

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Morfologi dan Sebaran Geografis *Canavalia ensiformis*

Canavalia ensiformis, yang dikenal juga sebagai *jack bean*, termasuk ke dalam Filum Spermatophyta, Subfilum Angiospermae, Kelas Dicotyledonae, Ordo Fabales, Famili Fabaceae, Subfamili Papilionoideae, dan Genus *Canavalia* (Hebling et al., 2000;). Tanaman ini termasuk jenis tanaman merambat atau menjalar dengan kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap berbagai kondisi lingkungan. Morfologi tanaman ini menunjukkan beberapa karakteristik penting yang membedakannya dari tanaman legum lainnya.

Batang *C. ensiformis* tumbuh tegak dan bercabang, dengan panjang batang dapat mencapai antara 1 hingga 3 meter, tergantung pada kondisi lingkungan dan nutrisi yang tersedia (Chel-Guerrero et al., 2001; Ferreira et al., 2021). Batangnya berwarna hijau dan memiliki tekstur yang halus, memberikan fleksibilitas untuk tanaman dalam menjalar di permukaan tanah atau dukungan vertikal seperti tiang atau pohon. Pertumbuhan tanaman ini cukup cepat di lingkungan yang mendukung, seperti tanah yang cukup subur dan iklim yang sesuai, seperti daerah tropis dan subtropis.

Daun tanaman ini tersusun dalam bentuk majemuk, terdiri dari 3 hingga 5 anak daun (*leaflet*) yang berbentuk oval atau elips. Ukuran daun tersebut berkisar antara 5 hingga 10 cm panjangnya dan 2 hingga 5 cm lebarnya, dengan warna hijau tua yang menunjukkan kandungan klorofil yang cukup tinggi. Permukaan daun halus dan bertekstur lembut, yang mendukung proses fotosintesis semaksimal mungkin (Kantardjieff et al., 2002; Perçin et al., 2012).

Bunga *C. ensiformis* muncul dalam bentuk infloresensi racemose. Warna bunganya bervariasi, mulai dari ungu, merah muda, hingga putih, dengan ukuran panjang sekitar 2 hingga 3 cm (Valke, 2007). Bunga ini

biasanya tumbuh berkelompok di ujung batang atau cabang, dan menghasilkan biji setelah proses penyerbukan terjadi (Arim et al., 2006). Keindahan bunganya menjadikan *C. ensiformis* juga dimanfaatkan sebagai tanaman hias di beberapa daerah.

Biji *C. ensiformis* memiliki bentuk oval dengan ukuran sekitar 1 hingga 2 cm, berwarna coklat muda hingga coklat tua, dan dilindungi oleh kulit biji yang keras (Bottle, 2024). Biji ini merupakan bagian yang sangat penting dari tanaman karena mengandung protein yang sangat tinggi, mencapai 29% dari total berat kering biji (Adeola et al., 2018; Asta Putri et al., 2022). Kandungan gizi dalam biji *C. ensiformis* menjadikannya sumber protein nabati yang berharga, yang sering dimanfaatkan sebagai pakan ternak maupun bahan pangan untuk manusia. Biji *C. ensiformis* mengandung sekitar 300 g/kg protein, 600 g/kg karbohidrat, 0,2% hingga 3% lemak, dan berbagai vitamin dan mineral, seperti vitamin B kompleks, kalsium, zat besi, dan magnesium. Selain komponen gizi utama, *C. ensiformis* juga mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid dan polifenol, yang memiliki sifat antioksidan (Adeola et al., 2018)



Gambar 2.1 Morfologi *Canavalia ensiformis*. A. Daun; B. Bunga; C. Biji.

Sumber: Valke (2007); Bottle (2024)

Canavalia ensiformis memiliki sebaran geografis yang luas, terutama di wilayah tropis dan subtropis. Tanaman ini banyak ditemukan di berbagai jenis habitat, seperti lahan pertanian, pekarangan rumah, serta area terbuka seperti padang rumput dan semak belukar (Anitha et al., 2019; Nam et al., 2015). *Canavalia ensiformis* juga dikenal sebagai tanaman yang sangat

adaptif terhadap berbagai kondisi tanah, termasuk tanah yang kurang subur dan kurang nutrisi. Hal ini menjadikan tanaman ini sangat toleran terhadap kekeringan dan mampu tumbuh di lingkungan yang terpengaruh oleh perubahan iklim, menjadikannya salah satu tanaman yang potensial untuk mendukung ketahanan pangan di masa depan (Anitha & Yashoda, 2019).

2.1.2 Analisis Transkriptomik Berbasis Sekuensing RNA

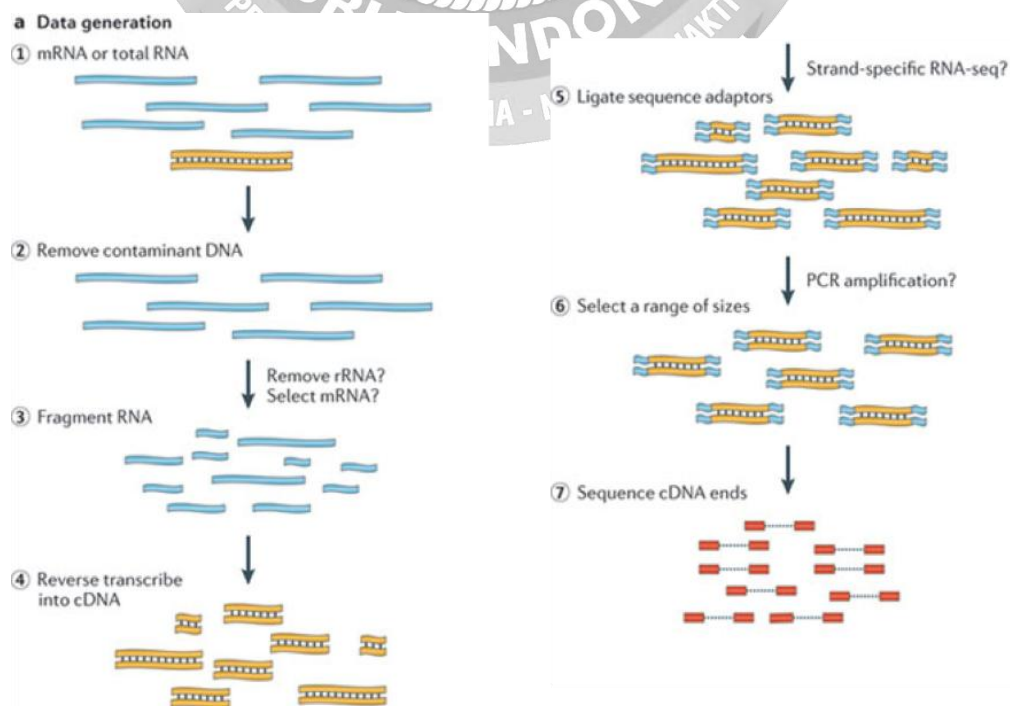
Transkriptomik adalah cabang ilmu biologi molekuler yang memfokuskan pada studi transkriptom, yaitu keseluruhan RNA yang dihasilkan oleh genom dalam suatu sel atau organisme pada waktu tertentu. Pendekatan ini dapat dilakukan untuk memetakan ekspresi gen secara menyeluruh, seperti identifikasi gen-gen yang aktif, jumlah RNA yang dihasilkan, dan perubahan ekspresi gen sebagai respons terhadap faktor lingkungan atau perlakuan tertentu. Salah satu keunggulan utama dari analisis transkriptomik berbasis sekuensing adalah kemampuannya untuk mendeteksi transkrip yang tidak terduga, seperti isoform alternatif dan transkrip yang berasal dari gen yang tidak terannotasi. Hal tersebut sangat berguna untuk studi organisme non-model yang memiliki informasi genomik terbatas (Cahais et al., 2012; Hu et al., 2016).

Proses sekuensing RNA dimulai dengan isolasi RNA dari sel atau jaringan yang diinginkan. Tahapan ini sering kali memanfaatkan kit khusus untuk memisahkan RNA dari komponen lain, seperti protein dan DNA. Salah satu tantangan dalam transkriptomik adalah isolasi RNA yang berkualitas tinggi, terutama dari jaringan tanaman yang sering kali memiliki kandungan polisakarida dan senyawa kompleks lainnya yang dapat mengganggu proses ekstraksi (Zulaeha et al., 2019). Oleh karena itu, pengembangan metode ekstraksi yang efisien dan efektif sangat penting untuk memastikan bahwa RNA yang diisolasi dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut.

Proses RNA-seq dimulai dengan isolasi RNA total (1), kemudian DNA yang mungkin terkontaminasi dihilangkan dengan DNase (2). RNA

yang bersih lalu dipotong menjadi fragmen-fragmen pendek (3), kemudian ditranskripsi balik menjadi cDNA (4). Setelah itu, adaptor sekuensing dipasang (5), dan fragmen diseleksi berdasarkan ukuran (6). Terakhir, cDNA disekuensing menggunakan teknologi NGS untuk menghasilkan sekuens pendek (7). Jika kedua ujung fragmen dibaca, maka diperoleh paired-end reads (Martin & Wang, 2011).

Sekuensing dapat dilakukan dengan metode konvensional seperti sekuensing Sanger atau dengan sekuensing generasi baru (*Next Generation Sequencing/NGS*). Teknologi NGS memungkinkan analisis dari jutaan fragmen cDNA, sehingga data ekspresi gen lebih lengkap atau detail (Zulaeha et al., 2019). Data sekuensing yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak bioinformatika untuk mengidentifikasi gen yang diekspresikan dan untuk menghitung tingkat ekspresi gen. Analisis ini umumnya melibatkan pemetaan urutan RNA ke genom referensi dan kuantifikasi jumlah transkrip yang terdeteksi dalam sampel (Margareta, 2023).



Gambar 2.2 Ilustrasi Sekuensing Transkriptomik. Sumber: Martin & Wang (2011)

2.1.3 Perakitan Transkriptom dan Anotasi Genom

Perakitan transkriptom adalah proses yang melibatkan pengumpulan dan penyusunan informasi tentang RNA yang dihasilkan oleh suatu organisme. Perakitan transkriptom bertujuan untuk merekonstruksi set lengkap transkrip dalam suatu sel atau jaringan dalam waktu tertentu melalui data RNA-seq, mencakup semua jenis RNA yang diekspresikan dalam sel, yakni mRNA, rRNA, tRNA, dan RNA non-koding. Informasi ini sangat penting dalam memahami profil ekspresi gen, seperti variasi *splicing*, gen baru, dan isoform (Behera et al., 2021). Akan tetapi, perakitan transkriptom yang dilakukan pada penelitian ini berfokus pada transkrip yang menyandi mRNA.

Perakitan transkriptom dapat dilakukan dengan dua pendekatan utama, yaitu berbasis referensi (*genome-guided*) dan tanpa referensi (*de novo*). Pada pendekatan berbasis referensi, data RNA-seq dipetakan ke genom referensi untuk membangun transkrip. Metode ini membutuhkan kualitas genom referensi yang tinggi agar hasil perakitan akurat. Perangkat lunak seperti Cufflinks dan StringTie umumnya digunakan dalam pendekatan ini (Pertea et al., 2015; Trapnell et al., 2010). Sementara itu, pendekatan *de novo* digunakan ketika tidak tersedia genom referensi yang kredibel. Metode ini membangun langsung dari data RNA-seq, tanpa memerlukan genom referensi.

Tahap penting berikutnya dalam penelitian transkriptomik adalah anotasi genom. Anotasi genom adalah proses penting dalam studi genomik yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan menandai elemen-elemen genetik yang penting dalam urutan DNA. Proses ini melibatkan pengenalan berbagai komponen genom, diantaranya adalah gen yang mengkode protein, elemen pengatur, dan elemen non-koding lainnya. Metode anotasi genom menggunakan berbagai basis data untuk menemukan gen dan menentukan fungsinya. Salah satu perangkat lunak yang umum digunakan dalam anotasi genom adalah BLAST+, yaitu dengan mencocokkan homologi sekuens DNA dengan basis data genom yang sudah dianotasi.

Dalam penelitian pada organisme yang belum memiliki data genom lengkap, biasanya digunakan pendekatan *de novo*. Teknik ini memanfaatkan RNA-seq untuk menyusun transkriptom dan mengidentifikasi gen-gen penting melalui metode analisis fungsional seperti anotasi *Gene Ontology* (GO) dan identifikasi jalur biokimia (Raghavan et al., 2022).

Pendekatan lain yang dapat digunakan adalah menggunakan *pipeline* anotasi seperti Trinotate dan Dammit, yang dapat mengintegrasikan berbagai alat dan basis data, sehingga memberikan anotasi genom yang lebih akurat. Perangkat lunak seperti HMMER digunakan untuk identifikasi fitur sekuens dan basis data seperti KEGG dan Reactome menyediakan informasi tentang jalur-jalur biokimia yang relevan (Raghavan et al., 2022).

2.1.4 Real-Time PCR (RT-qPCR) dan Gen untuk Kontrol Internal

Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) adalah teknik yang sangat penting dalam penelitian biologi molekuler, terutama untuk mengukur ekspresi gen secara kuantitatif. Metode ini menggabungkan proses transkripsi balik RNA menjadi DNA (cDNA) dengan amplifikasi DNA secara *real-time*, sehingga dapat memantau kemajuan reaksi PCR secara langsung. Salah satu keunggulan utama RT-qPCR adalah kemampuannya dalam memberikan data yang akurat, sensitif, dan cepat mengenai tingkat ekspresi gen dalam berbagai kondisi biologis dan lingkungan. Teknik ini telah menjadi metode standar dalam penelitian ekspresi gen di berbagai bidang, termasuk bioteknologi, kesehatan, dan pertanian (Chandna et al., 2012a; Pabuayon et al., 2016).

Salah satu tantangan utama dalam analisis RT-qPCR adalah variasi dalam hasil yang diakibatkan oleh beberapa faktor seperti efisiensi *reverse transcription*, kualitas RNA, dan kondisi PCR. Oleh karena itu, penting untuk menggunakan metode normalisasi yang tepat agar hasil yang diperoleh memiliki akurasi yang tinggi. Normalisasi data RT-qPCR dilakukan dengan

menggunakan satu atau lebih gen referensi yang stabil atau lebih dikenal sebagai gen kontrol internal (Tang et al., 2017). Gen-gen ini diharapkan memiliki ekspresi yang konsisten di berbagai jaringan atau kondisi biologis (Bustin et al., 2009). Namun, tidak ada gen kontrol internal yang benar-benar stabil untuk semua jenis jaringan dan kondisi, sehingga diperlukan lebih dari satu gen referensi untuk memastikan akurasi hasil analisis (Tang et al., 2017; Udvardi et al., 2008). Pemilihan gen referensi yang sesuai sangat penting untuk analisis ekspresi gen yang tepat dan dapat memberikan wawasan terkait mekanisme molekuler suatu spesies (Gutierrez et al., 2008).

Gen-gen seperti Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Aktin, dan Ubiquitin sering kali digunakan sebagai gen kontrol (Kozera & Rapacz, 2013). GAPDH adalah gen yang umum digunakan sebagai gen kontrol karena memiliki fungsi dasar dalam metabolisme sel, tetapi stabilitas ekspresinya juga dapat bervariasi (Gutierrez et al., 2008; Li et al., 2021; Zheng et al., 2018). Aktin adalah gen yang selalu aktif dan berperan penting dalam menjaga stabilitas proses seluler basal, sehingga aktin sering digunakan sebagai gen kontrol internal karena gen ini memiliki ekspresi yang stabil pada semua tahapan perkembangan di berbagai jaringan (Anggisti et al., 2018; Chandna et al., 2012b). Ubiquitin merupakan gen yang berperan dalam proses degradasi protein, regulasi siklus sel, dan juga sering digunakan sebagai gen kontrol internal dalam RT-qPCR. Namun, pemilihan gen ini harus disesuaikan dengan kondisi eksperimen karena stabilitasnya dapat bervariasi (Zheng et al., 2018).

2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Canavalia ensiformis* memiliki potensi besar dalam ketahanan pangan dan pertanian berkelanjutan karena nilai gizi yang tinggi dari bijinya dan kemampuannya melakukan fiksasi nitrogen (Adjo et al., 2022; Kesonga et al., 2018; Uge et al., 2023). Disamping itu, informasi genomik terkait tanaman ini masih

sangat terbatas. Penelitian yang ada lebih banyak berfokus pada aspek agronomis dan nilai nutrisi, tanpa mengkaji secara mendalam pada level molekuler yang mendasari keunggulan tersebut.

Kekurangan data genomik dan analisis gen pada *Canavalia ensiformis* menghambat potensinya dalam upaya pengembangan varietas unggul, sehingga penelitian ini dilakukan dengan pendekatan transkriptomik berbasis RNA-seq untuk mengisi kekosongan informasi tersebut. Dengan melakukan anotasi genom dan identifikasi gen kontrol internal, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi genomik lengkap pada *C. ensiformis*. Selain itu, pencarian literatur menunjukkan bahwa belum ada penelitian yang secara spesifik memberikan informasi genomik lengkap pada *C. ensiformis*, meskipun ada studi terhadap legum lain seperti koro benguk (*Mucuna pruriens*) dan koro lainnya (Tabel 2.1).

Penelitian pada mayoritas legum lainnya telah memiliki informasi genomik lengkap dan transkriptomik. Salah satunya adalah *Mucuna pruriens* yang dilakukan anotasi genom dan hasilnya terdapat 21 gen pengkode oksidase polifenol yang penting dalam biosintesis L-DOPA. Pada spesies lain seperti *Gossypium hirsutum* dan *Oxytropis ochrocephala* melalui studi RNA-seq menghasilkan pemilihan gen referensi untuk qRT-PCR yang stabil, diantaranya adalah *GhPP2A1*, *GhUBQ14*, *HIS*, *ACT7*, dan *ACT101* (Artico et al., 2010; Zhuang et al., 2015). Disamping itu, penelitian terbaru oleh Yao *et al.* (2024) menunjukkan pentingnya studi bioinformatika dalam memahami hubungan antara gen dengan sifat argonomi melalui profiling genomik gen aktin pada *Brassica napus* (Tabel 2.1)

Tabel 2.1 Studi Literatur Hasil Penelitian Terdahulu

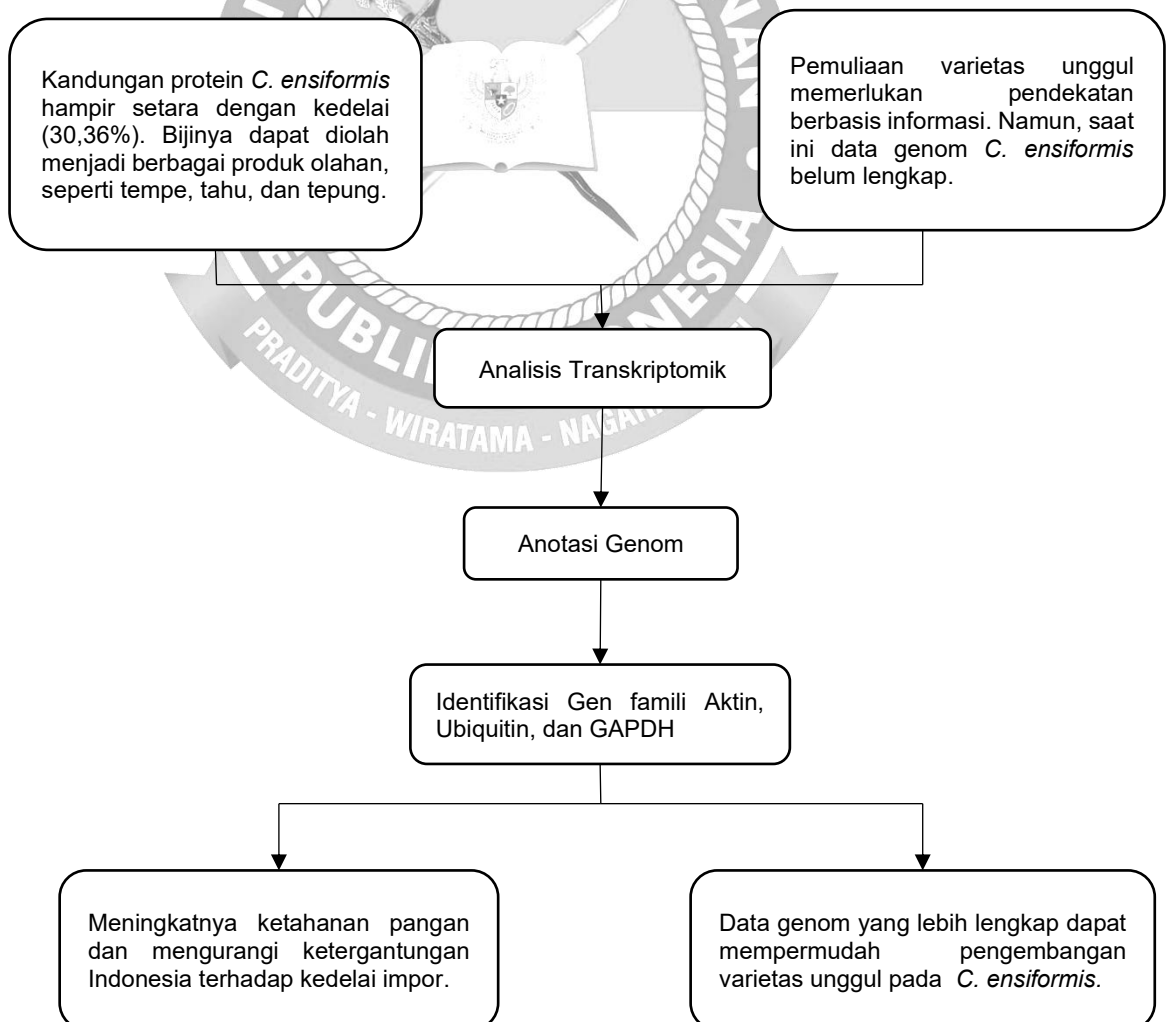
Penulis	Judul	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
(Rahayu, 2024)	Identifikasi dan Analisis Ekspresi Gen Terkait Biosintesis Glikosida Siannogenik Melalui Pendekatan Transkriptomik Pada <i>Mucuna pruriens</i> Guna Mendukung Keamanan Pangan	Menganotasi genom melalui perakitan <i>de novo</i> (Trinity dan rnaSPAdes) dan berbasis referensi (Hisat2) dan mengidentifikasi gen-gen terkait biosintesis glikosida siannogenik pada daun dan biji <i>M. Pruriens</i> , serta analisis ekspresi gen dengan RT-qPCR.	Ditemukan kandidat gen pengkode protein glikosida siannogenik pada <i>M. Pruriens</i> yang ortolog dengan gen CYP79D71, CYP8E46/47, dan UGT85K31 pada <i>Phaseolus lunatus</i> . Kemudian, dari analisis ekspresi gen, biji memiliki tingkat ekspresi 5 hingga 6 kali lipat lebih tinggi dibandingkan daun.
(Yao et al., 2024)	<i>Genome-Wide Profiling of the ACTIN Gene Family and Its Implications for Agronomic Traits in Brassica napus: A Bioinformatics Study</i>	Mengidentifikasi gen aktin dalam <i>B. Napus</i> yang diklasifikasikan melalui analisis filogenetik. Kemudian, dilakukan analisis fungsional dan analisis ekspresi gen.	Ditemukan ada 69 gen aktin di <i>B. Napus</i> yang dikelompokkan ke dalam enam subfamili. Ekspresi gen BnActin mengalami peningkatan saat terkena stres abiotik dan menunjukkan bahwa beberapa gen BnActin berpotensi mempengaruhi sifat agronomi utama pada <i>B. Napus</i> , salah satunya adalah BnActin37.

Penulis	Judul	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
(Hao et al., 2022)	<i>Chromosomal-level genome of velvet bean (Mucuna pruriens) provides resources for L-DOPA synthetic research and development</i>	Anotasi genom dengan model gen diprediksi dengan <i>de novo</i> , homologi dan data RNA-seq dengan platform BGISEQ500.	Penelitian ini melaporkan genom <i>M. pruriens</i> pertama, yaitu perakitan tingkat kromosom dengan analisis evolusi genom dan deskripsi gen pengkode enzim esensial untuk biosintesis L-DOPA. Hasil identifikasi didapatkan 21 gen pengkode oksidase polifenol yang mengkatalisis L-tirosin menjadi L-DOPA dalam <i>M. pruriens</i> .
(Lu et al., 2021)	<i>Selection and Evaluation of Potential Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Agaricus blazei Based on Transcriptome Sequencing Data</i>	Dari analisis qRT-PCR berbasis data transkriptomik, sebanyak 27 gen referensi potensial dipilih dari dataset transkriptomik <i>A. blazei</i> dan stabilitas ekspresi gen dievaluasi menggunakan software geNorm, NormFinder, BestKeeper, dan RefFinder.	Gen α -TUB dan Cox5a adalah gen yang paling stabil untuk berbagai tahap perkembangan tubuh buah <i>A. blazei</i> , sedangkan GAPDH adalah gen yang paling tidak stabil diantara semua set sampel. Metode ini menyediakan panduan untuk pemilihan gen referensi yang sesuai.

Penulis	Judul	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
(Zhuang et al., 2015)	<i>Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in Oxytropis ochrocephala Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments</i>	RNA-Seq digunakan untuk memilih 12 gen referensi dan menilai stabilitasnya menggunakan geNorm, NormFinder, dan BestKeeper pada kondisi cekaman abiotik. qRT-PCR digunakan untuk memvalidasi pola ekspresi gen target.	Gen HIS, ACT7, dan ACT101 ditemukan sebagai gen referensi paling stabil. Gen-gen ini cocok untuk normalisasi ekspresi gen pada <i>O. ochrocephala</i> di bawah kondisi cekaman abiotik.
(Sudheesh et al., 2015)	<i>De novo assembly and characterisation of the field pea transcriptome using RNA-Seq</i>	RNA-Seq digunakan untuk menghasilkan dataset transkriptom dari dua kultivar kacang. RNA diekstraksi dari berbagai jaringan, disusun secara <i>de novo</i> , dianotasi menggunakan BLASTX, dan analisis jalur KEGG.	Dihasilkan 129,282 contig dari Kaspas dan 149,272 contig dari Parafield. Jalur metabolisme dan biosintesis metabolit sekunder dianotasi untuk mengungkapkan ekspresi jaringan spesifik pada kacang.

2.3 Kerangka Berpikir

Indonesia mengalami peningkatan terhadap kedelai dari tahun ke tahun. Ketergantungan terhadap impor kedelai menyebabkan permasalahan terkait harga kedelai yang fluktuatif dan pasokan yang tidak selalu stabil. Anotasi genom menjadi salah satu upaya untuk meningkatkan pengembangan *C. ensiformis*. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan anotasi genom pada *Canavalia ensiformis* melalui analisis transkriptomik berbasis RNA-Seq. Hasil anotasi ini dapat digunakan untuk identifikasi gen kontrol internal dalam studi ekspresi gen pada *Canavalia ensiformis* (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Diagram Alur Penelitian