

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PEMENCILAN LOKUS MIKROSATELIT DNA MENGGUNAKAN
TEKNIK '5' ANCHORED PCR' DARIPADA BELANGKAS (Tachypleus trident)

Ijazah: IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN

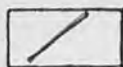
SESI PENGAJIAN: 2002 - 2005

Saya SHAFEEZA BT MOHD LUTHFI ISMAIL

(HURUF BESAR)

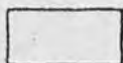
mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)



SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)



TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)



TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

Shafieza

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: NO 12, JALAN BUKIT
ANGIN 4/1, TAMAN BUKIT
ANGIN, 28000, TEMERLOH, PAHANG.

DR. VIJAY KUMAR

Nama Penyalia

Tarikh: 31 MAC 2005

Tarikh: 31 MAC 2005

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



**PEMENCILAN LOKUS MIKROSATELIT DNA MENGGUNAKAN TEKNIK
“5’ ANCHORED PCR” DARIPADA BELANGKAS
(*Tachypleus tridentatus*)**

SHAFEEZA BT MOHD LUTHFI ISMAIL

**DISERTASI YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT-SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH
SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

2005

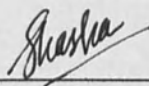


UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

Saya akui bahawa karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali mana-mana nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah memperjelaskan sumbernya,

31 MAC 2005



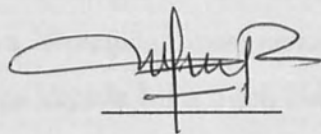
SHAFEEZA MOHD LUTHFI ISMAIL

(HS 2002/ 3118)

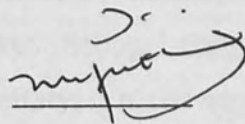


PENGESAHAN**DIPERAKUKAN OLEH****Tandatangan**

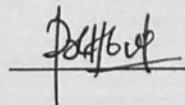
1. Penyelia
(DR. VIJAY KUMAR)



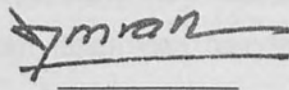
2. Pemeriksa Pertama
(MISS TEOH PEIK LIN)



3. Pemeriksa Kedua
(DR. ROZIAH HJ. KAMBOL)



4. Dekan
(PROF.MADYA DR. AMRAN AHMED)



PENGHARGAAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang.

Alhamdulillah, bersyukur saya ke hadrat Ilahi kerana dengan limpah kurnia dan izinNya, saya dapat menyempurnakan latihan dan penulisan ilmiah ini dengan jayanya.

Pertama sekali saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia saya, Dr. Vijay Kumar yang telah banyak meluangkan masa untuk memberikan bimbingan dan tunjuk ajar kepada saya sepanjang menyiapkan latihan ilmiah ini. Ucapan terima kasih ini ditujukan juga kepada Miss Teoh Peik Lin dan Dr. Roziah Hj. Kambol yang turut sama memberikan pandangan berhubung latihan dan penulisan ilmiah yang telah dijalankan. Setinggi-tinggi penghargaan ini juga ditujukan khas kepada En. Fester Jeffery, En. Awang Muhammad Sagaf, En. Melvin dan En. Thien yang banyak memberi tunjuk ajar dan pertolongan dalam kerja-kerja makmal.

Tidak lupa juga penghargaan kepada kedua ibubapa saya, Laila Abu Samah dan Mohd Luthfi Ismail serta keluarga yang memberikan ilham dan banyak membantu dari segi kewangan, sokongan dan dorongan sepanjang pengajian saya di Universiti Malaysia Sabah.

Terakhir sekali, jutaan penghargaan buat teman-teman, Nur Afifah, Muhammad Azfar, Mas Jaffri, Kelvin, Faeza, Masleelinda, Farah, Salfarina, Sabrina, Ismak Muliana, Erni Fadzila, Nur Nazifah dan kepada teman-teman yang terlibat secara langsung mahupun tidak langsung sepanjang latihan ilmiah ini dijalankan. Sekian, terima kasih.



ABSTRAK

Belangkas (*Tachypleus tridentatus*) merupakan haiwan yang mempunyai potensi yang tinggi dalam penghasilan Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). LAL merupakan bahan yang berupaya mengesan kehadiran endotoksin dan digunakan dalam ujian kesterilan alat-alatan perubatan. Menerusi kajian dan pemencilan mikrosatelit, DNA belangkas diekstrak daripada tisu otot kaki belangkas dengan menggunakan kaedah pengaraman keluar dan kepekatan DNA yang diperoleh ialah 240ng/ μ l. Primer degenarat PCT6 (5'KKBNVSS(GATA)₆3') digunakan dalam proses tindakbalas berantai polimerase untuk mengamplifikasikan templat DNA tersebut. Produk PCR yang diperoleh kemudiannya diklonkan dalam vektor plasmid pCR 2.1 vektor dan ditransformasikan ke *E.coli* yang bertindak sebagai sel kompetan. Kemudian, produk PCR yang telah ditransformasikan ditumbuhkan dalam piring LB Luria Bertani yang mengandungi ampicilin (50 μ g/ml) sebagai penanda pemilih dan X-gal (40 μ l/ml). Sebanyak 421 koloni putih yang terbentuk berbanding hanya 25 koloni biru yang terbentuk. Koloni putih yang diperoleh kemudiannya dikulturkan dalam LB 'broth' semalaman sebelum pengekstrakan plasmid dilakukan. Pengekstrakan plasmid dilakukan menggunakan kaedah 'alkaline solution protocol'. Lima plasmid yang diperoleh diujuk dengan menggunakan penjujukan secara automatik. Hasilnya, 12 mikrosatelit berjaya dipencilkan dan kesemua jujukan mikrosatelit ini dihantar adan disimpan di bank gen melalui laman web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Nombor akses bagi setiap jujukan mikrosatelit akan diperoleh sejeurus selepas penghantaran. Nombor-nombor akses yang diperoleh ialah AY940069 bagi klon PCT64C, AY940068 bagi klon PCT61B, AY940070 bagi klon PCT65B, AY940071 bagi klon PCT66B dan AY940072 bagi klon PCT62A. Nombor akses ini boleh digunakan sebagai nombor rujukan bagi mendapatkan jujukan DNA mikrosatelit sekiranya kajian lanjut terhadap jujukan mikrosatelit ini dijalankan.



ABSTRACT

Horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) is an animal which has the potential to produce Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) that can detect endotoxin and to test the sterile of medical equipment. In isolating and studying microsatellites from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*), the DNA was extracted from the leg tissue using the salting out procedure and the DNA concentration were 240ng/μl. Primer degenerate such as PCT6 (5'KKBNVSS(GATA)₆3') was used in Polymerase Chain Reaction (PCR) to amplify microsatellites loci. Next, PCR products were cloned in 2.1 pCR cloning vector and transform in *E.coli* which plays role as competent cell. Next, the PCR product which had been transformed was growth in LB Luria Bertani plate that contains ampicillin (50μg/ml) and X-gal (40μl/ml). There were 421 white colonies and 25 blue colonies were obtained. White colonies were then cultured with LB broth overnight before proceeded to plasmid extraction. Plasmid extraction was carried out using the alkaline lysis procedure. Five plasmids which contain inserts were sent for sequencing using automated sequencing protocol. 12 microsatellites had been isolated and all the microsatellites sequences were deposited to GenBank through web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> to get the accession number. The accession number for each microsatellites sequence will be given shortly after sending the sequences. The accession number that been given were AY940069 for PCT64C clone, AY940068 for PCT61B clone, AY940070 for PCT65B clone, AY940071 for PCT66B clone and AY940072 for PCT62A clone. This accession number can be use as reference number to get the microsatellite DNA sequences if further study about microsatellite sequences were to be made.



KANDUNGAN

Halaman

PENGAKUAN	ii
PERAKUAN PEMERIKSA	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI GAMBARAJAH	x
SENARAI SIMBOL	xi

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1	Pengenalan	1
1.2	Objektif Kajian	4

BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAN

2.1	Belangkas	5
2.2	Kitar hidup belangkas	9
2.3	Fisiologi belangkas	10
2.4	Haemolymph	13
2.5	Kepentingan belangkas	13
2.6	Belangkas di Malaysia	18
2.7	Mikrosatelit DNA	19
2.8	Mikrosatelit Sebagai Penanda Genetik	20
2.9	Aplikasi mikrosatelit DNA Dalam Penyelidikan	21
2.10	Masalah Yang Dihadapi Apabila Memilih Mikrosatelit Sebagai Penanda Genetik	21
2.11	'Five Anchored PCR' tindakbalas berantai polymerase (PCR)	22



BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Persampelan	23
3.2	Pengekstrakan DNA daripada tisu otot belangkas	24
3.3	Penyediaan Gel Agarose 0.8%	25
3.4	'Five Anchored PCR' tindakbalas berantai polymerase (PCR)	26
3.5	Penyediaan Gel Agarose 2.0%	28
3.6	Pengklonan produk PCR ke dalam vektor TOPO TA	29
3.7	Penyediaan plasmid DNA	30
3.8	Penjujukan DNA	32
3.9	Penghantaran jujukan DNA kepada Gen Bank	32

BAB 4 KEPUTUSAN

4.1	Pengekstrakan DNA daripada tisu otot belangkas	33
4.2	Hasil tindakbalas berantai polimerase (PCR)	34
4.3	Hasil pengklonan dan transformasi	35
4.4	Penyediaan plasmid DNA	37
4.5	Penjujukan DNA	38
4.6	Penghantaran jujukan ke Gen Bank	41

BAB 5 PERBINCANGAN

5.1	Pengekstrakan DNA daripada tisu otot belangkas	42
5.2	Hasil tindakbalas berantai polimerase (PCR)	44
5.3	Hasil pengklonan dan transformasi	47
5.4	Penyediaan plasmid DNA	50
5.5	Penjujukan DNA	52

BAB 6 KESIMPULAN	54
------------------	----

RUJUKAN	57
---------	----

LAMPIRAN	62
----------	----



SENARAI JADUAL

NO. JADUAL		HALAMAN
Jadual 2.1	Spesis belangkas serta populasi mengikut spesis belangkas.	8
Jadual 3.1	Reagen PCR yang digunakan dalam proses PCR	27
Jadual 3.2	Program Proses PCR	28
Jadual 4.1	Hasil penjujukan DNA	39
Jadual 4.2	Mikrosatelit DNA yang dipencilkan dengan menggunakan teknik 5' anchor PCR.	40
Jadual 4.3	Jumlah mikrosatelit berdasarkan jenis mikrosatelit	40
Jadual 4.4	Nombor Akses yang diperolehi setelah penghantaran jujukan DNA ke GenBank.	41

SENARAI GAMBAR

NO.GAMBAR	HALAMAN
2.1 Taburan populasi belangkas mengikut spesis.	7
2.2 Struktur belangkas	10
4.1 Jalur DNA belangkas pada 1% gel agarose	34
4.2 Hasil tindakbalas berantai polimerase dengan menggunakan primer PCT6 pada 2% gel agarose	35
4.3 Pertumbuhan koloni putih dan koloni biru pada piring petri selepas ditumbuhkan semalaman.	36
4.4 Jalur plasmid DNA pada 1% gel agarose	37



SENARAI SINGKATAN DAN SIMBOL

A	Aderina (bes dalam jujukan nukleotida)
bp	Pasangan bes
C	sitosin (bes dalam jujukan nukleotida DNA)
°C	Darjah Celcius
CaSO ₄	Kalsium Sulfat
CH ₂ ^{OH}	Metanol
cm	Sentimeter
dATP	Deoksisitosin 5' - trifosfat
dCTP	Deoksisiton 5' - trifosfat
ddH ₂	'Double distilled water'
dGTP	Deoksiguanin 5' trifosfat
dH ₂ O	Air Suling
DNA	Asid Deoksiribonukleik
dNTP	Deoksiribonukleosida 5' - trifosfat
EDTA	Asid ethylenediamine tetraasetik
G	Guanina
g	Gram
HCl	Asid hidroklorik
H ₂ O	Air
Inc.	Incorporated
kb	Pasangan kilobes
KCl	Kalium klorida
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mg	Miligram
Mg ²⁺	Ion Magnesium
MgCl ₂	Magnesium Klorida
Min	Minit
ml	Mililiter
mM	Milimolar



M	Molar
Na	Natrium
NaCl	Natrium Klorida
ng	Nanogram
nm	Nanometer
no	Nombor
O ₂	Oksigen
OD	'Optical density' (penyerapan)
OD ₂₆₀	Penyerapan pada panjang gelombang 260
OD ₂₈₀	Penyerapan pada panjang gelombang 280
OH	Kumpulan Hidroksil
PCR	Tindakbalas polimerase berantai
pnys.	Penyusunan
pnyt.	Penyunting
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
s	saat
SDS	Sodium dodesil sulfat
T	Tiamina
TAE	Tris-base, Natrium acetate, Na ₂ EDTA (larutan penimbal)
T _m	Suhu lebur
TRIS	Tris (hidroksimetil) aminometana
u	unit
UV	Ultra-ungu
V	Voltan
w/v	Berat per isipadu
-	Negatif
+	Positif
X	Kali
%	Peratus



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Pengenalan

Belangkas atau lebih dikenali sebagai fosil yang masih hidup merupakan haiwan yang telah wujud sejak 520 juta tahun yang lalu berdasarkan penemuan fosil di Burgess Shales of British Columbia, Canada. Belangkas juga merupakan salah satu spesies haiwan yang tertua wujud di dunia iaitu 100 juta tahun sebelum kewujudan dinasour. Walaupun lebih dikenali sebagai ketam, belangkas bukanlah tergolong dalam kelas Crustacean tetapi lebih berhubungkait dengan labah- labah dan kala jengking (Miller dan Harley, 1994). Belangkas merupakan kelas Merostamata. Terdapat empat spesies belangkas yang masih wujud pada masa kini iaitu *Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *T. gigas* dan *Carcinoscorpinus rotundicauda*(Miller dan Harley, 1994). Namun, hanya tiga spesies sahaja yang terdapat di Asia di perairan Indo-Pasifik iaitu *T. tridentatus*, *T. gigas* dan *C. rotundicauda*. Satu jenis spesies lagi iaitu *Limulus*



polyphemus terdapat di Amerika Utara. Spesies ini terdapat di sepanjang perairan Atlantik Selatan daripada Maine hingga Gulf di Mexico. Spesies ini merupakan spesies belangkas yang paling banyak di dunia dan populasinya banyak terdapat di Teluk Delaware.

Belangkas boleh hidup dalam keadaan yang berbeza-beza. Mereka juga boleh hidup dalam perbezaan suhu yang ketara. Caranya, apabila suhu air semakin sejuk dan suhu telah jatuh di bawah 55 darjah F, belangkas akan menempatkan dirinya di dalam tanah liat dan tanah. Mereka akan menempatkan diri mereka di dalam tanah sehingga suhu air panas kembali. Tahap kematangan seks belangkas adalah lambat dan bergantung pada jantina spesies haiwan tersebut. Biasanya belangkas mencapai tahap kematangan seks antara usia 9 hingga 12 tahun (Miller dan Harley, 1994). .

Tidak dapat dinafikan, belangkas memainkan peranan yang penting terutamanya dalam kehidupan manusia. Antara kepentingan belangkas yang begitu popular ialah penghasilan agen pembekuan darah 'Limulus Ameoboyte Lysate' atau lebih dikenali sebagai LAL. 'Limulus Ameoboyte Lysate' atau LAL diekstrak daripada darah belangkas yang berwarna biru dan digunakan untuk menguji kehadiran bakteria Gram-negatif. Biasanya darah manusia dan semua penghasilan dadah komersial bagi tujuan rawatan penyakit diuji terlebih dahulu sama ada mengandungi bakteria atau tidak dengan menggunakan LAL. LAL berupaya mengesan berjuta-juta endotoksin yang merupakan komponen bakteria Gram-negatif dalam masa kurang daripada satu jam (Mikkelsen, 1988).



Selain daripada itu, LAL juga digunakan dalam ujian toksik, ujian kualiti makanan, ujian pencemaran kualiti air dan udara. Selain daripada LAL, penemuan beberapa reagen dan komponen yang berguna dalam bidang perubatan telah ditemui dalam darah belangkas. Antaranya, ujian terhadap jangkitan kulat atau G-Test yang mana telah digunakan di Jepun dan dijangkakan mendapat lesen di Amerika Syarikat pada tahun hadapan. Darah belangkas yang unik ini juga digunakan sebagai “endotoxin-neutralizing protein” yang berpotensi sebagai antibiotik dan alternatif kepada pengujian endotoksin. Darah yang diekstrak daripada belangkas juga digunakan untuk mengesan kehadiran protein-protein lain yang menunjukkan aktiviti anti-virus dan anti-kanser.

Menyedari kepentingan LAL, permintaan terhadap darah belangkas telah melonjak naik sehingga mencapai US\$ 110 atau RM 440 bagi setiap 2.5ml darah belangkas. Sememangnya belangkas merupakan salah satu biodiversiti yang boleh dikomersialkan dan menyumbang kepada pendapatan negara. Namun, kajian terhadap spesies haiwan yang unik ini dipandang ringan oleh sesetengah pihak sedangkan kajian terhadap spesies haiwan ini dapat membawa pulangan yang lumayan dan keuntungan terutamanya dalam bidang perubatan dan menjana ekonomi negara. Maka kajian terhadap DNA belangkas dengan memencilkan mikrosatelit DNA perlu dilakukan terlebih dahulu sebelum kajian- kajian lanjut dijalankan.

Mikrosatelit DNA dapat didefinisikan sebagai elemen DNA yang terdiri daripada 15- 100 tandem yang berulang-ulang pada turutan DNA motif sama ada satu, dua atau tiga jujukan bes. Mikrosatelit DNA biasanya terletak secara rawak dan muncul secara spontan pada genom eukariot. Sebagai contoh,



5'AAAAAAAAAAAAAAAAA^{3'} atau 5'CACACACACACACACACACACA^{3'}.

Mikrosatelit biasanya mempunyai satu hingga enam pasang bes (bp) motif nukleotid dan berlaku dengan kadar jarak 7-10 kbp dalam genom eukariot. Mikrosatelit cenderung untuk menunjukkan tahap polimorfik yang sama tinggi berdasarkan jumlah ulangan yang sering berubah-ubah. Selain itu, ciri-ciri mikrosatelit yang kodominan dan melakukan pemilihan rawak menjadikan mikrosatelit sebagai penanda genetik yang baik. Namun, pemencilan mikrosatelit DNA bukanlah suatu perkara yang mudah kerana memerlukan kepakaran, perbelanjaan kos yang tinggi dan mengambil masa yang agak lama. Kaedah 5'anchored PCR yang telah diperkenalkan oleh Fisher *et al.*, (1996) dengan menggunakan primer 'degenerate' telah banyak membantu dalam pemencilan mikrosatelit DNA.

1.2 Objektif Kajian

- 1) Membangunkan kaedah yang sesuai untuk memencilkan mikrosatelit daripada belangkas dengan menggunakan teknik 5' anchored PCR.
- 2) Mengenalpasti mikrosatelit loci DNA berdasarkan jujukan DNA.
- 3) Mendapatkan nombor akses dari Gen Bank hasil daripada penjujukan DNA belangkas.

BAB 2

ULASAN RUJUKAN

2.1 Belangkas

Belangkas atau lebih dikenali dengan nama *horseshoe crab* merupakan haiwan yang telah wujud sejak zaman Cambrian iaitu 600 juta tahun yang lalu sehingga zaman Permian iaitu 280 juta tahun yang lalu (Miller dan Harley, 1994). Belangkas juga dikenali sebagai fosil yang masih hidup kerana telah berada di bumi sejak ratusan juta tahun yang lalu. Haiwan ini mungkin kelihatan seperti 'props' dalam filem Jurassic Park namun organisma ini telah wujud sebelum kewujudan dinasour. Sesetengah daripada haiwan yang berevolusi biasanya telah pupus sejak ratusan juta tahun yang lalu namun, belangkas masih wujud sehingga hari ini. Walaupun belangkas kelihatan seperti ketam, belangkas bukanlah tergolong dalam kelas Crustacean tetapi haiwan ini lebih berkait rapat dengan labah- labah dan kala jengking. Berdasarkan pengelasan taksonomi, belangkas terletak dalam filum Arthropoda dan tergolong dalam kelas Merostomata dan order Xiphosura. (Miller dan Harley, 1994).



Kini, hanya terdapat empat spesies belangkas yang masih wujud di dunia iaitu *Limulus polyphemus* yang terdapat di sekitar perairan Atlantik dan Gulf di Mexico, *Tachypleus tridentatus* yang banyak terdapat di sebelah barat dan selatan pantai Jepun, *Carcinossorpinus rotundicaudia* yang banyak dijumpai diperairan pantai barat Malaysia serta Thailand dan *Tachpleus gigas* yang banyak terdapat di perairan pantai timur dan barat semenanjung Malaysia, Singapura, India, Borneo dan Jawa.

Klasifikasi dalam Taksonomi (Miller dan Harley, 1994)

Kingdom	- Animalia
Filum	-Arthropod
Subfilum	- Chelicerata
Kelas	- Merostomata
Order	- Xiphosura

Genus dan spesies:

- *Limulus polyphemus*
- *Tachypleus tridentatus*
- *Carcinossorpinus rotundicaudia*
- *Tachpleus gigas*

Taburan belangkas adalah mengikut populasinya. Antaranya spesis belangkas yang dimaksudkan ialah *Limulus polyphemus* (1), yang biasanya dijumpai sepanjang pantai timur bagi Amerika Utara dan Amerika Tengah dan 3 spesis Indo-Pacific, *Tachypleus gigas* (4), *Tachypleus tridentatus* (3) and *Carcinoscorpius rotundicauda* (2). Keempat-empat spesis ini adalah sama dari segi ekologi, morfologi, dan serologi (Miller dan Harley, 1994). Rajah 2.1 dan jadual 2.1 menunjukkan spesis belangkas mengikut populasinya.



Rajah 2.1 Taburan populasi belangkas mengikut populasinya.

Jadual 2.1: Spesis belangkas serta populasi mengikut spesis belangkas.

(Lakshman dan Venkateshvaran, 1999)

Spesis	Kawasan
<i>Limulus polyphemus</i>	Terdapat di sekitar perairan Atlantik dan Teluk Mexico
<i>Tachypleus gigas</i>	Terdapat disepanjang perairan pantai timur dan barat semenanjung Malaysia, sekitar kawasan pantai barat Singapuraa dan sepanjang Pantai Orissa, (India) hingga kawasan Indo-China, Jawa (Indonesia), Borneo, Torres Straits dan Celebs.
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Merupakan salah satu spesis Asean yang banyak terdapat di sebelah barat dan selatan pantai Jepun. Terdapat juga disepanjang peraraian Vietnam, China, Taiwan, Filipina, Borneo Utara dan sebelah Sumatra di lautan India.
<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>	Sepsis ini telah dijumpai di sebelah pantai barat Malaysia, Thailand dan juga di Pantai timur Orissa, India.

Populasi belangkas yang terbesar terdapat di Teluk Delaware, Amerika Syarikat dan populasi ini didiami oleh spesis *Limulus polyphemus*. Secara umumnya, sejarah populasi ini mempengaruhi bentuk karekter spesis ini (Shuster, 1982b). Belangkas masih wujud hingga kini kerana mempunyai cengkerang yang berkeluk dan keras yang mana menyukarkan pemangsa untuk menterbalikkan mereka. Selain daripada itu, populasi belangkas masih terpelihara sehingga hari ini kerana haiwan ini boleh hidup setahun tanpa makanan dan boleh hidup dalam suhu yang ekstrem. Haiwan ini memainkan peranan yang penting dalam ekologi teluk dan dalam ubat-ubatan manusia. Selain daripada itu, telur belangkas merupakan makanan bagi burung penghijrah setiap musim luruh. Kompaun dalam darah belangkas digunakan dalam industri farmasi untuk mengkaji dadah 'intravenous', prostetik bagi bakteria.

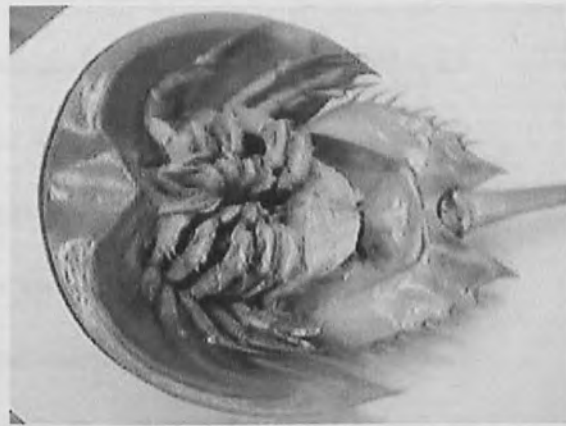
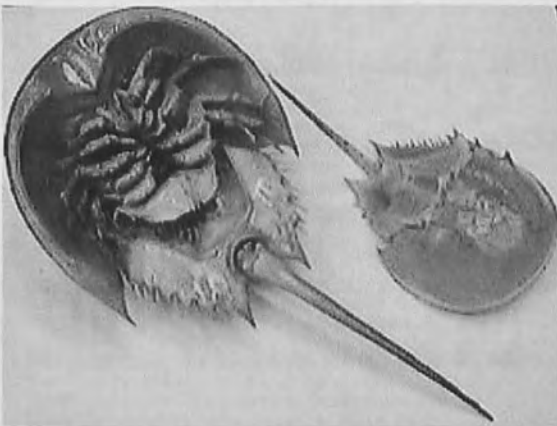
2.2 Kitar Hidup Belangkas

Kitar hidup belangkas sangat lambat dan tahap kematangan seks bagi belangkas adalah di antara 9 hingga 12 tahun. Kematangan seks ini dipengaruhi oleh jantina haiwan ini (Lakshman dan Venkateshvaran, 1999). Bagi belangkas jantan, tahap kematangan seks dicapai selepas 9 atau 10 tahun. Manakala bagi belangkas betina pula tahap kematangan seksnya dicapai selepas 10 atau 11 tahun. Belangkas jantan biasanya lebih kecil daripada belangkas betina. Belangkas betina boleh mencecah sehingga 60 cm panjang tetapi belangkas jantan berukuran lebih kecil daripada itu. Ketika belangkas masih hidup, warnanya kelihatan coklat kehijauan tetapi apabila belangkas mati warnanya kelihatan coklat tua. Jangka hayat bagi belangkas boleh mencecah sehingga 19 tahun. Salah satu sebab belangkas masih wujud setelah sekian lama adalah kerana sistem imunnya yang bagus



2.3 Fisiologi Belangkas

Jika dilihat daripada struktur belangkas yang mempunyai cengkerang yang keras dan ekor yang tajam, ramai yang beranggapan bahawa belangkas merupakan haiwan yang ganas dan berbahaya. Namun haiwan ini bukanlah seperti yang disangka. Ada sesetengah pihak yang menggelar haiwan ini sebagai 'man's best friend' iaitu kawan baik kepada manusia.



Rajah 2.2 Struktur belangkas

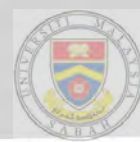
Bahagian badan belangkas terbahagi kepada tiga bahagian iaitu Prosoma (bahagian kepala), Opisthosoma (bahagian abdomen) dan Telson (bahagian ekor).

i. Prosoma (bahagian kepala)

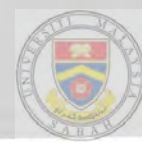
Bahagian kepala belangkas merupakan cengkerang yang keras atau lebih dikenali sebagai *caraspace* berfungsi bagi aktiviti menggali pasir dan tanah liat. *Caraspace* berfungsi untuk melindungi struktur di bahagian bawah yang mudah tercedera dan berfungsi sebagai penyambung kepada otot-otot. Selain daripada itu, *caraspace* juga memelihara agar badan belangkas sentiasa berada pada kedudukan tetap ketika air pasang (Sturtevant, 2002). Pada cengkerang ini terletak satu pasang mata untuk melihat dan mata tengah yang berfungsi sebagai reseptor cahaya. Terdapat lima pasang kaki pada bawah cengkerang ini dimana kaki ini bertindak bagi membantu pergerakan belangkas serta membantu dalam pemakanan dengan menghancurkan makanan terlebih dahulu sebelum membantu menolak ke dalam mulut yang terletak di tengah-tengah kaki (Shuster, 1982b). Secara amnya, pergerakan dan pemakanan adalah berhubungkait antara satu sama lain memandangkan haiwan ini hanya boleh makan hanya apabila ia bergerak. Belangkas merupakan haiwan omnivor yang biasanya menjadikan moluska dwicakerang yang kecil, cacing, ikan yang telah mati dan di sekitar habitat alga sebagai bahan makanannya.

RUJUKAN

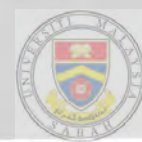
- Berkson J.M dan Shuster C. N. Jr. 1999. The Horseshoe Crab: The Battle Over a True Multiple Use Resource. *Fisheris* **24**(11): 6-10
- Birnboim, H, 1983. *A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA* .Method in Enzymology.
- Botton M.L., Loverland R.E., dan Jacobsen T.R., 1994 . Site Selection by Migratory Shore Birds in Dalware Bay, and its Relationship to Beach Characteristics and Abundance of Horseshoe Crab(*Limulus polyphemus*)egg.*Auk*, **111**: 605-616
- Brondani, R. P. V., Brondani, C dan Tarchini R., 1998. Development, Characterization and Mapping of Microsatellites Markers in *Eucalyptus grandis* and *E.urophylla*. *Theory Application Genetic* **97**,816-827
- Bryan, C. J., Collins, A. J. dan Stephenson, P., 1997. Isolation and Characterization of Microsatellites from Hexaploid Bread Wheat. *Theory Application Genetic* **94**, 557- 563.
- Clark K. 1996.Horseshoe Crab and the Shorebird Connection. pp.23-25 In: *Proceedings of the Horseshoecrab Forum: Status of the Resource*.(Farrell, J. dan C. Martin, Eds). Lewes,Delaware: University of Delaware Sea Grant Collage Program.
- Dale, J.W. dan Schantz, M.V., 2002. *From Gene to Genomes : Concepts and Application of DNA Technology*. John Wiley & Son, LTD, England.
- Echt, C.S. dan Mat, M.P., 1997. Survey of Microsatellite DNA in Pine. *Genome* **40**, 9-17



- Fisher P. J., Gardner R. C., dan Richardson T. E., Single Locus Microsatellite Isolated Using 5' Anchored PCR. *Nucleic Acids Research* **24**: 4369-4371
- Gupta, P.K. dan Varshney, R.K., 2000. The Development and Use of Microsatellite Markers for Genetic Analysis and Plant Breeding with Emphasis on Bread Wheat. *Euphytica* **113**, 163-185.
- Hartwell, L.H. *et al*, 2000. *Genetic from Genes to Genomes*. Mc Graw Hill, United State of America.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. dan White, T.J., 1990. *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, United Kingdom.
- Invitrogen, 2003. TOPO TA Cloning® Instruction Manual.
- Kashi, Y., King, D. dan Soller, M., 1997. Simple Sequence Repeats as Source Quantitative Genetic Variation. *Trends in Genetics* **13**: 74-78
- Kayang B.B., Inoue- Murayama M., Nomura A., Kimura k., Takahashi H., Mizutani M., dan Ito S., 2000. Fifty microsatellite for Japanese quail. *The Journal of Heridity* **91(16)**:502-505.
- King, D. G., 1994. Triple repeat DNA as a Highly Mutable Regulatory System. *Sciences* **263**: 596-606
- Kumar S.V., Tan S.G, Quah S. C., dan Yusoff K., 2002. Isolation of Microsatellite Markers in Mungbean, *Vigna radiata*. *Molecular Ecology Notes* **2**: 96-98.
- Lakshmanan, R. dan Venkateshvaran, K., 1999. Biomedical Potential of the Indian Horseshoe Crab. *Infofish* **1**: 46-48
- Lewis, R., 1998. *Life. 3rd Edition*. Mc Graw Hill. United State of America.



- MacHugh D. E., Shiver M. D., Loftus R. T., Cunningham P., dan Batadley D.G., 1997. Microsatellite DNA Variation and Evolution, Domestication and Phylogeography of Teurine and Zebu Cattle (*Bos Taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* **146**: 1071- 1086.
- McConnell S., Hamilton L., Morris D., Cook D., Paquet d., Bentqen P. dan Wright J. M., 1995. Isolation of Salmonid Microsatellite Loci and Their Application to the Population Genetics of Canadian East Coast Stocks of Atlantic Salmon. *Aquaculture* **137**: 19-30.
- Mertens, T.R dan Hammersmith, R. L. 1998. Amplification of DNA Polymorphism by Polymerase Chain Reaction (PCR) in *Genetic Laboratory Investigations*. 11th 171-173. Prentice Hall Upper Saddler River, New Jersey.
- Mikkelsen T. 1988. *The Secret in Blue Blood*. Science Press, United Stated of America.
- Miller, S.A. and Harley, J. P., 1994. *Zoology*. Second Edition. Wm. C. Brown Publishers, United Stated of America.
- Novitsky, T.J. 1984. Discovery to Commercialization: The Blood of the Horseshoe Crab. *Oceanus*, **27**, 13-18
- Ritschel, P.S. dan Ferreira, M.E. 2004. Development and Microsatellite Markers from an Enriched Genomic Library for Genetic Analysis of Melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology* **4** (9), 1471-2229
- Rosenberg, I.M., 1996. *Protein Analysis and Purification (BenchtoTechniques)* Birkhauser, Boston.
- Russell, P.J., 1998. *Genetics*. Fifth Edition. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., United Stated of America.



- Sambrook, J., Fritish, E. F., dan Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saunders N. C., Kessler L. G., dan Avise J. C., 1986. Genetic Variation and Genetic Differentiation in Mitochondrial DNA of the Horseshoe Crab. *Limulus Polyphemus*. *Genetics*, **112**: 613-627.
- Scopes, R. K., 1994. *Protein Purification: Principle and Practice*, 3rd Edition. Springer-Verlag Company, Inc., New York.
- Sekiguchi K., 1998. *Biology of Horseshoe Crabs*. Science House Co., Ltd., United State of America.
- Shuster C.N., Jr. 1982a. Xiphosurida. p.p. 766-770 In: *Encyclopedia of Science and Technology*. McGraw- Hill
- Shuster C.N., Jr. 1982b. A Pictorial Review of the Natural History and Ecology of the Horseshoe Crab, *Limulus Polyphemus*, with References to Their Limulidae. p.p. 1-52 In: *Physiology and Biology of Horseshoe Crabs: Studies on Normal and Environmentally Stressed Animals*. (Bonaventura, and S. Tesh, Eds) Alan R. Liss, Inc New York
- Sinden, R.R., 1994. *DNA Structure and Function*. Academic Press, United Kingdom.
- Slatkin, M., 1995. Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics* **139**, 457-462
- Takahashi H., Nirasawa K., dan Furukawa T., 1996. An Efficient Method to Clone Microsatellite Repeat Sequence. *Jpn Poult Sci* **33**: 292-299.
- Tautz D dan Renz M, 1984. Simple Sequences are Ubiquitous Repetitive Components of Eukaryotic Genomes. *Nucleic Acids Tres* **17**: 4127-4138



- Temnych, S., Declerk, G. dan Lukashova, A., 2001. Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (*Oryza sativa L.*): Frequency, Length Variation, Transportation Associations and Genetic Marker Potential. *Genome Research* **11**, 1441-1452.
- Vaiman, D., Mercier, D. dan Eggen, A., 1994. A Set of 99 Cattle Microsatellite: Characterization, Syteny Mapping and Polymorphism. *Mammalian Genome* **5**, 288-297.
- Walls E. A., dan Berkson J., 2003. Effects of Blood Extraction on Horseshoe Crab (*Limulus polyphemus*). *Fish* **101**: 457-459
- Wright J. M., dan Bentzen P., 1994. Microsatellite: Genetic Markers for the Future. *Fish* **4**: 384-388.
- Young, E. T., Sloan, J.S. dan Van Riper, K., 2000. Trinucleotida Repeats are Clustered in Regulatory Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**, 1053-1068
- Zhu, Y., Strassmann, J.E. dan Queller, D.C., 2000. Insertions, Substitution and the Origin and the Microsatellites. *Cambridge University Press*, 227-236.