

DETECTION AND BIOINFORMATICS ANALYSIS OF THE ALLIINASE-ENCODING GENE IN THAI AND CHINESE GARLIC

ILHAM JULIANSYAH



**DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
IPB UNIVERSITY
BOGOR
2025**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



STATEMENT ABOUT UNDERGRADUATE THESIS, INFORMATION SOURCES, AND ACT OF SPILLING OVER COPYRIGHTS

By this writing, I clarify that the undergraduate thesis entitled “Detection and Bioinformatics Analysis of the Alliinase-Encoding Gene in Thai and Chinese Garlic” is my own work under the supervisions of the advising committee and has not been proposed for any institution. Copied information source of published and unpublished writing of other authors has been mentioned in the text and incorporated in the references at the end of this thesis.

By this writing, I hand over the copyright of my undergraduate thesis to IPB University.

Bogor, August 2025

Ilham Juliansyah
G3401211068

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



ABSTRAK

ILHAM JULIANSYAH. Deteksi dan Analisis Bioinformatika Gen Penyandi Alliinase pada Bawang Putih Thailand dan Cina. Dibimbing oleh RIKA INDRI ASTUTI dan ATTAWAN ARAMRAK.

Alliinase merupakan enzim yang umum ditemukan di umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) dan berperan dalam mengkatalisis konversi alliin menjadi allicin. Enzim ini telah diidentifikasi sebagai alergen pada bawang putih. Bawang putih asal Thailand dan Cina merupakan dua jenis bawang putih yang umum ditemukan di Thailand, sehingga penelitian ini bertujuan untuk menginvestigasi dan menganalisis sekuen gen penyandi alliinase pada kedua jenis bawang putih tersebut. DNA genomik dari bawang putih Thailand dan China diisolasi dari umbi menggunakan kit ekstraksi DNA. Deteksi molekuler gen alliinase dilakukan dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik dan tiga jenis PCR *master mix* yang berbeda, kemudian amplikon disekuensing dan dianalisis menggunakan perangkat bioinformatika. Gen alliinase telah berhasil diamplifikasi hanya menggunakan 2x *Phire Plant Direct PCR Maaster Mix*. Namun, hanya amplikon dari DNA genomik bawang putih Thailand yang telah dikonfirmasi sebagai gen alliinase, sementara gen ini gagal diamplifikasi dari DNA genomik bawang putih Cina. Berdasarkan pohon filogenetik menggunakan sekuen-sekuen asam amino alliinase, *Allium sativum* (Thailand) berkerabat dekat dengan *Allium ampeloprasum*, didukung oleh nilai *bootstrap* yang tinggi. Selain itu, *Allium sativum* ISA 1 dan ISA 2 membentuk klaster tersendiri, sesuai dengan pola pengelompokan yang dilaporkan dalam penelitian sebelumnya. Sifat fisiko-kimia alliinase telah mengindikasikan bahwa protein alliinase dari bawang putih Thailand memiliki banyak asam amino aromatik, bersifat hidrofilik, larut pada pH netral, dan kurang stabil pada suhu tinggi. Visualisasi protein menunjukkan bahwa alliinase dari bawang putih Thailand membentuk model homodimer, yang memiliki kedekatan hubungan dengan alliinase berdasarkan kesamaan sekuen. Berdasarkan hasil tersebut, gen alliinase berhasil diidentifikasi pada bawang putih Thailand, namun belum terdeteksi pada bawang putih Cina. Oleh karena itu, diperlukan optimasi lebih lanjut terhadap metode deteksi gen untuk memastikan keberadaan gen alliinase pada bawang putih Cina maupun jenis bawang putih lainnya.

Kata Kunci: Alliinase, amplifikasi PCR, analisis sekuen, bawang putih, bioinformatika



ABSTRACT

ILHAM JULIANSYAH. Detection and Bioinformatics Analysis of the Alliinase-Encoding Gene in Thai and Chinese Garlic. Supervised by RIKA INDRI ASTUTI and ATTAWAN ARAMRAK.

Alliinase is an enzyme mainly found in garlic bulbs (*Allium sativum* L.) that catalyzes the conversion of alliin into allicin. This enzyme was identified as an allergen in garlic. As Thai garlic and Chinese garlic are the two main types of garlic found in Thailand, this study was conducted to investigate and analyze the sequence of the alliinase-encoding gene in these two types of garlic. The genomic DNA of Thai and Chinese was isolated from the bulbs using a DNA extraction kit. Molecular detection of the alliinase gene was carried out by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and three different PCR master mixes, and the resulting amplicon was sequenced and analyzed using bioinformatic tools. The alliinase gene was successfully amplified using only the 2x Phire Plant Direct PCR Master Mix. However, only amplicon from Thai garlic genomic DNA was confirmed as the alliinase gene, while this gene failed to be amplified from the genomic DNA of the Chinese garlic. Based on the phylogenetic tree using alliinase amino acid sequences, *Allium sativum* (Thailand) clustered with *Allium ampeloprasum*, supported by a high bootstrap value. Additionally, *Allium sativum* ISA 1 and ISA 2 were grouped into a distinct cluster, aligning with the clustering patterns reported in earlier studies. Alliinase physicochemical properties indicated that Thai-garlic alliinase protein has more aromatic amino acid and is hydrophilic, water-soluble in neutral pH, and less stable in high temperatures. Protein visualization revealed that the aliinase from Thai garlic exhibited a homodimer model, which is closely related to alliinase based on sequence identity. Based on the results, the alliinase gene was successfully identified in Thai garlic, however, it was not detected in Chinese garlic. Further optimization of gene detection methods should be conducted to confirm the presence of the alliinase gene in Chinese garlic and other types of garlic.

Keywords: Alliinase, bioinformatics, garlic, PCR amplification, sequence analysis

@HannaJuliansyah

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Copyright IPB University, the Year 2025
Copyright Reserved

No part or all of this thesis may be expected without inclusion or mentioning the sources, the exception only for research and education use, writing for a scientific paper, reporting, critical writing, or reviewing of a problem, exception thus inflict a financial loss in the properties of IPB University.

No part or all of this thesis may be transmitted and reproduced in any form without or written permission from IPB University

DETECTION AND BIOINFORMATICS ANALYSIS OF THE ALLIINASE-ENCODING GENE IN THAI AND CHINESE GARLIC

ILHAM JULIANSYAH

An Undergraduate Thesis
Intended to Acquire Bachelor Degree
In the Department of Biology

**DEPARTEMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
IPB UNIVERSITY
BOGOR
2025**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Examiner Team for Undergraduate Thesis Defense:

- 1 Dr. Rika Indri Astuti, S.Si., M.Si.
- 2 Assist. Prof. Dr. Attawan Aramrak
- 3 Prof. Dr. Ir. Raden Roro Dyah Perwitasari, M.Sc.



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Research Title : Detection and Bioinformatics Analysis of the
Alliinase-Encoding Gene in Thai and Chinese
Garlic

Name : Ilham Juliansyah
Student ID : G3401211068

Approved by

Supervisor 1:
Dr. Rika Indri Astuti, S.Si., M.Si.

Supervisor 2:
Assist. Prof. Dr. Attawan Aramrak

Attawan A.

Acknowledged by

Head of Departemen Biology:
Prof. Dr. Ir. Iman Rusmana, M.Si.
NIP 196507201991031002

Examination Date:
(August 2025)

Pass Date:



FOREWORDS

First and foremost, I would like to express my deepest gratitude and appreciation to Allah Subhanahu Wata'ala, the Almighty God, for His blessings and guidance, allowing this research to be completed. My journey throughout the research process, from August 2024 to December 2024, has been truly spectacular. Even though it felt like a rollercoaster at times, I am sincerely grateful and never expected that I would have the opportunity to conduct this research in Thailand through the Kasetsart University Exchange Program (KUEX 2024).

I would like to express my appreciation to the following people and institutions:

1. Dr. Rika Indri Astuti, S.Si., M.Si. as my first supervisor and Assist. Prof. Attawan Aramrak as my second supervisor in Thailand, for their invaluable guidance, advice, supervision, and patience throughout the research process. I am truly grateful to have had wise and supportive supervisors.
2. The Faculty of Science, Kasetsart University, and the Department of Biology, IPB University, for providing facilities, academic support, and opportunities during the research period.
3. All members of Laboratory 7214, Department of Biochemistry, Kasetsart University: especially Nine(stein) as my private supervisor in the lab, and Jan, Jill, Ball, Fah, and Ice Phakaphol as my research partner and irreplaceable friend in this gene research project.
4. Raymond Passapas the Centella dude and Ice Kittiphat from Laboratory 7216, for their help and for being my tour guides in Thailand, as well as Erk, Tawan, Ma Phrang, and Eve for their companionship and kindness during my stay.
5. My fellow exchange friends: Alza, Dini, Listy, Mary, Shotaro, Simon, Miwa, and Minami, thank you for your support and the unforgettable memories we shared. I sincerely wish you all the best in life.
6. My homies Steven Morrison, Ambar Ratna Antila, Ravena Tiara Ananda, Lila Meidina, Masarra Deveria Purnama, and Mohammad Hafzal Hadid for always being there, listening to my rants, and reminding me to keep going.
7. Uni friends, Kania, Hasya, Buna, Bella, Jasmine, OWA Family, Ihsan, Birrbik, Dhava, Kak Aisy, Bang Adip, Mas Ndan and all admin staff.
8. My beloved parents, for their endless love, prayers, and support throughout this journey. I am truly grateful for everything they have given me.

Dear reader, I put my biggest hope for this research would be insightful not only for individual, but all of people, at least.

Bogor, August 2025

Ilham Juliansyah



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



CONTENTS

LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xi
INTRODUCTION	1
1.1 Background	1
1.2 Problem of the Research	1
1.3 Aims of the Research	2
1.4 Benefits of the Research	2
METHODS	3
2.1 Time and Place	3
2.2 Tools and Materials	3
2.2.1 Tools	3
2.2.2 Materials	3
2.3 Method	3
2.3.1 DNA Isolation and Optimization of Primer Annealing Temperature	3
2.3.2 Detection of Alliinase Gene Using Three PCR Mixes	4
2.3.3 Sequencing Preparation from PCR Products	4
2.4 Data Analysis	4
III RESULTS AND DISCUSSIONS	5
3.1 Results	5
3.1.1 DNA Isolation and Optimization of Primer Annealing Temperature	5
3.1.2 Detection of Alliinase Gene Using Three PCR Mixes	6
3.1.3 Sequencing Preparation from PCR Products	6
3.1.4 Bioinformatics sequence analysis	7
3.2 Discussions	12
IV CONCLUSION AND SUGGESTION	14
4.1 Conclusion	14
4.2 Suggestion	14
REFERENCES	15
APPENDIXES	18
CURRICULUM VITAE	22

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

LIST OF TABLES

1	DNA concentration and purity of garlic samples	5
2	Comparison of three PCR mixes for amplification of the <i>Allium sativum</i> alliinase gene	6
3	Identification of alliinase gene in Thai and Chinese Garlic based on nucleotide sequence with BLAST-N	7
4	Identification of alliinase gene in Thai and Chinese Garlic based on nucleotide sequence with BLAST-X	8
5	Sample identities used for alliinase gene phylogenetic analysis	9
6	Physico-chemical characterization of alliinase from Thai garlic using Protparam	10
7	Structure prediction of alliinase from Thai garlic using SWISS-MODEL	10

LIST OF FIGURES

1	Electropherogram of gradient PCR products from <i>Allium sativum</i> genomic DNA extracted by using 2x Phire Plant Direct PCR Master Mix and DNA ladder mix (Solis BioDyne)	5
2	Electropherogram of alliinase PCR products from <i>Allium sativum</i> leaf and clove DNA from Chinese and Thai garlic using 2x Phire Plant Direct PCR Master Mix and DNA ladder mix (Solis BioDyne)	6
3	Phylogenetic tree of alliinase amino acid sequences from selected <i>Allium</i> species constructed using maximum likelihood with 1000 bootstrap replicates	10
4	Visualization of the predicted structure of alliinase from Thai garlic using SWISS-MODEL	10