

**POLA EKSPRESI GEN *pal1*, *chs7*, DAN *chi1b1* PADA TAHAP  
PERTUMBUHAN VARIETAS LOKAL DAUN KEDELAI HITAM (*Glycine  
max* (L) Merr.)**

Ahsanal Kasasiah, Dadang Sumardi, Adi Pancoro

\*email korespondensi : ahsanal.kasasiah@fkes.unsika.ac.id

**Abstrak**

Isoflavon merupakan senyawa fitokimia yang berperan dalam mekanisme pertahanan tanaman dan memiliki manfaat untuk kesehatan. Beberapa gen telah diketahui berperan dalam biosintesis isoflavon, diantaranya, yaitu: *gen pal1*, *chs7* dan *chi1b1*. Namun demikian, pola ekspresi gen tersebut belum diketahui dengan baik pada varietas kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr.). Studi pola ekspresi gen ini diharapkan dapat dijadikan sebagai studi pendahuluan metabolisme isoflavon. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pola ekspresi gen yang berperan penting pada produksi isoflavon di varietas UP 106, UP 115, UP 122, dan UP 157 pada kedelai hitam. Penelitian ini terdiri dari 5 tahap; pengambilan sampel daun pada tahap V3, R2, R5, R6, dan R7; isolasi RNA total; sintesis cDNA; konfirmasi dengan sekuensing; dan PCR kuantitatif. Pada penelitian ini, gen yang diisolasi adalah *pal1*, *chs7*, dan *chi1b1*. Hasil penelitian pada keempat varietas menunjukkan pada daun kedelai hitam, ekspresi gen *pal1* bervariasi selama tahap perkembangan, sementara ekspresi gen *chs7* menunjukkan kecenderungan peningkatan ekspresi gen selama tahap pertumbuhan dan gen *chi1b1* menunjukkan peningkatan pada tahap awal reproduktif namun menurun di tahap akhir. Pola ekspresi masing-masing gen ini kemungkinan disebabkan oleh faktor transkripsi yang khas berkaitan dengan masing-masing tahap pertumbuhan kedelai hitam.

**Kata kunci:** isoflavon, kedelai hitam , *pal1*, *chs7*, *chi1b1*

## Abstract

Isoflavon is a phytochemical compound involved in the plant defence mechanism and beneficial for health. Several genes have been identified engaged in isoflavon biosynthesis, *e.g. pal1*, *chs7*, and *chi1b1*. Nevertheless, the pattern of gene expression of those genes have currently not been recognized well in black bean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. Study in this gene expression pattern is expected to become an overture in the researches of isoflavon metabolism. This research aimed at determining pattern of genes expression involved in the isoflavon production of black bean varieties UP 106, UP 115, UP122, and UP 157. Study was divided into five steps, *i.e.* 1) sample collection of leaves in V3, R2, R5, R6, and R7 phases from mentioned black bean varieties, 2) isolation of total RNA, 3) cDNA synthesis, 4) confirmation by sequencing, and 5) quantitative PCR. In this study, *pal1*, *chs7*, and *chi1b1* genes were isolated. Result from those four varieties of black bean showed that in the black bean leaf, during the growth phase, *pal1* gene expression was varying, *chs7* gene expression was demonstrating a tendency of increase, and *chi1b1* gene expression was showing an increase in the initial reproductive phase but was declining in the final phase. The pattern of each genes expression is probably caused by a typical transcription factor associated with each stage of black soybean growth.

**Keywords:** isoflavones, black soybeans, *pal1*, *chs7*, *chi1b1*

## 1. Pendahuluan

Isoflavon adalah metabolit sekunder yang diproduksi pada tanaman leguminosa. Senyawa ini memiliki manfaat yang baik bagi kesehatan jika dikonsumsi<sup>1</sup>. Konsumsi isoflavonoid dapat mengontrol gula darah, meningkatkan penurunan berat badan dan lemak, menurunkan trigliserida, kolesterol LDL (*low density lipoprotein*) dan kolesterol total<sup>2</sup>. Konsumsi isoflavonoid juga diketahui dapat mempengaruhi produksi hormon yang berkaitan dengan reproduksi wanita<sup>3</sup>.

Pada tanaman kedelai, isoflavon berperan dalam perlindungan terhadap cekaman abiotik<sup>4</sup> maupun biotik<sup>5</sup>. Isoflavon disintesis melalui jalur fenilpropanoid yang melibatkan banyak reaksi enzimatik dengan fenilalanin sebagai prekursor<sup>6</sup>. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk melihat korelasi gen yang terlibat di jalur fenilpropanoid dengan kandungan isoflavon.

Kedelai hitam merupakan varietas kedelai yang berpotensi dikembangkan di Indonesia. Akan tetapi, penggunaannya di Indonesia lebih terbatas dibandingkan kedelai kuning<sup>7</sup>. Kedelai hitam di Indonesia masih digunakan sebagai bahan dasar kecap, berbeda dengan kedelai kuning yang telah banyak digunakan di Indonesia. Secara gizi, kandungan kedelai hitam lebih banyak dibandingkan dengan kedelai kuning. Salah satunya, kandungan isoflavon pada kedelai hitam lebih tinggi dibandingkan kedelai kuning<sup>8</sup>.

Penelitian untuk merekayasa kandungan isoflavon di tanaman legum telah banyak dilakukan<sup>9</sup>. Sementara penelitian mengenai rekayasa genetik pada kandungan isoflavon di tanaman kedelai hitam masih jarang dilakukan. Rekayasa genetik di tanaman kedelai hitam membutuhkan informasi mengenai gen-gen yang terlibat pada jalur fenilpropanoid.

Penelitian sebelumnya telah menganalisis profil ekspresi dari sebagian gen kunci biosintesis isoflavon, yaitu gen *chr*, *chi1a*, dan *ifs2* pada 4 varietas lokal kedelai hitam (UP 106, UP 115, UP 122 dan UP 157) dari tahap vegetatif ke reproduktif<sup>10</sup>. Sintesis isoflavon merupakan proses yang kompleks maka dibutuhkan informasi tambahan mengenai gen kunci sintesis isoflavon lainnya. Telah diketahui sebelumnya, gen *pal1*, *chs7* dan *chi1b1* juga termasuk ke dalam gen yang memiliki peran penting dalam sintesis isoflavon<sup>11</sup>. Sehingga pada penelitian ini profil ekspresi gen tersebut dianalisis untuk melengkapi informasi.

## **2. Bahan Dan Metode**

Pada penelitian ini, analisis ekspresi gen *pal1*, *chs7*, *chi1b1* dilakukan pada setiap fase pertumbuhan di sampel tanaman kedelai hitam varietas UP 106, UP 115, UP 134 dan UP 157. Keempat varietas ini dipilih berdasarkan penelitian sebelumnya<sup>10</sup>. Analisis ekspresi gen diamati pada level mRNA pada organ daun. Level ekspresi gen diamati pada tahap vegetatif (V3) dan tahap reproduktif (R2, R5, R6, dan R7).

Keempat varietas ditanam di daerah Cianjur (250 m dpl). Penanaman dilakukan pada tanggal 26 Februari 2014. Sampel diambil pada tanggal 20 Maret-30 Mei 2014. Sampel daun diambil dari buku teratas sebanyak 3-5 lembar. Sampel biji diambil sebanyak 3 polong. Sampel diambil secara acak, dibungkus dengan kertas alumunium foil dan dimasukkan ke nitrogen cair. Penyimpanan sampel lebih lama dilakukan dengan memasukan sampel ke lemari pendingin -80 °C.

RNA total sampel daun diisolasi menggunakan Total RNA Mini Kit for Plant (Geneaid Biotech Ltd.) sesuai dengan protokol. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 V selama 45 menit menggunakan agarose 1,5 % untuk menguji kualitas RNA. Keberhasilan isolasi RNA total dibuktikan dengan keberadaan 2 pita pada agarose. Spektrofotometri dilakukan untuk menentukan kuantitas RNA. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 260 nm, 280 nm dan 320 nm. Rasio 260/280 diukur untuk menentukan kemurnian RNA. Penyimpanan sampel RNA dilakukan di suhu -80 °C.

## **2.1 Sintesis cDNA**

PCR kuantitatif menggunakan cDNA sebagai *template* yang disintesis dari isolat RNA. Sebelum dilakukan sintesis cDNA, sampel RNA diberi perlakuan enzim DNaseI menggunakan protokol kit DNaseI (ThermoScientific™) untuk menghilangkan kontaminasi DNA genom. Kontaminasi DNA genom pada hasil isolasi RNA dapat terlihat pada gel

agarosa, ditandai dengan kemunculan pita pada ukuran diatas 10.000 pb. Sampel RNA diberi perlakuan menggunakan DNase I.

Sintesis cDNA dilakukan dengan protokol RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™). 10 µL sampel RNA digunakan sebagai template dan primer oligo (dT)18 untuk sintesis cDNA. Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan thermal cycler 2720 (Applied Biosystem). cDNA yang terbentuk kemudian dikonfirmasi dengan primer *mtp* dan *f-box*. Hasil sintesis cDNA disimpan di suhu -20°C

## 2.2 Konfirmasi Gen

Pada penelitian ini digunakan 5 pasang primer yang terdiri dari 3 pasang primer untuk gen target dan 2 pasang primer untuk gen referensi. Primer yang digunakan terdapat pada Tabel 1. Konfirmasi gen dilakukan menggunakan PCR dengan primer-primer tersebut berdasarkan protokol dari KAPA 2G Robust (no katalog KK5005).. Sampel kemudian disekuensing dengan cara mengirim sampel ke Macrogen di Korea. Konsentrasi sampel yang dikirim sekitar 30-50 ng dengan volume minimal 20 µL. Hasil sekuensing berupa kromatogram yang dikirim melalui alamat email. Data sekuens kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak bioinformatik dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), yaitu BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

**Tabel 1** Primer yang digunakan dalam konfirmasi gen dan PCR kuantitatif. Urutan primer yang digunakan merupakan hasil penelitian sebelumnya dengan menggunakan primer *f-box*, *pal1*, *chs7*, *chi1b1*<sup>12</sup> dan *mtp*<sup>13</sup>

Primer	Urutan oligonukleotida (5' → 3')	Ukuran amplikon (pb)
<i>mtp_f</i>	ATGAATGACGGTTCCCATGTA	116
<i>mtp_r</i>	GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT	
<i>f-box_f</i>	AGATAGGGAAATGGTGCAGGT	93
<i>f-box_r</i>	CTAATGGCAATTGCAGCTCTC	
<i>pal1_f</i>	AGCAACACAACCAGGATGTCAA	119
<i>pal1_r</i>	CAATTGCTTGGCAAAGTGCA	
<i>chs7_f</i>	AACCCACCAAACCGTGTTGAT	111
<i>chs7_r</i>	CTTGTCACACATGCGCTGAAAT	
<i>chi1b1_f</i>	AGCTGAATTGCTCGACTCCCT	150
<i>chi1b1_r</i>	CAGATTGCATATGTGCCACACA	

Pada penelitian ini menggunakan metode analisis PCR kuantitatif relatif. Instrumen yang digunakan adalah Bio-Rad iCycler® Thermal Cycler yang terhubung dengan iQ™5 Real-Time PCR Detection Systems. Setiap sampel yang digunakan dibuat pengulangan 3 kali. Pada reaksi PCR kuantitatif juga disertakan kontrol negatif (yang tidak berisi *template*). Pewarna yang digunakan adalah SsoFast™ EvaGreen® Supermix.

Tahap paling awal pada organ daun (V3) dijadikan sebagai kalibrator. Gen referensi yang digunakan adalah *f-box* dan *mtp*. Metode perhitungan yang digunakan adalah analisis PCR kuantitatif relatif dengan menggunakan persamaan Livak dan Schmittgen<sup>12</sup>.

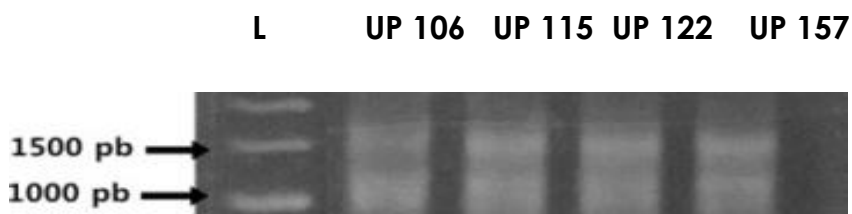
*Fold change* yang dihasilkan kemudian ditransformasi logaritma 2 sehingga data kelipatan ekspresi akan diubah berupa rasio-log<sub>2</sub>. Transformasi logaritma 2 biasa digunakan untuk melihat peningkatan atau penurunan ekspresi gen. Transformasi logaritma 2 menyebabkan ekspresi

gen yang meningkat atau menurun dua kali lipat (*2-fold*) akan diubah menjadi +1 dan -1<sup>13</sup>.

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### 3.1 Hasil Isolasi RNA Total

RNA total dari daun kedelai hitam berhasil diisolasi menggunakan *Total RNA Mini Kit for Plant* (Geneaid Biotech Ltd.). Hasil isolasi RNA total ditunjukkan pada Gambar 1. Kemurnian sampel RNA ditentukan melalui pengukuran spektrofotometrik pada rasio panjang gelombang 260/280 nm. Kualitas RNA dengan kemurnian yang baik berada pada rasio 1.7-2.2. Hal ini menunjukkan bahwa sampel RNA yang telah diisolasi memiliki kemurnian yang cukup baik. Konsentrasi masing-masing sampel yang diperoleh berkisar antara 0.17 µg/µL hingga 1.3 µg/µL.



**Gambar 1.** Elektroferogram isolat RNA total dari daun. Pada elektroferogram terdapat 2 pita berukuran sekitar 1500 dan 1000 pasang basa yang menandakan keberadaan komponen 28sRNA dan 18sRNA.



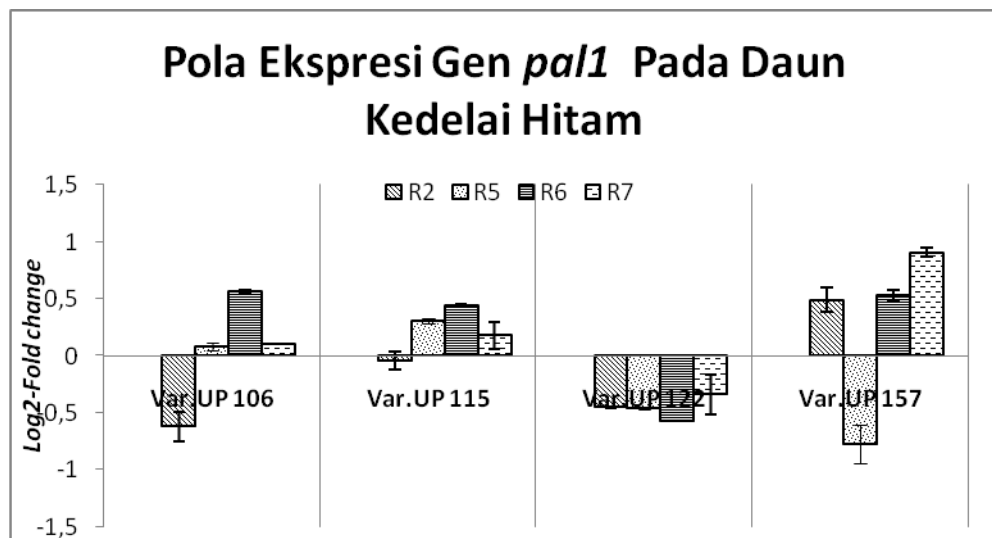
### 3.2 Pola Ekspresi Gen Terkait Isoflavon pada Daun

Ekspresi gen-gen terkait isoflavon (gen *pal1*, *chs7*, dan *chi1b1*) dikuantifikasi melalui teknik PCR kuantitatif relatif. Kuantifikasi dilakukan dengan membandingkan ekspresi setiap gen terhadap kalibrator. Kalibrator yang digunakan pada organ daun adalah sampel pada tahap awal pencuplikan sampel, yaitu tahap V3. Selain itu, pada penelitian ini juga digunakan dua gen referensi yakni gen *f-box* dan *mtp*. Kedua gen ini banyak digunakan sebagai gen referensi pada tanaman kedelai<sup>14, 15</sup>.

### 3.3 Pola Ekspresi Gen *pal1* Pada Daun

Pola ekspresi gen *pal1* ditunjukkan pada Gambar 2. Gen *pal1* merupakan gen yang mengkode enzim *pal1* yang berperan penting dalam sintesis metabolit primer seperti lignin dan metabolit sekunder (isoflavon, flavon dan antosianin)<sup>11</sup>. Dalam produksi senyawa metabolit sekunder isoflavon, gen *pal1* berada pada posisi hulu jalur fenilpropanoid. Gen *pal1* merupakan salah satu gen kunci dalam produksi isoflavon dalam jalur fenilpropanoid. Pada jalur ini, peningkatan ekspresi gen *pal1* berpotensi untuk meningkatkan produksi isoflavon. Penelitian sebelumnya menunjukkan pada organ daun kedelai, kandungan isoflavon memiliki korelasi positif dengan tahap perkembangan kedelai<sup>16</sup>. Akan tetapi, pada penelitian ini pola ekspresi gen *pal1* di keempat varietas tidak menunjukkan kecenderungan peningkatan selama tahap pertumbuhan secara kontinu. Hal ini diduga karena adanya pengaruh enzim-enzim lain

yang berada posisi hilir dari enzim *pal1* dari jalur fenilpropanoid<sup>17</sup>. Di samping itu, senyawa intermediet yang dihasilkan dari biokatalis enzim *pal1* juga berpotensi memasuki jalur sintesis metabolit lain selain isoflavan

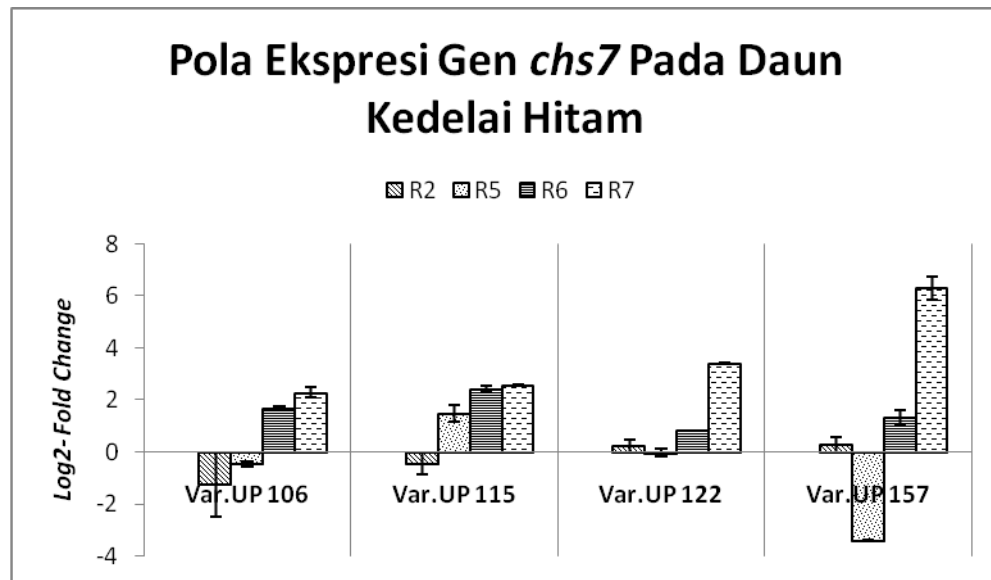


**Gambar 2.** Pola ekspresi gen *pal1* pada organ daun varietas 106, 115,122 dan 157 pada fase V3 (kalibrator; tidak ditampilkan karena nilainya 0), R2, R5, R6 dan R7. Ekspresi gen *pal1* menurun ketika memasuki fase reproduktif (R2), selanjutnya meningkat hingga fase R6. Pola ini diperoleh pada sampel daun kedelai varietas 106 dan 115. Pada varietas 122 ekspresi gen cenderung menurun sementara pada varietas 157, pola ekspresi menurun ketika memasuki R5 dan terus meningkat hingga fase R7.

### 3.4 Pola Ekspresi Gen *chs7* Pada Daun

Pola ekspresi gen *chs7* ditunjukkan pada Gambar 3. Ekspresi gen *chs7* dipengaruhi oleh kondisi spesifik<sup>18</sup>. Diduga perbedaan ekspresi gen *chs7* di daun kedelai hitam pada setiap tahap dapat disebabkan oleh keberadaan stimulus yang berbeda pada tahap perkembangan yakni faktor transkripsi yang berperan secara langsung dalam ekspresi gen

*chs7*. Pada organ daun keempat varietas ditemukan kesamaan pola yaitu peningkatan ekspresi gen di tahap R6 dan R7. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pada tahap perkembangan R6 dan R7 tersedia faktor-faktor transkripsi yang aktif dalam meregulasi ekspresi gen *chs7*.



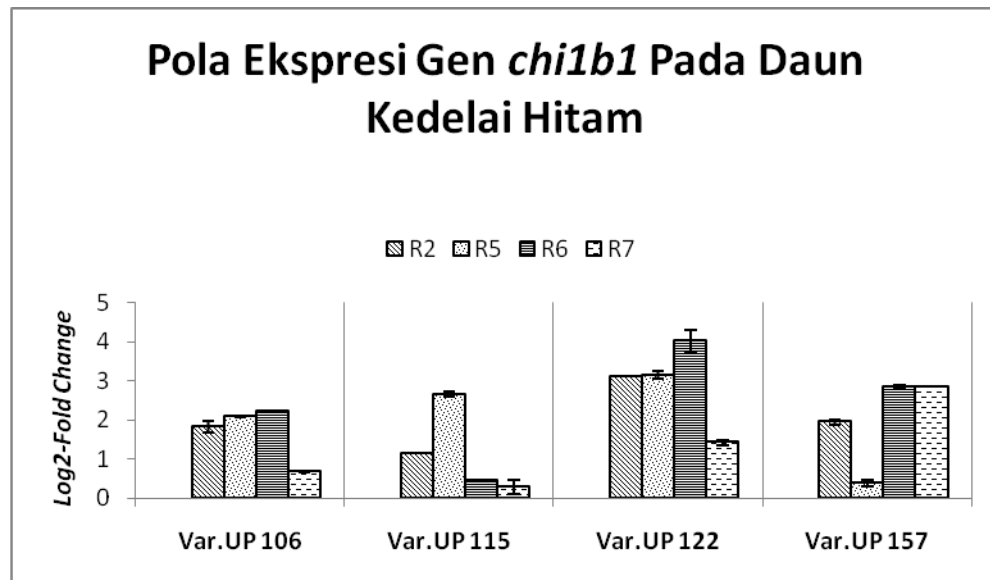
**Gambar 3.** Pola ekspresi gen *chs7* pada organ daun varietas 106, 115, 122 dan 157 pada fase R2, R5, R6 dan R7. Ekspresi gen *chs7* di varietas 106 dan 115 menunjukkan pola yang mirip. Pada tahap R2, ekspresi gen relatif menurun terhadap V3 (Kalibrator; tidak ditampilkan karena nilainya 0). Kemudian di tahap selanjutnya, terdapat kecenderungan peningkatan ekspresi gen hingga tahap R7. Pada varietas 122 dan 157 juga menunjukkan pola yang sama. Pola ekspresi gen meningkat di tahap R2 dan menurun di tahap R5. Pada tahap R6, terjadi peningkatan ekspresi gen hingga tahap R7.

Gen *chs7* adalah gen yang mengkode enzim yang berperan dalam proses sintesis chalcone. Chalcone merupakan senyawa intermediet dari flavonoid dan isoflavonoid. Senyawa chalcone umumnya tidak terakumulasi pada tanaman<sup>18</sup>. Hal ini dapat disebabkan karena senyawa ini merupakan senyawa intermediet yang akan diproses menjadi senyawa

metabolit sekunder lain. Ekspresi gen *chs7* yang tinggi pada tahap akhir perkembangan diduga disebabkan karena kebutuhan chalcone sebagai substrat untuk sintesis metabolit sekunder di pertahanan tanaman.

### 3.5 Pola Ekspresi Gen *chi1b1* Pada Daun

Pola ekspresi gen *chi1b1* organ daun ditunjukkan pada Gambar 4. Gen *chi1b1* merupakan golongan gen *chi* tipe II, gen yang khusus dimiliki oleh tanaman kelompok legum. Gen *chi1b1* berperan dalam mengubah narinengin chalcone menjadi narinengin<sup>14</sup>. Narinengin termasuk dalam kelompok senyawa flavanon. Pada jalur fenilpropanoid, narinengin akan diubah menjadi salah satu jenis isoflavon yaitu genistein. Penurunan ekspresi gen *chi1b1* diduga dapat disebabkan oleh adanya inhibitor yang dapat menekan ekspresi gen *chi1b1* pada tahap akhir perkembangan. Pola ekspresi gen *chi1b1* menunjukkan penurunan ekspresi gen *chi* pada fase akhir perkembangan kedelai. Hal ini serupa dengan hasil penelitian pada ekspresi gen *chi1b1* di biji kedelai kuning sebelumnya<sup>4</sup>.



**Gambar 4.** Pola ekspresi gen *chi1b1* organ daun menunjukkan bahwa pada varietas 106 dan 122 terjadi peningkatan ekspresi sampai tahap R6 dan penurunan di tahap R7. Pada varietas 115 terjadi peningkatan ekspresi gen hingga tahap R5 dan penurunan ekspresi gen di tahap R6 dan R7. Sementara pada varietas 157, terjadi penurunan ekspresi gen di tahap R5 dan peningkatan ekspresi gen pada tahap R6 dan menurun di tahap R7.

Pola ekspresi gen *pal1*, *chs7*, dan *chi1b1* yang berbeda pada keempat varietas kedelai hitam dapat terjadi karena adanya perbedaan faktor transkripsi dan elemen regulator pada pada setiap varietas. Perbedaan faktor transkripsi dapat berupa keberadaan, kelimpahan, dan keaktifan faktor transkripsi pada masing-masing varietas. Sementara elemen regulator merupakan sekuen DNA tempat berikatannya faktor transkripsi. Perbedaan pola dan tingkat ekspresi gen pada varietas disebabkan oleh perbedaan sistem cis (elemen regulator) dan *trans acting factor* (faktor transkripsi). Keberadaan faktor transkripsi berupa aktivator yang berikatan dengan elemen regulator enhancer pada suatu varietas

dapat menyebabkan ekspresi gen lebih tinggi dibandingkan varietas lainnya. Sebaliknya, keberadaan faktor transkripsi berupa repressor yang dapat berikatan dengan *elemen regulator silencer* dapat menghambat atau menghentikan ekspresi gen pada kondisi tertentu<sup>19</sup>.

#### **4. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan ekspresi gen *pal1* pada organ daun di keempat varietas kedelai hitam menunjukkan pola yang bervariasi selama tahap perkembangan. Sementara ekspresi gen *chs7* menunjukkan kecenderungan peningkatan ekspresi gen selama tahap pertumbuhan di keempat varietas. Ekspresi gen *chi1b1* di keempat varietas menunjukkan peningkatan pada tahap awal reproduktif namun menurun di tahap akhir. Perbedaan pola pada masing-masing tahap pertumbuhan diduga disebabkan oleh faktor-faktor yang mempengaruhi ekspresi suatu gen seperti kelimpahan faktor transkripsi gen, adanya cekaman biotik dan abiotik dari lingkungan, adanya faktor induksi yang terkait tahap pertumbuhan dan bisa disebabkan oleh kandungan metabolit sekunder yang dapat menjadi *inducer* atau inhibitor.

#### **5. Saran**

Perlu dilakukan penelitian mengenai pola semua ekspresi gen pada jalur fenilpropanoid yang berperan dengan sintesis isoflavon untuk mendapatkan profil ekspresi gen keseluruhan.

## 6. Pengakuan

Bibit kedelai hitam (*Glycine max*) L. Merr pada penelitian ini didapat dari koleksi Dr. Agung Karuniawan, Laboratorium Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Padjajaran.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Aerenhouts D, Hebbelinck M, De Vriese S, Clarys P. Soy consumption fits within a healthy lifestyle. *Nutrition & Food Science*. 2010; 40 (4): 362-370.
2. Cederroth CR, Nef, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009; 304 (1-2): 30 - 42.
3. Dinsdale EC, Ward W.E. Early Exposure to Soy Isoflavones and Effects on Reproductive Health: A Review of Human and Animal Studies. *Nutrients*. 2010; 2: 1156-1187.
4. Gutierrez-Gonzalez J, Satish K, Lam-Son P, Donavan L., Zhong R, Yu O., et al. Differential Expression of Isoflavone Biosynthetic Genes in Soybean During Water Deficits. *Plant Cell Physiology*. 2010; 51 (6): 936–948.
5. [Murakami S](#), [Nakata R](#), [Aboshi T](#), [Yoshinaga N](#), [Teraishi M](#), [Okumoto Y](#), et al. Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves. [Metabolites](#). 2014; (3):532-46.
6. Lee H, Ha T, Baek I, Ko J, Cho K, Im M., et al. Characterization of Isoflavones Accumulation in Developing Leaves of Soybean (*Glycine max*) Cultivars. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2009; 52 (2): 139-143.
7. Sumardi D, Pancoro A, Yulia E, Musfiroh I, Prasetyono J, Karuniawan A., et al. Potential of local black soybean as a source of the isoflavones daidzein and genistein. *International Food Research Journal*. 2017; 24(5): 2140-2145.
8. Kim JA, Hong SB, Jung WS, Yu CY, Ma KH, Gwag JG., et al. "Comparison of Isoflavones Composition in Seed, Embryo, Cotyledon and Seed Coat of Cook-With Rice and Vegetable Soybean," *Food Chemistry*. 2007; 102 (3): 738-744.
9. Chu S, Wang J, Zhu Y, Liu S, Zhou X, Zhang H, et al. An R2R3-type MYB transcription factor, GmMYB29, regulates isoflavone

- biosynthesis in soybean. PLoS Genet. 2017; 13(5): e1006770. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006770>
10. Septiyani T. Profil Ekspresi Gen Chalcone Reductase (CHR), Chalcone Isomerase Ia Tipe Ii (CHI IA) dan Isoflavone Synthase 2 (IFS 2) Pada Setiap Fase Pertumbuhan Kedelai Hitam (Thesis).. Bandung: Prodi Bioteknologi, Institut Teknologi Bandung; 2014.
  11. Ferreyra M L, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*. 2012; 3, 222. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
  12. Livak K, Schmittgen, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.
  13. Tarca A, Romero R, dan Draghici, S. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American Journal of Obstetrics And Gynecology*. 2006; 195 (2): 373-388.
  14. Gutierrez-Gonzalez J. Genetic basis of isoflavone accumulation during soybean seed development: special focus on water-deficit conditions (Disertasi). Columbia: The Faculty of the Graduate School, University of Missouri; 2009.
  15. Libault MTS. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *Plant Genetics*, 2008. 1: 44-54.
  16. Lee H, Ha T, Baek I, Ko, J, Cho K, Im M., et al. Characterization of Isoflavones Accumulation in Developing Leaves of Soybean (*Glycine max*) Cultivars. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2009; 52 (2): 139-143.
  17. Bagal U, Leebens-Mack H, Lorenza W, Dean J. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *BMC Genomics*, 2012; 12: 1-9.
  18. Dao T, Linthorst H, Verpoorte R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*. 2011; 10: 397-412.
  19. Stamatoyannopoulos J. The Genomics of Gene Expression. *Genomics*. 2004; 84: 449-457.