

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Botani *Canavalia ensiformis*

Canavalia ensiformis atau koro pedang merupakan salah satu jenis kacang-kacangan dari suku Fabaceae yang tumbuh merambat dengan panjang hingga 10 meter dan beberapa semi-tegak. Batangnya berbentuk silinder dan berongga dengan permukaan berambut halus pada usia muda tetapi kehilangan rambut tersebut ketika dewasa (*glabrescent*). Tumbuhan tersebut memiliki kedudukan daun berseling (*alternate*) dan setiap tangkai daun terdiri dari tiga helai daun (*trifoliolate*). Daunnya tipis dan kaku seperti kertas (*chartaceous*) serta helainya berbentuk jorong dengan panjang 6–20 cm dan lebar 5–2 cm. Ujung daunnya tumpul dengan cabang kecil di ujung serta pangkal daun yang juga tumpul. Kedua permukaan daun ditutupi oleh rambut halus (*strigulose*) dan memiliki bintik-bintik. Tangkai daun dan sumbu daun berbentuk silindris dan mulai kehilangan bulu-bulu halusya seiring waktu. Tangkainya kecil (*petiolules*) yang menghubungkan setiap helai daun dengan panjang sekitar 8 mm (Ekanayake et al., 2000; Acevedo-Rodríguez, 2005). Klasifikasi *Canavalia ensiformis* ditunjukkan sebagai berikut (Febles, 2017).

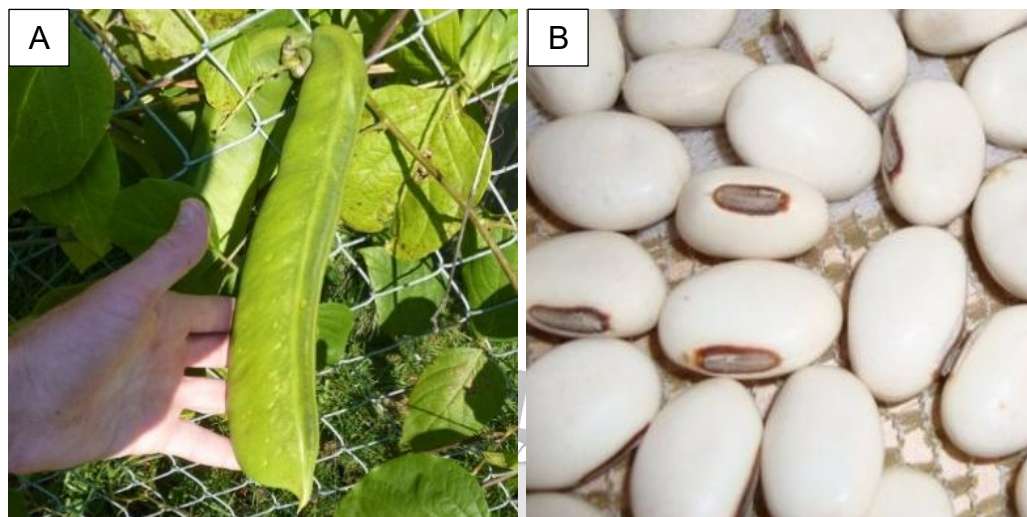
Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Kelas	:	Dicotyledonae
Ordo	:	Fabales
Famili	:	Fabaceae
Subfamili	:	Papilionoideae
Genus	:	Canavalia
Spesies	:	<i>Canavalia ensiformis</i>



Gambar 2.1 Bunga *C. ensiformis*

Sumber: Febles (2017)

Canavalia ensiformis memiliki tangkai bunga yang panjangnya bervariasi antara 13–37 cm. Tangkai bunga yang terpapar langsung matahari biasanya berwarna hijau kemerahan sementara yang berada di bawah naungan cenderung berwarna hijau. Bunga ini tergolong bunga lengkap, terdiri dari organ reproduksi Jantan (stamen), organ reproduksi betina (pistil), mahkota bunga (korola), dan kelopak bunga (kaliks). Bunga ini juga termasuk dalam kategori bunga majemuk di mana satu kuncup terdapat sekitar 13 bunga. Bunga *C. ensiformis* terdiri dari lima helai mahkota, meliputi satu mahkota besar yang disebut bendera (*vexillum*), dua mahkota di bagian atas yang disebut lunas (*carina*), dan dua mahkota samping yang disebut sayap (*wings*). Mahkota bunganya berwarna ungu keputihan sedangkan kelopaknya berwarna hijau. Bunganya memiliki satupistil berwarna putih dan 10 stamen yang berkelompok dan juga berwarna putih. Bunga muncul di cabang, batang utama, dan ketiak daun (Gambar 2.1). Adanya perbedaan warna tangkai bunga bergantung dari ada tidaknya naungan bagi tanaman tersebut (Saragih et al., 2018).



Gambar 2.2 Polong (A) dan Biji (B) *C. ensiformis*

Sumber: Febles (2017); Sridhar et al. (2021)

Polong (buah) *C. ensiformis* memiliki bentuk linear mencapai panjang 30 cm dan lebar 3,5 cm. Polongnya keras dan sedikit melengkung dengan setiap katup memiliki tiga rusuk memanjang (Acevedo-Rodríguez, 2005) (Gambar 2.2). Biji *C. ensiformis* memiliki panjang 18,2–19,3 mm dan lebar 12,5–14,1 mm. Sedangkan diameternya mencapai 8–9 mm. Biji tanaman ini memiliki berat 156,15 g tiap 100 bijinya. Warna dasar *C. ensiformis* adalah putih dengan warna corak yang polos serta bentuk lonjong menjorong (Nisa, 2018) (Gambar 2.3).

2.1.2 Distribusi *C. ensiformis*

Canavalia ensiformis tumbuh di daerah tropis dan subtropis, termasuk di wilayah Amerika Selatan, Afrika Barat, Pasifik Selatan, dan Asia (Sherasia et al., 2018). Tanaman ini tumbuh subur di wilayah dengan iklim lembap dengan ketinggian hingga 1.800 meter di atas permukaan laut dan curah hujan tahunan antara 800 hingga 2.000 mm.



Gambar 2.3 Peta Persebaran *C. ensiformis* di Dunia

Sumber: GBIF (2024)

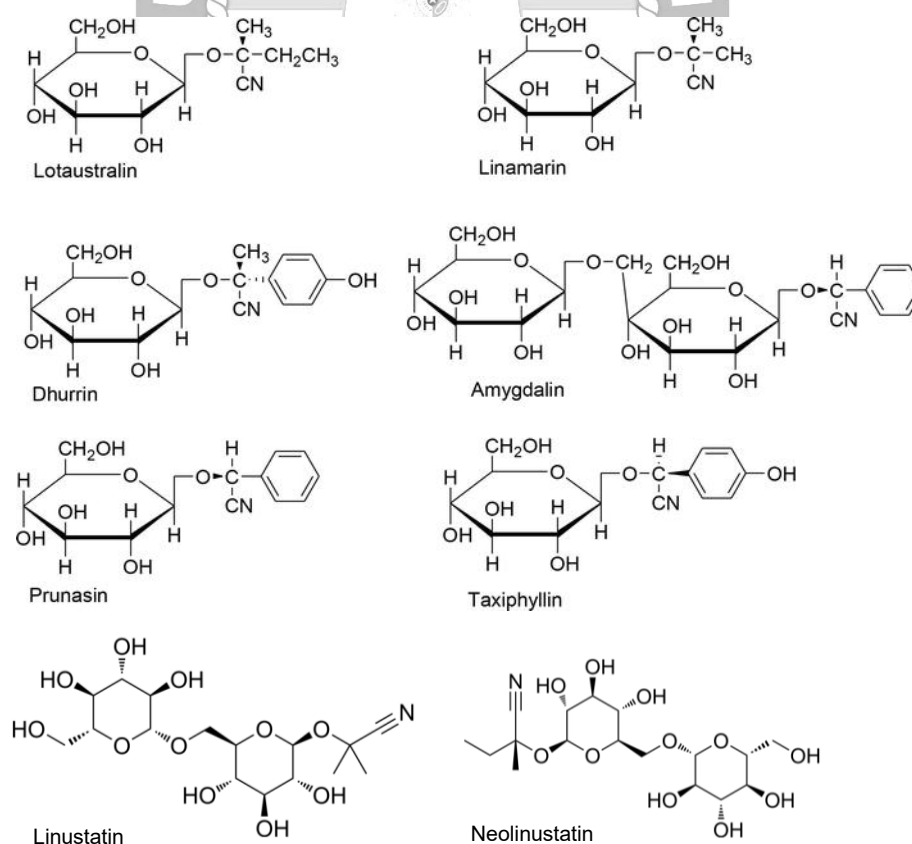
2.1.3 Glikosida Sianogenik

Glikosida sianogenik merupakan senyawa beracun yang dapat melepaskan hidrogen sianida (HCN). Saat dicerna, glikosida sianogenik menghasilkan HCN yang berbahaya bagi manusia dan dapat menyebabkan keracunan. Terdapat sekitar 60 jenis glikosida sianogenik yang tersebar di kingdom tanaman. Beberapa glikosida sianogenik yang mendapat perhatian besar dari *European Food Safety Authority* (EFSA) antara lain linamarin, linustatin, neolinustatin, taksifilin, amygdalin, dhurrin, prunasin, dan lotaustralin (Schrenk et al., 2019).

Sianida adalah salah satu racun yang sangat berbahaya karena dapat dengan cepat menyebar ke jaringan dan organ target. Bentuk sianida yang paling umum meliputi hidrogen sianida serta garam-garam sianida seperti kalium sianida, natrium sianida, dan kalsium sianida (Lachowicz et

al., 2024). Paparan sianida dapat terjadi melalui inhalasi, konsumsi, dan penyerapan melalui kulit. Jumlah glikosida sianogenik yang tinggi dapat menyebabkan komplikasi kesehatan seperti keracunan akut, toksisitas kronis, gangguan neurologis, keterlambatan pertumbuhan, dan gondok (Nyirenda, 2021).

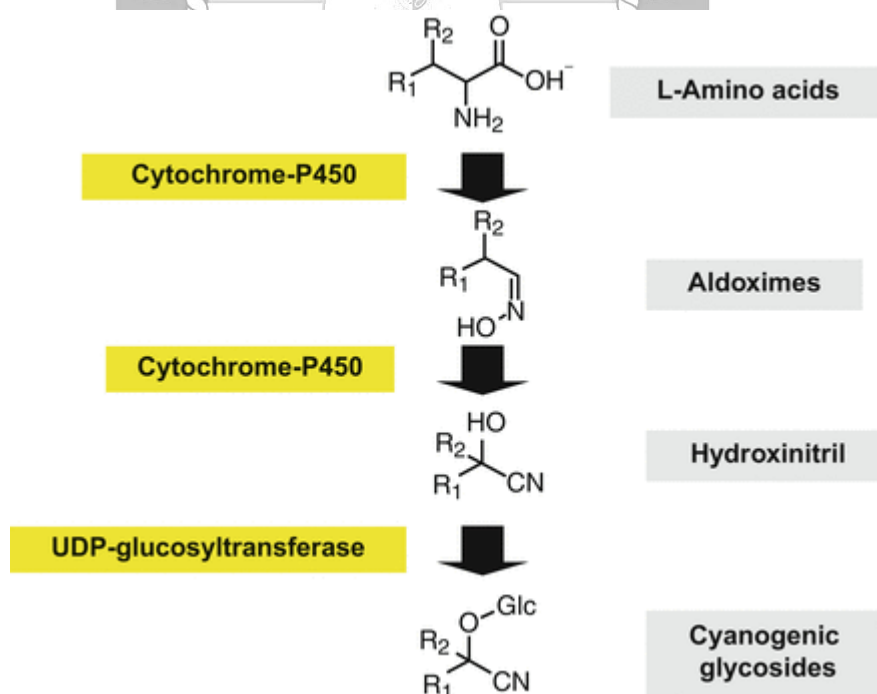
Glikosida sianogenik umumnya ditemukan dalam berbagai famili tumbuhan seperti Fabaceae, Rosaceae, Linaceae, dan Asteraceae. Senyawa ini disimpan dalam vakuola sel tanaman dan ketika terjadi kerusakan pada jaringan dapat bersentuhan dengan enzim endogen seperti α -hidroksi nitril liase dan β -glukosidase yang memicu pelepasan HCN (Bolarinwa et al., 2015).



Gambar 2.4 Struktur Kimia Beberapa Jenis Senyawa Glikosida Sianogenik

Sumber: Nyirenda (2021)

Sintesis glikosida sianogenik terjadi melalui beberapa tahap. Dua tahap pertama adalah pengkatalisan oleh enzim sitokrom P450 yang memediasi dua proses N-hidroksilasi berturut-turut pada asam amino induk. Tahap selanjutnya adalah pensintesisan α -hidroksi nitril (dalam bentuk sianohidrin) melalui proses dehidrasi nitril dan dekarboksilasi aldoksim. Tahap akhir adalah pengkatalisan oleh enzim bernama UDPG-glukosiltransferase yang melakukan proses glukosilasi pada sianohidrin dalam menghasilkan glikosida sianogenik. Enzim β -glukosidase menghidrolisis glikosida sianogenik menjadi sianohidrin. Sianohidrin selanjutnya dipecah oleh enzim hidrosinitril liase dan menghasilkan hidrogen sianida (senyawa toksik) serta aldehida atau keton (Tahir et al., 2024).



Gambar 2.5 Jalur Biosintesis Senyawa Glikosida Sianogenik

Sumber: Vetter (2017)

2.1.4 Analisis Ekspresi Gen Menggunakan *Real Time Quantitative PCR* (RT-qPCR)

Analisis ekspresi gen menggunakan *Real Time Quantitative PCR* (RT-qPCR) adalah salah satu metode yang paling akurat dan sensitif untuk menganalisis ekspresi gen secara kuantitatif. Metode ini memungkinkan pendeteksian dan pengukuran perubahan tingkat ekspresi gen dalam suatu target secara real-time selama siklus PCR berlangsung serta menghasilkan data yang presisi mengenai jumlah transkrip gen target. RT-qPCR menggunakan pewarna fluoresen seperti *TaqMan* untuk mengukur tingkat akumulasi produk PCR pada setiap siklus amplifikasi sehingga memungkinkan kuantifikasi ekspresi gen yang tepat dan akurat (Bustin et al., 2009). Metode ini banyak diaplikasikan dalam studi regulasi gen, analisis mutasi genetik, deteksi patogen, validasi target obat, dan penemuan biomarker (Kubista et al., 2006). Dengan sensitivitas yang tinggi, RT-qPCR dapat mendeteksi perubahan ekspresi gen yang sangat kecil sehingga menjadikannya alat yang penting dalam penelitian mengenai ekspresi gen glikosida sianogenik pada *C. ensiformis*.

2.1.5 Ketahanan Pangan Nasional

Pangan fungsional memegang peran penting dalam mendukung kesehatan manusia karena menyediakan nutrisi esensial yang dibutuhkan tubuh sekaligus berfungsi sebagai suplemen makanan (Annunziata et al., 2015). Pangan fungsional menawarkan berbagai manfaat positif, tidak hanya memenuhi kebutuhan dasar nutrisi tetapi juga berperan dalam melindungi tubuh dari penyakit yang disebabkan oleh kekurangan gizi, serta berperan dalam membantu membersihkan tubuh dari partikel berbahaya yang mungkin berasal dari lingkungan atau makanan yang tidak sehat (Topolska et al., 2021).

Ketahanan pangan sendiri didefinisikan sebagai kondisi di mana ketersediaan makanan yang aman, berkualitas, dan bergizi dapat diakses sepenuhnya oleh semua kalangan masyarakat (USDA, 2023). Di Indonesia,

ketahanan pangan juga menjadi salah satu prioritas pemerintah, sebagaimana diatur dalam UU No 18 Tahun 2012 tentang Ketahanan Pangan. Berdasarkan undang-undang ini, pemerintah memiliki tanggung jawab untuk memastikan kecukupan pangan, termasuk aspek gizi, distribusi, keamanan, keberagaman, serta harga yang terjangkau bagi masyarakat. Meski demikian, terdapat sejumlah tantangan dalam menjaga ketahanan dan keamanan pangan, termasuk ancaman dari bahaya fisik, kimia, dan biologis.

Faktor-faktor seperti bahan baku yang berkualitas rendah, kurangnya higienitas, dan metode pengolahan yang tidak memadai bisa menyebabkan kontaminasi makanan yang pada akhirnya dapat membahayakan kesehatan konsumen melalui masuknya zat berbahaya dalam tubuh. Situasi ini memunculkan risiko-risiko tambahan bagi kesehatan masyarakat, seperti kasus keracunan makanan yang bisa terjadi secara tiba-tiba (HATPI, 2020). Selain kontaminasi yang disebabkan oleh faktor eksternal, bahaya lain juga dapat timbul dari bahan pangan itu sendiri. Beberapa bahan pangan memiliki racun alami yang diproduksi oleh organisme penghasilnya. Meskipun zat-zat ini tidak berbahaya bagi tanaman atau organisme yang memproduksinya, mereka bisa beracun bagi makhluk lain, termasuk manusia, jika dikonsumsi. Racun alami ini memiliki struktur kimia yang bervariasi dan fungsi biologis serta tingkat toksisitas yang berbeda-beda (WHO, 2023). Salah satu contoh racun alami adalah glikosida sianogenik yang terdapat pada *C. ensiformis* sebagai tumbuhan penghasil protein yang potensial untuk mendukung ketahanan pangan nasional.

2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian mengenai analisis kandungan sianida dan ekspresi gen terkait glikosida sianogenik dalam *C. ensiformis* masih tergolong minim. Beberapa studi pada famili Fabaceae telah berhasil mengidentifikasi kandungan dan gen terkait di tanaman lain seperti *Mucuna pruriens* (koro benguk), *C. rosea*, dan *C. gladiata*. Kajian yang secara khusus menyoroti kandungan sianida dan aspek genetika biosintesis glikosida sianogenik dalam *C. ensiformis* masih jarang dilakukan padahal informasi ini sangat penting dalam memastikan keamanan pangan bagi masyarakat.

Penelitian terdahulu berfokus pada kandungan sianida sebelum dan sesudah proses pengolahan, tanpa analisis rinci pada organ spesifik seperti biji dan daun *C. ensiformis*. Padahal penelitian yang mengkaji kandungan sianida dan ekspresi gen pada bagian tanaman yang spesifik dapat memberikan pemahaman yang lebih dalam mengenai regulasi senyawa beracun ini. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru terkait potensi *C. ensiformis* sebagai sumber pangan yang aman dengan cara mengeliminasi atau menekan kandungan sianida dalam tanaman tersebut.

Keunggulan (*novelty*) dari penelitian ini adalah penyediaan data terkini mengenai kandungan sianida pada organ biji dan daun *C. ensiformis*, serta ekspresi gen terkait biosintesis glikosida sianogenik. Hasil dari penelitian terdahulu yang relevan akan disajikan dalam tabel (Tabel 2.1) untuk memberikan gambaran yang lebih jelas mengenai perkembangan riset dalam bidang ini sehingga dapat terlihat pula area penelitian yang masih perlu dikembangkan lebih lanjut demi mendukung ketahanan pangan nasional secara berkelanjutan.

Tabel 2.1 Studi Literatur Hasil Penelitian Terdahulu

Penulis	Judul	Metode	Hasil
(Azzahra, 2024)	Analisis Kandungan Nutrisi dan Antinutrisi Biji Koro Benguk (<i>Mucuna</i> spp.) Sebagai Alternatif Pengganti Protein dalam Rangka Mendukung Ketahanan Pangan Nasional	Kandungan senyawa nutrisi dan antinutrisi pada biji antar spesies dan aksesori <i>Mucuna</i> spp. dianalisis dari pengolahan yang dinyatakan dalam bentuk standar deviasi (SD) pada <i>Microsoft Office</i> serta melalui analisis data secara deskriptif dan uji One Way ANOVA (<i>Analysis Of Variance</i>) menggunakan <i>IB < SPSS Statistics</i> .	Biji <i>Mucuna</i> spp. dari aksesori Indramayu memiliki kandungan protein tertinggi ($679,4 \pm 7,21$ g/ml), sementara kandungan karbohidrat tertinggi terdapat pada aksesori Wonogiri dan Jember ($1049,66$ g/ml), dengan bobot lipid yang relatif sama di semua aksesori (sekitar 10 mg). Selain itu, kadar sianida tertinggi ditemukan pada aksesori Wonogiri ($84,543 \pm 2,15$ g/ml), disusul aksesori Indramayu ($69,578 \pm 2,45$ g/ml) dan Jember ($57,273 \pm 1,60$ g/ml). Kandungan antinutrisi seperti asam fitat, fenolik, dan tanin pada aksesori Indramayu juga lebih tinggi dibandingkan aksesori lainnya.
(Rahayu, 2024)	Identifikasi dan Analisis Ekspresi Gen Terkait Biosintesis Glikosida Sianogenik Melalui Pendekatan Transkriptomik pada <i>Mucuna pruriens</i> Guna Mendukung Keamanan Pangan	Menggunakan pendekatan kuantitatif dengan desain eksperimen <i>in silico</i> untuk menganalisis ekspresi gen glikosida sianogenik pada <i>Mucuna pruriens</i> . Sampel biji dan daun diisolasi RNA-nya, kemudian dilakukan sintesis cDNA, dan ekspresi gen dianalisis menggunakan teknik RT-qPCR.	Ekspresi gen glikosida sianogenik pada biji <i>Mucuna pruriens</i> lima hingga enam kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan daun. Tiga gen yang terlibat dalam biosintesis glikosida sianogenik berhasil diidentifikasi, yaitu CYP79D71 di kromosom 1, CYP8E46/47 di kromosom 2, dan UGT85K31 di kromosom 4. Hasil ini memberikan pemahaman baru tentang peran gen-gen ini dalam biosintesis

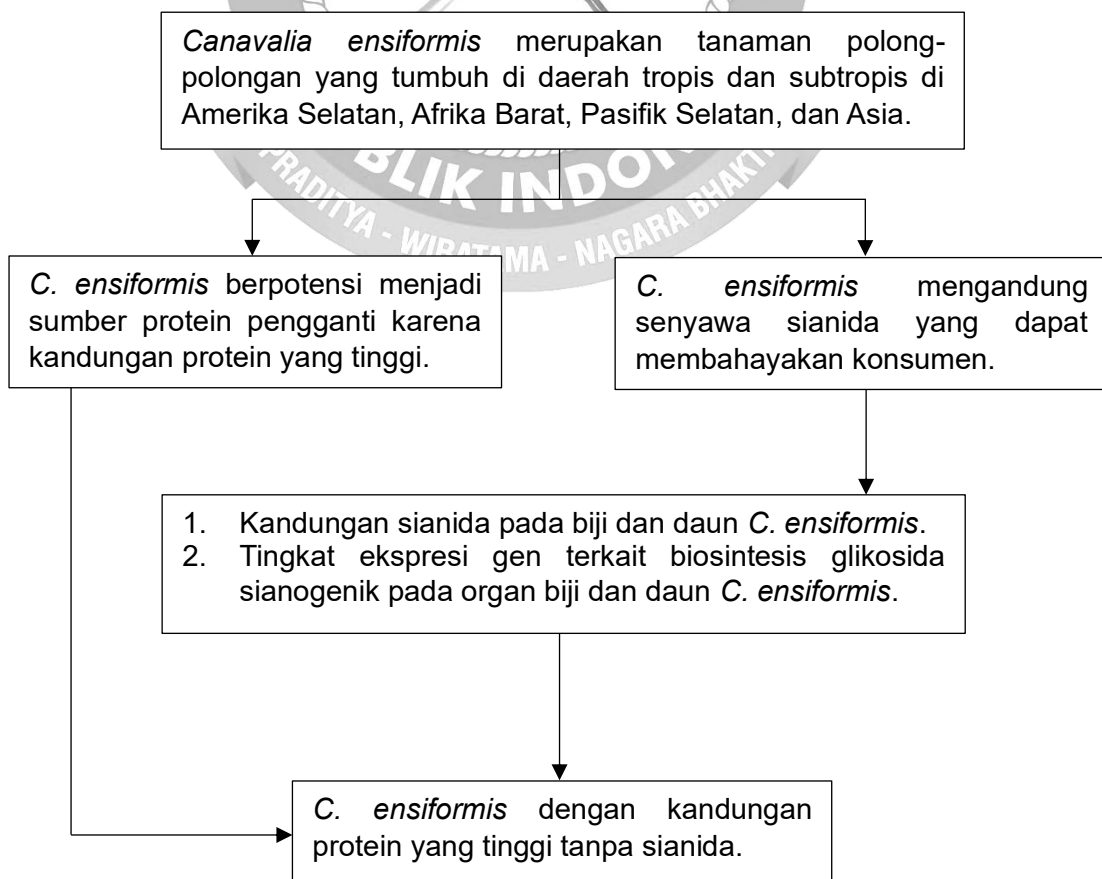
		Data sekuensing RNA diproses menggunakan berbagai alat bioinformatika, termasuk FastQC dan Trimmomatic untuk kontrol kualitas, serta HISAT2 dan Trinity untuk perakitan transkriptom berbasis referensi dan de novo.	senyawa beracun dan pentingnya regulasi mereka untuk keamanan pangan.
(Ding et al., 2023)	<i>Genome-wide functional characterization of Canavalia rosea cysteine-rich trans-membrane module (CrCYSTM) genes to reveal their potential protective roles under extreme abiotic stress</i>	Menggunakan pendekatan bioinformatika untuk mengidentifikasi keluarga gen GASA pada <i>Canavalia rosea</i> . Data sekuensing diolah menggunakan beberapa alat bioinformatika seperti BLAST, untuk menganalisis gen terkait respon terhadap stres lingkungan. Selain itu, dilakukan analisis ekspresi gen untuk mengevaluasi peran gen dalam berbagai kondisi stres seperti kekeringan, salinitas, dan suhu tinggi.	Penelitian ini menemukan bahwa gen GASA pada <i>Canavalia rosea</i> berperan penting dalam respon tanaman terhadap stres lingkungan, terutama meningkatkan ketahanan terhadap kekeringan dan salinitas.
(Pramitha et al., 2021)	<i>Comparison of cyanide content in Arbil beans (Phaseolus lunatus L) of East Nusa Tenggara Using</i>	Menggunakan dua metode untuk mengukur kandungan sianida dalam biji arbil (<i>Phaseolus lunatus L.</i>). Pada metode pikrat, sampel biji digiling dan dicampur	Kandungan total sianida yang diukur dengan metode pikrat adalah 2705,17 ppm, sementara metode hidrolisis asam menghasilkan 2693,29 ppm. Selain itu, metode hidrolisis asam memungkinkan

	<i>Picrate and Acid Hydrolysis Methods</i>	dengan buffer fosfat, kemudian kertas pikrat ditempatkan di dalam vial dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu 30°C. Warna kertas pikrat kemudian diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm. Sedangkan pada metode hidrolisis asam, linamarin dihidrolisis menggunakan larutan asam fosfat dan dipanaskan dalam air mendidih selama 50 menit. Kandungan sianida diukur melalui prosedur kolorimetrik dengan reaksi pyridine-barbituric acid, yang menghasilkan warna ungu yang diukur dengan spektrofotometer	pengukuran bentuk-bentuk sianida spesifik, yaitu linamarin (926,22 ppm), cyanohidrin (556,01 ppm), dan sianida bebas (1211,06 ppm). Meskipun kedua metode memberikan hasil total sianida yang hampir sama, metode hidrolisis asam lebih baik dalam mengukur bentuk-bentuk spesifik sianida di dalam sampel
(Pu et al., 2021)	<i>Genome-Wide Identification, Primary Functional Characterization of the NHX Gene Family in Canavalia rosea, and Their Possible Roles for Adaptation to Tropical Coral Reefs</i>	Menggunakan analisis bioinformatika untuk mengidentifikasi gen NHX di seluruh genom <i>C. rosea</i> . Gen-gen ini kemudian diklasifikasikan menjadi tiga subfamilies berdasarkan lokasi subselulernya: Vac-NHX (vakuola), Endo-NHX	Ekspresi gen NHX pada <i>C. rosea</i> bervariasi sesuai dengan kondisi lingkungan. Gen-gen tersebut berperan dalam adaptasi tanaman terhadap lingkungan ekstrem di terumbu karang tropis, khususnya dalam mengatasi stres salinitas. Uji fungsional pada ragi membuktikan bahwa beberapa gen NHX mampu memulihkan toleransi garam pada

		(endosom), dan PM-NHX (membran plasma). Ekspresi gen diuji menggunakan RNA-seq dan RT-qPCR untuk melihat respons gen terhadap berbagai jenis stres abiotik. Selain itu, uji komplementasi fungsional dilakukan pada ragi untuk mengevaluasi kemampuan gen-gen ini dalam meningkatkan toleransi terhadap garam.	mutan ragi yang sensitif terhadap garam, menunjukkan peran spesifiknya dalam homeostasis ion. Penelitian ini memberikan pemahaman mendalam tentang mekanisme molekuler yang memungkinkan <i>C. rosea</i> beradaptasi di lingkungan keras seperti terumbu karang
(Ramli, et al., 2021)	<i>Effect of Soaking Time and Fermentation on the Nutrient and Antinutrients composition of Canavalia ensiformis</i> (Kacang Koro)	Mengeksplorasi dampak lama perendaman dan fermentasi pada komposisi nutrisi serta antinutrisi <i>Canavalia ensiformis</i> . Sampel biji koro direndam dalam larutan natrium bikarbonat (NaHCO_3) 1% selama 12, 24, dan 36 jam pada suhu dingin (10°C) dan kemudian difermentasi pada 40°C . Setelah perlakuan perendaman dan fermentasi, sampel dianalisis untuk mengetahui kandungan proksimat serta antinutrisi, seperti hidrogen sianida (HCN), asam fitat, tanin, saponin, dan oksalat.	Waktu perendaman dan fermentasi tidak mempengaruhi nilai proksimat secara signifikan. Namun, proses perendaman 36 jam diikuti fermentasi mengurangi kadar HCN hingga $7,43 \pm 0,76$ mg/kg, dengan penurunan asam fitat menjadi 0,64 mg/g, saponin menjadi 1,27 mg/g, tanin menjadi 0,01 mg/g, dan oksalat menjadi 39,96 mg/g. Hasil ini menunjukkan bahwa metode perendaman dengan NaHCO_3 dan fermentasi dapat menurunkan kadar antinutrisi dalam <i>Canavalia ensiformis</i> , sehingga membuatnya lebih aman untuk dikonsumsi sebagai sumber protein alternatif yang ramah lingkungan.

2.3 Kerangka Berpikir

Canavalia ensiformis merupakan tanaman polong-polongan yang tumbuh di daerah tropis dan subtropis di Amerika Selatan, Afrika Barat, Pasifik Selatan, dan Asia. Tanaman ini mengandung protein, lemak, karbohidrat, dan senyawa bermanfaat lainnya sehingga berpotensi sebagai alternatif pengganti protein dalam mendukung ketahanan pangan nasional. Namun, *C. ensiformis* juga mengandung senyawa hidrogen sianida (HCN) yang beracun. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen-gen yang terlibat dalam biosintesis glikosida sianogenik pada *C. ensiformis* dan menganalisis tingkat ekspresi diferensial gen glikosida sianogenik pada organ biji dan daun *C. ensiformis*. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi awal yang berguna untuk penelitian lebih lanjut terkait pengembangan kultivar *C. ensiformis* (Gambar 2.7).



Gambar 2.6 Kerangka Berpikir Penelitian Skripsi