABI. Publishing. London.
- Cahya, E. B. N. 2014. Pendugaan parameter genetik tanaman cabai (*Capsicum annuum* L.) di lahan gambut. *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Pertanian*. 1(2): 1-14.
- Carvalho, T. C., F. C. Krzyzanowski, O. C. Ohlson, & M. Panobianco. 2013. Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. *Journal Seed Science*. 35(3): 361-367.
- Chapa-Oliver, A. M., & L. Mejía-Teniente. 2016. Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules*. 21(8): 931.
- Chopra, V. L. 2005. Mutagenesis: investigating the process and processing the outcome for crop improvement. *Current Science*. 89(2): 353-359.
- Choudhary, B. S. & D. K. Samadia. 2004. Variability and character association in chilli land races and genotypes under acid environment. *Indian Journal of Horticulture*. 61: 132-36.
- Cline, M. G. 1994. The role of hormones in apical dominance. new approaches to an old problem in plant development. *Physiologia Plantarum*. 90: 230-237.
- Curry, J., M. Aluru, M. Mendoza, J. Nevarez, M. Melendrez, & M. A. O'Connell. 1999. Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science*. 148(1), 47-57.
- Dalimartha, S. 2003. **Atlas tumbuhan obat indonesia. Jilid II**. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- Davis, C. B., C. E. Markey, M. A. Busch, & K. W. Busch. 2007. Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(15), 5925-5933.

- Dehesh, K., H. Tai, P. Edwards, J. Byrne, J. G. Jaworski. 2001. Overexpression of 3-Ketoacyl-Acyl-Carrier Protein Synthase III in plants reduces the rate of lipid synthesis. *Plant Physiology*. 125: 1103–1114.
- Dias, G. B., V. M. Gomes, T. M. Moraes, U. P. Zottich, G. R. Rabelo, A. O. Carvalho, M. Moulin, L. S. Gonçalves, R. Rodrigues, & M. Da-Cunha. 2013. Characterization of Capsicum species using anatomical and molecular data. *Genetics and Molecular Research Journal*. 12. 6488-6501.
- Díaz, J., F. Pomar, A. Bernal, & F. Merino. 2004. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews*. 3(1-2): 141-157.
- Fatchiyah, F., E. L. Arumingtyas, S. Widarti, & S. Rahayu. 2011. **Biologi molekular: prinsip dasar analisis**. Erlangga. Jakarta.
- González-Zamora, A., E. Sierra-Campos, R. Pérez-Morales, C. Vázquez-Vázquez, M. A. Gallegos-Robles, J. D. López-Martínez, & J. L. García-Hernández. 2015. Measurement of capsaicinoids in Chiltepin hot pepper: a comparison study between spectrophotometric method and high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chemistry*. 2015: 120-130.
- Greenleaf, W. H. 1986. **Pepper breeding. p. 67-134. In M. J. Basset (Eds.)**. Breeding Vegetables Crops. AVI Publishing Co. Connecticut.
- Haferkamp, M. R. 1987. Environmental factors affecting plants productivity. *Achieving Efficient Use of Rangeland Resources. Forth Keogh Research Symposium*. 27-36.
- Hui, Y. H., F. Chen, L. M. L. Nollet, R. P. F. Guiné, J. L. Le Quéré, O. Martín-Belloso, M. I. Mínguez-Mosquera, G. Paliyath, F. L. P. Pessoa, J. S. Sidhu, N. Sinha, P. Stanfield. 2010. **Handbook of fruit and vegetable flavors**. John Wiley and Sons. London.
- Ikpeme, C.E., Peters H., & Orim A.O. 2014. Comparative evaluation of the nutritional, phytochemical, and microbiological quality of three pepper varieties. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2(3): 74-80.
- IPGRI, AVRDC, & CATIE. 1995. **Descriptor for Capsicum (Capsicum spp.)**. International Plant Genetic Resources Institute. Roma, The Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei, Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Ensenanza, Turrialba.

- Jabeen, N. & B. Mirza. 2004. Ethyl methane sulfonate induces morphological mutations in *Capsicum annuum*. *International Journal of Agriculture & Biology*. 6(2): 340-345.
- Jarret, R. L., E. Baldwin, B. Perkins, R. Bushway, & K. Guthrie. 2007. Diversity of fruit quality characteristics in *Capsicum frutescens* L.. *HortScience*. 42(1): 16-19.
- Jung, C., & A. E. Müller. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science*. 14(10): 563-573.
- Kim, C. G., D. I. Kim, H. J. Kim, J. I. Park, B. Lee, K. W. Park, S. C. Jeong, K. H. Choi, J. H. An, K. H. Cho, Y. S. Kim, H. M. Kim. 2009. Assessment of gene flow from genetically modified anthracnose-resistant chili pepper (*Capsicum annuum* L.) to a conventional crop. *Journal of Plant Biology*. 52: 251-258.
- Kim, S., M. Park, S. I. Yeom, Y. M. Kim, J. M. Lee, H. A. Lee, E. Seo, J. Choi, K. Cheong, K. T. Kim, K. Jung, G. W. Lee, S. K. Oh, C. Bae, S. B. Kim, H. Y. Lee, S. Y. Kim, M. S. Kim, B. C. Kang, Y. D. Jo, H. B. Yang, H. J. Jeong, W. H. Kang, J. K. Kwon, C. Shin, J. Y. Lim, J. H. Park, J. H. Huh, J. S. Kim, B. D. Kim, O. Cohen, I. Paran, M. C. Suh, S. B. Lee, Y. K. Kim, Y. Shin, S. J. Noh, J. Park, Y. S. Seo, S. Y. Kwon, K. A. Kim, J. M. Park, H. J. Kim, S. B. Choi, P. W. Bosland, G. Reeves, S. H. Jo, B. W. Lee, H. T. Cho, H. S. Choi, M. S. Lee, Y. Yu, Y. D. Choi, B. S. Park, A. van Deynze, A. Ashrafi, T. Hill, W. T. Kim, H. S. Pai, H. K. Ahn, I. Yeam, J. J. Giovannoni, J. K. C. Rose, I. Sørensen, S. J. Lee, R. W. Kim, I. Y. Choi, B. S. Choi, J. S. Lim, Y. H. Lee & D. Choi. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*. 46(3):270-279.
- Kohmetscher, A., & D. Lee. 2013. Segregation of genes: the plant breeder's method of predicting the future. *Natural Sciences Education*. 42(1), 191.
- Kumar, S., G. Stecher, & K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7): 1870-1874.
- Leonard J. M., S. J. Knapp, M. B. Slabaugh. 1998. A Cupheab-ketoacyl-ACP synthase shifts the synthesis of fatty acids towards shorter chains in *Arabidopsis* seeds expressing *Cuphea* FatB thioesterases. *The Plant Journal* 13: 621–628.

- Li, L., P. Thipyapong, D. C. Breeden, & J. C. Steffens. 2003. Overexpression of a bacterial branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in *Arabidopsis* results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. *Plant Science*. 165(6): 1213-1219.
- Mauro-Herrera, M., & A. N. Doust. 2016. Development and genetic control of plant architecture and biomass in the panicoid grass, *Setaria*. *PloS one*. 11(3).
- Mazourek, M., A. Pujar, Y. Borovsky, I. Paran, L. Mueller, & M. M. Jahn. 2009. A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*. 150(4): 1806-1821.
- Michaels, S. D. 2009. Flowering time regulation produces much fruit. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 75–80.
- Mohd-Yusoff, N. F., P. Ruperao, N. E. Tomoyoshi, D. Edwards, P. M. Gresshoff, B. Biswas & J. Batley. 2015. Scanning the effects of ethyl methanesulfonate on the whole genome of *Lotus japonicus* using second-generation sequencing analysis. *G3-Genes, Genomes, Genetics*. 5: 559-567.
- Mondini, L., A. Noorani & M. A. Pagnotta. 2009. Review: assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1: 19-35.
- Mubarokah, N., H. B. Setyawan, U. Sholikah. 2015. Kadar capsaicin dua varietas cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) sebagai respon pengaruh dosis pupuk nitrogen. *Berkala Ilmiah* 1(1).
- Munshi, A. 2012. **DNA sequencing—methods and applications**. Janeza Trdine. Rijeka.
- Ogawa, K., K. Murota, H. Shimura, M. Furuya, Y. Togawa, T. Matsumura & C. Masuta. 2015. Evidence of capsaicin synthase activity of the *pun1*-encoded protein and its role as a determinant of capsaicinoid accumulation in pepper. *BMC Plant Biology*. 15(93): 1-10.
- Othman, Z. A. A., Y. B. H. Ahmed, M. A. Habila, & A. A. Ghafar. 2011. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules*. 16(10): 8919-8929.
- Peeraullee, N., & V. M. Ranghoo-Sanmukhiya. 2013. Assessment of genetic diversity in local chilli (*Capsicum annum*) varieties in Mauritius. *International Journal of Agriculture & Biology*. 15(5).
- Perucka, I. & M. Maters, 2003. Antioxidant activity and content of capsaicinoids isolated from paprika fruits. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 12(2): 15-18.

- Pitojo, S. 2003. **Benih cabai**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Poulos, J. M. 1753. *Capsicum* (PROSEA). [https://uses.plantnet-project.org/en/Capsicum_\(PROSEA\)](https://uses.plantnet-project.org/en/Capsicum_(PROSEA)). Diakses tanggal 10 Juni 2018.
- Prasad, N. B. C., R. Shrivastava, G. A. Ravishankar. 2005 Capsaicin as multifaceted drug from *Capsicum* spp. *Evidence Based Medicine Journal*. 2: 147–166.
- Ratih, N. 2016. **Analisis variasi genetik cabai rawit (*capsicum spp.*) komersial di kota malang berdasarkan karakter morfologi**. Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.
- Reddy, U. K., A. Almeida, V. L. Abburi, S. B. Alaparathi, D. Unsel, G. Hankins, P. Minkyu, C. Doil, & P. Nimmakayala. 2014. Identification of gene-specific polymorphisms and association with capsaicin pathway metabolites in *Capsicum annum* L. collections. *PLoS one*. 9(1).
- Rizki, F. 2013. **The miracle of vegetables**. AgroMedia Pustaka. Jakarta.
- Rohini, N., V. Lakshmanan, D. Saraladevi, J. John, & P. Govindarasu. 2017. Performance evaluation and variability studied in F₂ progenies of hot pepper (*Capsicum annum* L. *annuum*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(3): 1314-1324.
- Roy, D. 2000. **Plant breeding: analysis and exploitation of variation**. Alpha Science International Ltd., Oxford.
- Rukmana R. 2002. **Usaha tani cabai rawit**. Kanisius. Yogyakarta.
- Salam, C. M. A. & J. E. Thoppil. 2010. Isolation of induced morphological mutants in *Capsicum annum* L. *Journal of Phytology*. 2(2): 57–63.
- Salinas, Julio & J. J. Sánchez-Serrano. 2006. **Methods in molecular biology: arabidopsis protocol. 2nd ed.** Humana Press Inc. New Jersey.
- Sarkar, S., D. Murmu, A. Chattopadhyay, & P. Hazra. 2009. Genetic variability, correlation and path analysis of some morphological characters in chilli. *Journal of Crop and Weed*. 5(1): 162-166.
- Sigma-Aldrich. 2017. Ethyl Methane Sulfonate. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m0880?lang=en®ion=ID>. Diakses tanggal 10 Juli 2018.
- Srivastava, S. K. 2013. **Role of capsaicin in oxidative stress and cancer**. Springer Science & Business Media. New York.

- Tanaka, Y., F. Nakashima, E. Kirii, T. Goto, Y. Yoshida, & K. I. Yasuba. 2017. Difference in capsaicinoid biosynthesis gene expression in the pericarp reveals elevation of capsaicinoid contents in chili peppers (*Capsicum chinense*). *Plant Cell Reports*. 36(2): 267-279.
- Tiwari, A., A. Vivian-Smith, R. E. Voorrips, M. E. Habets, L. B. Xue, R. Offringa, & E. Heuvelink. 2011. Parthenocarpic potential in *Capsicum annuum* L. is enhanced by carpelloid structures and controlled by a single recessive gene. *BMC Plant Biology*. 11(1): 143-156.
- Todd, P. H., M. G. Bensinger, & T. Biftu. 1977. Determination of pungency due to capsaicin by gas-liquid chromatography. *Journal of Food Science*. 42(3): 660-665.
- Usman, M. G., M. Y. Rafii, M. R. Ismail, M. A. Malek & M. A. Latif. 2014. Capsaicin and dihydrocapsaicin determination in chili pepper genotypes using ultra-fast liquid chromatography. *Molecules*. 19: 6474-6488.
- Vrebalov, J., D. Ruezinsky, V. Padmanabhan, R. White, D. Medrano, R. Drake, & J. Giovannoni. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science*, 296(5566): 343-346.
- Wang, D. & P. W. Bosland. 2006. The genes of *Capsicum*. *HortScience*. 41: 1169-1187.
- Williams, O. J., G. S. Raghavan, V. Orsat, & J. Dai. 2004. Microwave-assisted extraction of capsaicinoids from capsicum fruit. *Journal of Food Biochemistry*. 28: 113-122.