

**KEPEKATAN KANDUNGAN ENZIM LUSIFERASE DAN MORFOMETRIK  
ORGAN CAHAYA KELIP-KELIP, *Pteroptyx tener* (COLEPTERA: LAMPYRIDAE)  
SPESIES JANTAN DAN BETINA**

[LUCIFERASE ENZYME CONCENTRATION AND MORPHOMETRIC OF THE LIGHT ORGAN OF MALE  
AND FEMALE *Pteroptyx tener* (COLEOPTERA: LAMPYRIDAE)]

**Nur Khairunnisa Salleh<sup>1</sup>, Muhammad Afiq Senen<sup>1</sup>,  
Norela Sulaiman<sup>1,2</sup> & Nurul Wahida Othman<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Pusat Sistematiik Serangga,  
Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi,  
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,  
43600 Bangi, Selangor, Malaysia.  
<sup>2</sup>Pusat Penyelidikan Bukit Fraser,  
Fakulti Sains dan Teknologi,  
Universiti Kebangsaan Malaysia,  
43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

\*Email pengarang berutisan: [wahida@ukm.edu.my](mailto:wahida@ukm.edu.my)

Penghantaran: 15 Jun 2022; Penerimaan: 26 September 2022

**ABSTRAK**

Kelip-kelip spesies *Pteroptyx tener* (Coleoptera: Lampyridae) menjadi daya tarikan utama dalam industri eko-pelancongan di Malaysia kerana hanya spesies kelip-kelip ini mampu menghasilkan kerlipan cahaya secara serentak dan berkumpulan. Kerlipan cahaya ini terhasil dari tindakan biokimia enzim lusiferase pada organ cahaya yang terletak di bahagian abdomen, di mana individu jantan menghasilkan cahaya lebih terang berbanding individu betina. Namun, kandungan enzim lusiferase yang terlibat dalam penghasilan cahaya ini tidak pernah dilaporkan ke atas spesies ini. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk menentukan kandungan enzim lusiferase pada organ cahaya kelip-kelip spesies jantan dan betina *P. tener*. Pengukuran morfometrik organ cahaya turut dilakukan untuk melihat perbezaan dan persamaan di antara morfologi organ cahaya jantan dan betina *P. tener*. Sebanyak 10 individu kelip-kelip *P. tener* jantan dan betina telah disampel dari Kampung Kuantan, Kuala Selangor, Malaysia. Hanya bahagian abdomen telah diambil bagi mengukur kuantiti enzim lusiferase yang ditentukan dengan melakukan ujian Asai Imunoerap Terangkai Enzim (ELISA). Kandungan kepekatan enzim lusiferase pada individu jantan didapati lebih tinggi dan menunjukkan perbezaan signifikan ( $P < 0.05$ ) iaitu  $6.03 \pm 0.48$  ng/mL ( $n=10$ ) berbanding spesies betina iaitu sebanyak  $2.94 \pm 0.27$  ng/ml ( $n=10$ ). Perbezaan perimeter organ cahaya spesies jantan lebih besar dan menunjukkan perbezaan signifikan ( $P < 0.05$ ) iaitu  $5.85 \pm 0.44$  mm ( $n=20$ ) berbanding spesies betina iaitu  $3.52 \pm 0.37$  mm ( $n=20$ ). Hasil kajian ini menunjukkan saiz organ yang lebih besar pada kelip-kelip jantan mengandungi kepekatan enzim lusiferase yang lebih tinggi berbanding kelip-kelip betina yang seterusnya menyumbang kepada perbezaan cahaya yang lebih terang pada individu jantan. Maklumat ini boleh digunakan bagi mempromosikan keunikan kumbang ini pada industri eko-pelancongan kelip-kelip.

**Kekunci:** Enzim, kerlipan cahaya serentak, lusiferase, organ cahaya

### ABSTRACT

*Pteroptyx tener* (Coleoptera: Lampyridae) has become the main attraction of the firefly ecotourism industry as only this species is able to produce perfect synchronize flashing in group in Malaysia. The lights produced was the result of a biochemical reaction of the luciferase enzyme in the light organ located at the ventral abdomen with males producing brighter flashing compared to females. This is due to males having larger light organs with thicker photogenic and reflector layer relative to females. The concentration of luciferase enzymes involved in the production of bioluminescence has never been reported for this species. Therefore, this study aims to determine the concentration of the luciferase enzyme in the light organs of *P. tener* male and female. Morphometric measurement of the light organ where luciferase enzyme was present was also done to see the differences and similarities between the morphology of the light organ of male and female *P. tener*. A total of 10 individuals *P. tener* male and female were collected from Kampung Kuantan, Selangor, Malaysia. Only the abdomen was taken and the quantification of the luciferase enzyme was determined by performing the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test. The concentration of luciferase enzyme found in male was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of female which was  $6.03 \pm 0.48$  ng/mL ( $n=10$ ) in male and  $2.94 \pm 0.27$  ng/mL ( $n=10$ ) in female. Perimeter size of the male light organ was  $5.85 \pm 0.44$  mm ( $n=10$ ) and significantly larger ( $P < 0.05$ ) than perimeter size of female light organ  $3.52 \pm 0.37$  mm ( $n=10$ ). The results of this study indicates that the larger organ size in male fireflies contains a higher concentration of luciferase enzyme compared to female fireflies that contributes to more intense illumination in male individuals. This information can be used to promote the uniqueness of this beetle in the firefly eco-tourism industry.

**Keywords:** Enzyme, luciferase, synchronize flashing, light organ

### PENGENALAN

Kelip-kelip spesies *Pteroptyx tener* sangat unik kerana berkebolehan menghasilkan cahaya secara serentak atau bersinkroni. Cahaya ini terhasil melalui pantulan pada organ cahaya setelah tenaga cahaya dihasilkan melalui tindakan biokimia enzim lusiferase yang terdapat pada organ cahaya ini (Buck 1988). Fungsi utama cahaya ini dihasilkan oleh kelip-kelip dewasa, spesies jantan dan betina yang sering dikaitkan dengan isyarat untuk mencari pasangan mengawan (Lloyd 1971; Papi 1969). Jantina kelip-kelip spesies ini dapat dibezakan dengan memerhatikan struktur organ cahaya yang terdapat pada bahagian ventral abdomen. Organ cahaya kelip-kelip jantan terletak di dua segmen iaitu pada keseluruhan segmen keenam dan pada hujung ventral kiri dan kanan segmen abdomen ketujuh (Ballantyne & Menayah 2000; Nur Khairunnisa et al. 2019). Organ cahaya kelip-kelip betina pula terdapat hanya pada segmen keenam sahaja. Oleh itu, kerlipan cahaya oleh kelip-kelip jantan boleh dikatakan lebih terang berbanding kerlipan kelip-kelip betina kerana perbezaan saiz yang ada. Namun, jumlah enzim lusiferase yang terlibat bagi menghasilkan cahaya yang terang pada kelip-kelip jantan dan betina masih belum pernah dilaporkan.

Aktiviti penghasilan tenaga cahaya ini berlaku di lapisan fotogenik pada organ cahaya *P. tener* yang majoritinya terdiri daripada sel fotosit yang tersusun secara roset (Nur Khairunnisa Salleh et al. 2019). Tenaga cahaya di lapisan ini terhasil melalui beberapa siri tindakan biokimia oleh sebatian lusiferin dan enzim lusiferase bersama oksigen serta beberapa substrat lain yang kemudiannya menghasilkan cahaya biopendarkilau. Enzim lusiferase bertindak sebagai pemangkin pengoksidaan lusiferin. Dalam beberapa organisma, reaksi kimia

ini memerlukan bantuan faktor lain seperti kalsium, magnesium atau tenaga adenosina trifosfat (ATP) (McElroy et al. 1969; Seliger et al. 1961). Reaksi biokimia tersebut kemudian menghasilkan produk iaitu oksilusiferin yang merupakan penghasil cahaya (Gandelman et al. 1993; Ugarova 2008). Kecerahan cahaya ini dibantu oleh kehadiran lapisan pemantul cahaya pada organ cahaya kelip-kelip *P. tener* yang tidak terlibat dalam aktiviti biokimia penghasilan tenaga cahaya namun membantu menyerlahkan lagi sinarnya dengan memantulkan cahaya yang terhasil.

Maklumat fisiologi organ cahaya kelip-kelip adalah sangat kurang terutamanya mengenai kuantiti enzim lusiferase pada organ ini. Hanya satu kajian mengenai kepekatan enzim lusiferase pada organ cahaya kelip-kelip yang ditemui. Kajian tersebut dilakukan pada spesies *Photuris pennsylvanica* (Strause et al. 1979). Sehingga kini masih belum ada kajian mengenai kepekatan enzim ini dijalankan pada organ cahaya yang menghasilkan kerlipan serentak terutama pada organ cahaya *P. tener*. Kebanyakan kajian terdahulu lebih tertumpu pada morfologi dan histologi organ cahaya kelip-kelip bagi *P. tener* (Nur Khairunnisa Salleh 2019) dan pada spesies kelip-kelip Amerika daripada genus *Photuris* dan *Photinus* (Buck 1948; Peterson 1970; Peterson & Buck 1968; Strause et al. 1979).

Maklumat mengenai kepekatan enzim lusiferase dan kajian morfometrik pada organ cahaya *P. tener* ini diperlukan sebagai maklumat asas untuk pemahaman proses penghasilan cahaya yang berbeza di antara jantan dan betina. Selain itu, maklumat mengenai enzim lusiferase adalah penting sebagai rujukan untuk memahami tindak balas kimia biopendarkilau serentak pada spesies ini. Oleh itu kajian ini akan menentukan kepekatan enzim lusiferase serta membandingkan morfometrik organ cahaya kelip-kelip jantan dan betina *P. tener* yang menyumbang kepada penghasilan cahaya berbeza bagi spesies ini.

## BAHAN DAN KAEDAH

### Penentuan Kandungan Enzim Lusiferase Pada Organ Cahaya *P. tener*

Kepekatan enzim lusiferase pada organ cahaya *P. tener* jantan dan betina ditentukan dengan melakukan ujian Asai Imunoserap Terangkai Enzim (ELISA). Ujian ELISA adalah kaedah yang digunakan mengesan dan mengukur protein spesifik. Ujian dijalankan merujuk Engvall et al. (1971) dengan sampel protein dianalisis di dalam lekuk piring mikrotiter dengan menggunakan antibodi yang spesifik. Antibodi berantigen spesifik ini akan mengenal pasti molekul individu yang terdapat di dalam larutan protein kompleks atau dalam tisu sampel. Ujian ELISA dilakukan dengan menggunakan kit *ELISA MaxDiscovery™* (Bioo Scientific no. katalog: 3420-02) menggunakan antigen lusiferase.

Sebanyak 10 individu jantan dan 10 ekor individu betina kelip-kelip *P. tener* yang disampel secara rawak dari Kampung Kuantan, Selangor, Malaysia telah digunakan untuk kajian penentuan kandungan enzim lusiferase. Kelip-kelip ditangkap menggunakan jaring sapuan pada pokok berembang pada pukul 1930-2000. Spesimen kelip-kelip kemudian dimasukkan ke dalam sangkar serangga yang diperbuat daripada jaring untuk tujuan ventilasi. Spesies ini dicamkan berdasarkan ciri morfologi (Ballantyne & Menayah 2000). Abdomen dipisahkan daripada badan seterusnya spesimen dan ditimbang sebelum dimasukkan ke dalam tiub mikrotiter. Pembedahan dilakukan di atas ais untuk mengelakkan tisu daripada rosak.

### Kaedah Pengekstrakan Protein

Proses lisis tisu dilakukan untuk mendapatkan ekstrak protein tulen daripada organ cahaya *P. tener*. Proses ini dimulakan dengan menambah sebanyak 150 µl larutan penimbal lisis pada setiap tiub mikrotiter yang terdapat tisu sampel. Kemudian tisu dikisar dengan menggunakan

penghomogen mikro. Selepas itu, tisu dibekukan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  selama 30 minit. Sampel tisu kemudian dicairkan pada suhu bilik sebelum diemparkan dengan kelajuan 14 000 rpm selama 10 minit untuk memisahkan supernatan daripada bahan-bahan lain. Larutan supernatan dipindahkan ke dalam tiub mikrotiter yang baru dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  sehingga digunakan untuk proses seterusnya.

### Penentuan Kepekatan Protein

Kepekatan dan amaun protein yang diekstrak daripada setiap sampel ditentukan dengan kaedah asai Bradford (1976). Kit Asai Bradford daripada *MaxDiscovery* (Bioo Scientific no. katalog: 3440-01) digunakan untuk menentukan kepekatan protein dengan berdasarkan perubahan warna daripada perang kepada warna biru mengikut kepekatan protein. Sebanyak 20  $\mu\text{l}$  bagi setiap larutan piawai bradford dimasukkan ke dalam lekuk piring mikrotiter mengikut urutan kepekatan rendah sehingga kepekatan tinggi iaitu 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kemudian 20  $\mu\text{l}$  supernatan sampel yang telah dicairkan dipipet masuk ke dalam lekuk lain yang terdapat pada piring mikrotiter. Supernatan sampel dicairkan dengan menggunakan pencair Bradford dengan nisbah 1:50.

Larutan reagen pewarna Bradford sebanyak 200  $\mu\text{l}$  dipipet masuk ke dalam setiap lekuk yang mengandungi larutan piawai dan sampel. Piring mikrotiter kemudian diletakkan pada mesin pencampur untuk memastikan larutan reagen pewarna Bradford bercampur sepenuhnya dengan larutan piawai dan sampel. Piring mikrotiter kemudian ditutup dengan kerajang aluminium selama dua minit pada suhu bilik. Bacaan kadar serapan kemudian direkodkan dengan mesin pembaca mikrotiter pada jarak gelombang 595nm. Bacaan yang diperolehi menghasilkan satu graf lengkungan normal piawai Bradford untuk mendapatkan persamaan yang digunakan untuk menentukan jumlah kepekatan protein sampel. Jumlah kepekatan protein ditentukan dengan persamaan di bawah:

$$x = \frac{\left[\frac{y - b}{m}\right]}{z}$$

b = Pintasan paksi y pada lengkungan piawai

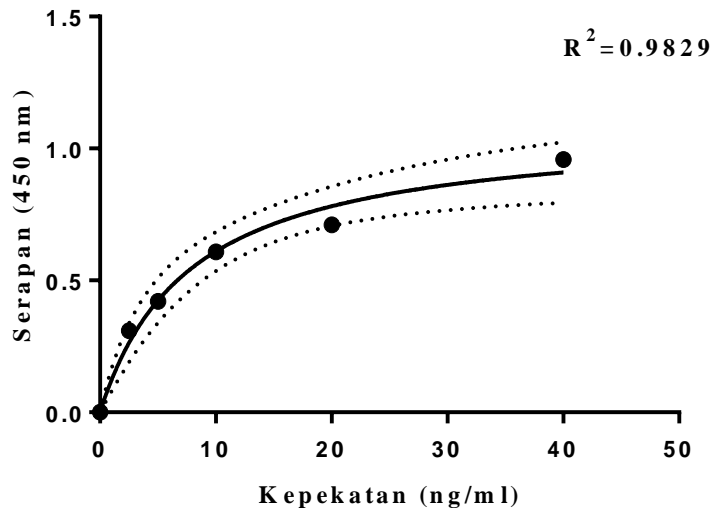
m = Cerun lengkungan piawai

x = Jumlah kepekatan protein

y = Kadar serapan sampel pada jarak gelombang 595 nm

z = Faktor pencairan

Hasil daripada jumlah kepekatan protein yang diperolehi, kepekatan protein sampel kemudian dinormalkan kepada 1.0-3.0  $\text{mg}/\text{mL}$  dengan menambah larutan penimbang sampel lisis. Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  setiap sampel yang telah dinormalkan digunakan untuk ujian ELISA untuk menentukan jumlah enzim lusiferase. Kepekatan protein dibaca berdasarkan graf lengkung piawai yang terhasil mengikut piawaian kit ELISA yang digunakan (Rajah 1).



Rajah 1. Lengkok piawai kepekatan enzim lusiferase

### Protokol Ujian ELISA

Larutan penimbal, larutan piawai dan sampel di biarkan pada suhu bilik selama 30 minit terlebih dahulu sebelum ujian ELISA dijalankan. Sebanyak 100  $\mu$ l bagi setiap larutan piawai lusiferase dimasukkan ke dalam lekuk piring mikrotiter mengikut urutan kepekatan rendah sehingga kepekatan tinggi iaitu daripada larutan kawalan negatif, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL dan 40 mg/mL. Kemudian 100  $\mu$ l sampel dipipet masuk ke dalam lekuk mikrotiter yang kosong. Piring mikrotiter kemudian ditutup dengan kerajang aluminium dan dibiarkan selama satu jam pada suhu 37°C. Setelah itu, semua larutan yang terdapat di dalam lekuk mikrotiter dibuang dan kemudian dibilas dengan 250  $\mu$ l larutan pembilas yang diisi pada setiap lekuk mikrotiter dan dibiarkan selama seminit sebelum dibuang. Langkah bilasan ini diulang sebanyak lima kali.

Larutan konjugat Antibodi-HRP sebanyak 100  $\mu$ l dipipet masuk ke dalam setiap lekuk dan piring mikrotiter kemudian ditutup semula dengan kerajang aluminium selama satu jam pada suhu 37°C. Selepas itu, larutan tersebut dibuang dan setiap lekuk dibilas sebanyak lima kali. Setiap bilasan dilakukan dengan sebanyak 250  $\mu$ l larutan pembilas dipipet masuk ke dalam setiap lekuk dan dibiarkan selama seminit. Setelah dibilas, 100  $\mu$ l TMB substrat dipipetkan ke dalam lekuk piring mikrotiter dan kemudian dieram selama 25 minit. Proses ini, dilakukan di dalam bilik yang gelap atau kawasan yang terlindung daripada sumber cahaya kerana larutan substrat ini sensitif kepada cahaya. Seterusnya, 100  $\mu$ l larutan pemberhenti dimasukkan ke dalam setiap lekuk piring mikrotiter untuk memberhentikan reaksi enzim. Kadar bacaan serapan larutan ditentukan dengan mesin pembaca mikrotiter pada jarak gelombang 450 nm.

### Analisis Statistik Data

Analisis data pengkuantitian enzim lusiferase dalam sampel ditentukan berdasarkan kadar serapan piawai yang digunakan. Graf lekuk piawai diplot berdasarkan kadar serapan piawai dengan kepekatan berlainan untuk mendapatkan persamaan garis lurus lekuk piawai. Kepekatan enzim lusiferase pada organ cahaya ditentukan dengan menggunakan persamaan tersebut:

$$x = \frac{(y - b)}{m}$$

b= Pintasan paksi y pada lengkungan piawai

m= Cerun lengkungan piawai

x = Jumlah kepekatan protein

y = Kadar serapan sampel pada jarak gelombang 450 nm

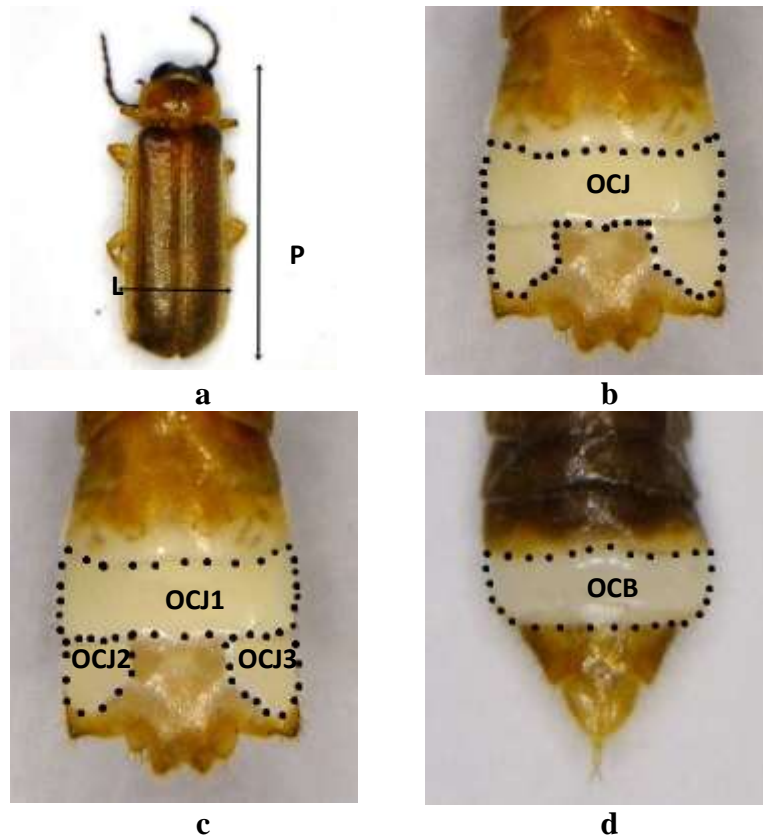
Analisis statistik kemudian dilakukan dengan menggunakan perisian Minitab versi 18 . Ujian statistik yang dijalankan adalah Ujian-T tidak bersandar untuk melihat perbezaan antara kepekatan lusiferase yang terdapat pada organ cahaya *P. tener* jantan (N=20) dan betina (N=20).

### Morfometrik Organ Cahaya *P. tener*

Pemerhatian dilakukan terhadap 20 individu jantan dan 20 individu betina untuk melihat perbezaan dan persamaan di antara morfologi organ cahaya kelip-kelip jantan dan betina *P. tener*. Pencerapan morfologi luaran organ cahaya dilakukan dengan menggunakan mikroskop digital dan mikroskop pengimbas elektron (SEM). Bahagian sayap dan kaki kelip-kelip dipotong terlebih dahulu bagi memudahkan pencerapan, Spesimen disimpan di dalam alkohol 70% untuk tujuan pengawetan. Ciri morfologi yang dicerap adalah warna, kedudukan dan perimeter organ cahaya tersebut.

Pencerapan morfologi kasar organ cahaya *P. tener* dilakukan melalui Mikroskop Digital *Dino-Lite Edge AM4815* yang bersambung dengan komputer manakala gambar dan proses pengukuran sampel diambil menggunakan perisian *Dino Capture 2.0*. Jadual 1 menunjukkan ukuran morfometrik yang diambil manakala Rajah 1 menunjukkan perimeter organ cahaya individu jantan dan individu betina yang diukur untuk mendapatkan saiz organ cahaya.

Singkatan	Ukuran morfometrik yang diambil Parameter
L	Lebar badan. Ukuran diambil pada bahagian badan yang paling lebar
P	Panjang badan. Ukuran diambil daripada hujung kepala sehingga hujung elitra
LA	Lebar abdomen
PA	Panjang abdomen
OCJ	Perimeter keseluruhan organ cahaya jantan
OCJ1	Perimeter organ cahaya jantan pada sternit keenam
OCJ2	Perimeter tompok organ cahaya jantan pada bahagian kiri ventral sternit ketujuh
OCJ3	Perimeter tompok organ cahaya jantan pada bahagian kanan ventral sternit ketujuh
OCB	Perimeter keseluruhan organ cahaya betina



Rajah 1 Ukuran parameter yang diambil. a, panjang (P) badan dan lebar (L); b, perimeter keseluruhan organ cahaya jantan; c, ukuran perimeter organ cahaya pada segmen abdomen keenam dan ketujuh jantan; d, ukuran perimeter organ cahaya betina

Sampel kemudian diceraup menggunakan mikroskop pengimbas elektron *tabletop TM-1000* (SEM) untuk pemerhatian morfologi luar organ cahaya pada pembesaran yang lebih tinggi. SEM membenarkan visualisasi perincian struktur halus yang tidak dapat dilihat menggunakan mikroskop digital. Spesimen yang telah diproses diperhatikan dan foto direkodkan untuk pemerhatian selanjutnya. Setiap pengukuran dilakukan menggunakan perisian *ImageJ v.152h*.

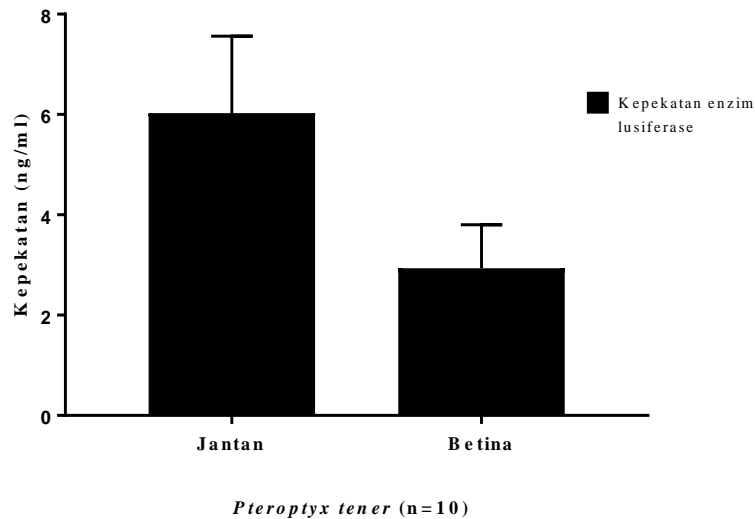
### Analisis Statistik Data

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perisian Minitab versi 18. Ujian statistik yang dijalankan adalah Ujian-T untuk melihat perbezaan ukuran di antara individu jantan dan individu betina (N=40). Selain itu, ujian korelasi Pearson juga dijalankan untuk melihat korelasi saiz organ cahaya dengan ukuran morfometrik yang lain.

## HASIL DAN PERBINCANGAN

### Kepekatan Enzim Lusiferase Organ Cahaya

Kepekatan enzim lusiferase yang terdapat dalam organ cahaya *P. tener* jantan dan betina adalah berbeza. Kepekatan enzim lusiferase yang terdapat dalam *P. tener* jantan adalah signifikan lebih tinggi ( $P < 0.05$ ) berbanding betina (Rajah 2) iaitu pada jantan yang mempunyai purata berat abdomen  $4.31 \pm 0.93$  mg (n=10), kepekataannya adalah  $6.03 \pm 0.48$  ng/mL (n=10) manakala pada *P. tener* betina yang mempunyai purata berat abdomen  $4.01 \pm 0.251$  mg (n=10) pula kepekataannya adalah  $2.94 \pm 0.27$  ng/ml (n=10).



Rajah 2 Purata kepekatan enzim lusiferase kelip-kelip *P. tener* jantan dan betina

Perbezaan kepekatan yang signifikan tersebut mungkin disumbang oleh faktor jumlah sel fotosit dan saiz organ cahaya yang jelas berbeza di antara jantan dan betina. Pemerhatian ke atas ultrastruktur organ cahaya *P. tener* menunjukkan bahawa organ cahaya kelip-kelip jantan adalah lebih besar kerana terdapat dua segmen abdomen, manakala organ cahaya kelip-kelip betina pula hanya diwakili oleh satu segmen abdomen sahaja (Nur Khairunnisa Salleh et al. 2019). Nur Khairunnisa et al. (2019) turut melaporkan kelip-kelip jantan mempunyai bilangan fotosit lebih banyak berbanding betina turut menyumbang kepada jumlah enzim yang banyak. Kandungan sitoplasma sel fotogenik ini dilaporkan mempunyai kandungan enzim lusiferase yang tinggi melalui kepekatan warna kromogen 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) yang terang pada kawasan ini berbanding struktur lain yang terdapat pada lapisan fotogenik ini melalui kajian immunohistologi terhadap lapisan ini (Nur Khairunnisa Salleh et al. 2016). Pewarnaan DAB yang lebih pekat menunjukkan kehadiran enzim yang tinggi bergantung kepada kuantiti sel fotosit yang ada di lapisan fotogenik kelip-kelip tersebut. Oleh itu, dapat disimpulkan juga bahawa kandungan enzim lusiferase yang tinggi adalah berasal daripada kawasan ini.

Perbezaan kuantiti enzim lusiferase dalam organ cahaya individu jantan dan betina menyumbang kepada perbezaan kualiti biopendarkilau yang terhasil. Case (1980) mendapati *P. tener* jantan yang berkelip secara serentak mempunyai ritma yang tetap dan pantas (0.37 kerlipan/ saat) berbanding betina (satu kerlipan/saat) yang tidak beritma dan lebih perlahan (Case 1980; Fatimah & Norela 2016). Tempoh kerlipan cahaya oleh individu jantan yang lebih pendek menghasilkan kerlipan cahaya yang lebih banyak berbanding individu betina. Menurut Case (1980) kerlipan yang dihasilkan oleh *P. tener* betina adalah lebih pudar berbanding kerlipan jantan. Perbezaan ini mungkin disebabkan oleh kuantiti enzim lusiferase yang lebih rendah berbanding kepekatan enzim lusiferase yang terdapat pada *P. tener* jantan.

Berdasarkan hasil yang didapati, mekanisme penghasilan cahaya serentak oleh *P. tener* jantan mungkin memerlukan kuantiti enzim lusiferase yang tinggi. Selain daripada kepekatan enzim yang lebih rendah pada *P. tener* betina yang tidak menghasilkan kerlipan cahaya secara serentak, hasil kajian kelip-kelip Amerika daripada spesies *Photuris pennsylvanica* yang turut tidak berkelip secara serentak juga mempunyai kepekatan enzim lusiferase yang lebih rendah berbanding kepekatan enzim lusiferase *Pteroptyx tener* jantan (Strause et al. 1979). Kajian tersebut, mendapati bahawa kepekatan enzim lusiferase bagi kelip-kelip *Photuris*

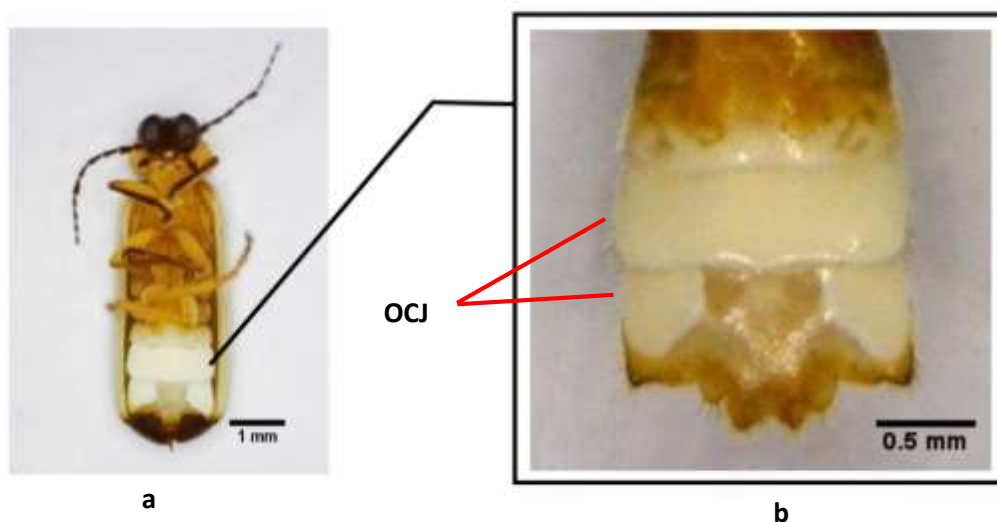


*pennsylvanica* dewasa jantan yang mempunyai abdomen bersaiz lebih besar (diameter = 15 mm; berat abdomen 10 mg) dari *Pteroptyx tener* adalah 5.58 ng/mL. Selain itu, larva instar keempat *Photuris pennsylvanica* yang menghasilkan cahaya secara bersinar mempunyai kepekatan enzim lusiferase yang lebih rendah berbanding *Photuris pennsylvanica* dewasa. Kepekatan enzim lusiferase bagi larva *Photuris pennsylvanica* adalah 0.66 ng/mL. Hasil ini mencadangkan bahawa perbezaan kepekatan enzim lusiferase yang terdapat di antara spesies dan tahap hidup kelip-kelip adalah antara faktor yang menyumbang kepada perbezaan kualiti penghasilan cahaya.

Berdasarkan hasil kajian ini, perbezaan kepekatan enzim mungkin bergantung kepada ketebalan lapisan fotosit itu sendiri. Organ cahaya individu jantan merangkumi dua segmen abdomen iaitu abdomen segmen keenam dan ketujuh manakala organ cahaya betina pula hanya pada segmen abdomen keenam sahaja. Struktur organ kelip-kelip dikenalpasti mempunyai dua lapisan utama iaitu lapisan fotogenik dan lapisan dorsal (Nur Khairunnisa Salleh et al. 2019). Kajian yang dijalankan oleh Aprille et al. (2004) mendapati lapisan fotogenik merupakan lapisan penghasilan cahaya manakala Goh et al. (2013) menunjukkan lapisan dorsal bertindak sebagai pemantul bagi cahaya serta meningkatkan kecerahan cahaya yang dihasilkan. Lapisan fotogenik terdiri daripada beberapa unsur utama iaitu fotosit, silinder dan trakea. Granul fotosit dikenalpasti sebagai tempat penghasilan cahaya (Yasutake et al. 1963). Hal ini kerana enzim lusiferase banyak didapati di sel fotosit. Kajian yang dijalankan oleh Nur Khairunnisa Salleh et al. (2019) menggunakan mikroskop transmisi elektron juga mendapati lapisan fotogenik ini memiliki jumlah mitokondria yang banyak dan ini dapat disimpulkan ketebalan lapisan fotosit pada kelip-kelip individu jantan menyumbang kepada kepekatan enzim lusiferase yang lebih tinggi.

### Morfometrik Luaran Organ Cahaya *Pteroptyx tener* Jantan dan Betina

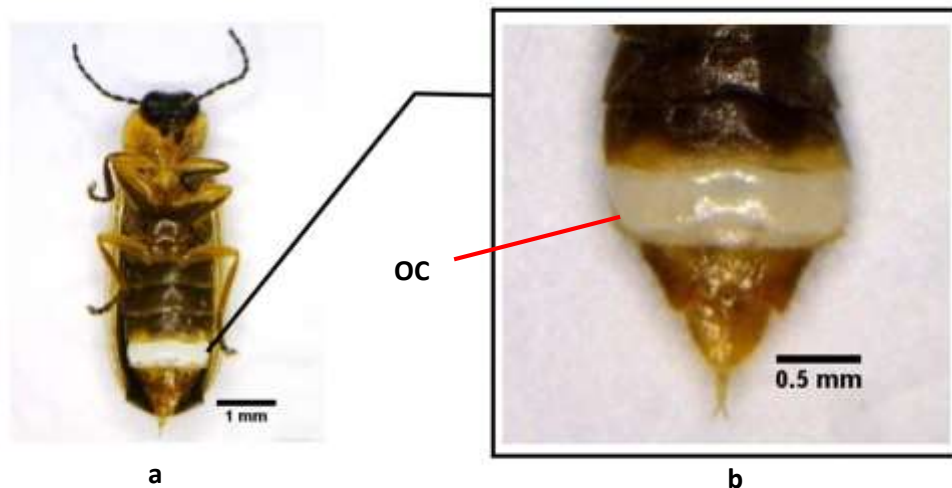
*Pteroptyx tener* jantan mempunyai organ cahaya (OCJ) yang berwarna putih kekuningan yang terletak pada sternit keenam dan ketujuh (Rajah 3a & b). Susunan organ cahaya pada sternit keenam (OCJ1) adalah berbeza berbanding organ cahaya pada sternit ketujuh (OCJ2) iaitu OCJ1 lebih besar kerana ia meliputi keseluruhan sternit tersebut manakala OCJ2 adalah bipartit iaitu sepasang organ cahaya yang masing-masing terletak pada bahagian sisi kiri (OCJ2) dan kanan (OCJ3) sternit.



Rajah 3. *Pteroptyx tener* jantan. a, pandangan ventral jantan yang menunjukkan kedudukan organ cahaya; b, organ cahaya jantan. OCJ, organ cahaya jantan

Posisi dan susunan organ cahaya *P. tener* jantan adalah sama dengan *Pteroptyx* jantan yang lain iaitu meliputi keseluruhan sternit keenam dan bipartit pada sternit ketujuh seperti yang pernah dilaporkan oleh Ballantyne dan McLean (1970), Ballantyne (1987) dan Ballantyne dan Lambkin (2013). Genus lain yang turut mempunyai posisi dan susunan organ cahaya yang sama seperti *P. tener* jantan adalah kelip-kelip jantan daripada genus *Phyrophanes*, *Colophotia*, *Poloninius* dan *Trisinuata* (Ballantyne & Lambkin 2013; Ballantyne et al. 2015). Bagaimanapun, bagi genus *Pteroptyx*, bentuk organ cahaya pada sternit ketujuh adalah bersifat spesies spesifik, iaitu setiap spesies mempunyai bentuk yang berbeza (Rajah 3).

*Pteroptyx tener* betina juga mempunyai organ cahaya (OCB) yang berwarna putih kekuningan dan terletak pada sternit keenam sahaja (Rajah 4a & b). Susunan organ cahaya individu betina adalah sama dengan individu daripada spesies berlainan genus *Pteroptyx* dan genus lain dalam Luciolinae (Ballantyne 1987; Ballantyne et al. 2015; Ballantyne & McLean 1970; Ballantyne & Lambkin 2013).



Rajah 4 *Pteroptyx tener* betina. a, pandangan ventral betina yang menunjukkan kedudukan organ cahaya; b, organ cahaya . OC, organ cahaya

Menurut Branham dan Wenzel (2003) ciri morfologi luaran yang ditunjukkan *P. tener* jantan dan betina yang menutupi keseluruhan sternit keenam dan bipartit pada sternit ketujuh adalah ciri morfologi umum yang dikelaskan sebagai ciri organ cahaya kelip-kelip yang menghasilkan cahaya secara kerlipan serentak dan merangkumi spesies daripada genus *Luciola*, *Colophotia*, *Photinus* dan *Photuris* (Branham & Wenzel 2003; Ghiradella 1977; Goh et al. 2013; Peterson & Buck 1968). *Pteroptyx tener* jantan dan betina mempunyai organ cahaya jenis keenam berdasarkan kategori organ cahaya yang dinyatakan oleh Buck (1948). Struktur ini umumnya terdapat pada kelip-kelip yang menghasilkan cahaya secara kerlipan serentak. Antaranya adalah beberapa spesies kelip-kelip Asia iaitu *Pteroptyx malaccaae*, *Pteroptyx valida*, *Pyrophanes appendiculata* dan *Luciola* sp. (Peterson & Buck 1968). Selain itu, struktur umum organ cahaya yang serupa turut terdapat pada kelip-kelip Amerika daripada genus *Photinus* dan *Photuris*. Kesemua spesies kelip-kelip tersebut menghasilkan kerlipan cahaya yang pantas dan teratur (Beams & Anderson 1955; Buck 1948; Kluss 1958; Oertel et al. 1975; Peterson & Buck 1968).

*Pteroptyx tener* jantan dan betina mempunyai saiz organ cahaya yang berbeza (Jadual 2). Perimeter keseluruhan OCJ adalah  $5.85 \pm 0.44$  mm ( $n=20$ ), OCJ1 adalah  $3.91 \pm 0.33$  mm

(n=20), OCJ2 adalah  $1.63 \pm 0.16$  mm (n=20) dan OCJ3 pula adalah  $1.77 \pm 0.15$  mm (n=20). Perimeter keseluruhan OCB pula adalah  $3.52 \pm 0.37$  mm (n=20). Perimeter OCJ adalah signifikan ( $P < 0.05$ ) lebih besar daripada OCB. Perimeter OCJ1 turut mempunyai ukuran yang signifikan ( $P < 0.05$ ) lebih besar berbanding perimeter OCB. Perbezaan ini adalah kerana organ cahaya individu jantan terdapat pada dua segmen sternit berbanding organ cahaya individu betina yang hanya terdapat pada satu sternit sahaja. Selain itu perbezaan tersebut berkaitan dengan saiz badan *P. tener* jantan yang lebih besar daripada *P. tener* betina. *Pteroptyx tener* jantan adalah  $6.07 \pm 0.55$  mm (n=20) panjang dan  $2.13 \pm 0.24$  mm (n=20) lebar manakala, *P. tener* betina  $5.88 \pm 0.58$  mm panjang dan  $2.14 \pm 0.23$  mm lebar. Ujian korelasi turut menunjukkan hubungan linear yang positif di antara perimeter organ cahaya jantan dan betina dengan panjang dan lebar abdomen badan kelip-kelip tersebut (Jadual 3).

Jadual 2 Ukuran morfometrik organ cahaya jantan dan betina *P. tener*

Ukuran (mm)	Jantan		Betina	
	Min±SD (n=20)	Julat	Min±SD (n=20)	Julat
Panjang (P)	$6.07 \pm 0.55$	4.56-6.73	$5.88 \pm 0.58$	4.78-6.83
Lebar (L)	$2.13 \pm 0.24$	1.72-2.52	$2.14 \pm 0.23$	1.49-2.71
Panjang abdomen	$2.61 \pm 0.43$	2.05-3.79	$3.37 \pm 0.64$	2.30-4.96
Lebar abdomen	$1.55 \pm 0.143$	1.33-1.81	$1.58 \pm 0.23$	1.12-2.09
Perimeter organ cahaya	OCJ: $5.85 \pm 0.44$	5.27-6.82	OCB: $3.52 \pm 0.37$	2.63-4.30
	OCJ1: $3.91 \pm 0.33$	3.39-4.71		
	OCJ2: $1.63 \pm 0.16$	1.40-2.00		
	OCJ3: $1.77 \pm 0.15$	1.48-2.11		

Jadual 3. Korelasi perimeter organ cahaya dengan pengukuran morfologi *P. tener*

	OCJ		OCB	
	r	P value	r	P value
Panjang (P)	0.36	0.12	0.44*	0.05
Lebar (L)	0.39	0.09	0.56*	0.01
Panjang abdomen	0.74*	0.00	0.59*	0.01
Lebar abdomen	0.65*	0.00	0.72*	0.00

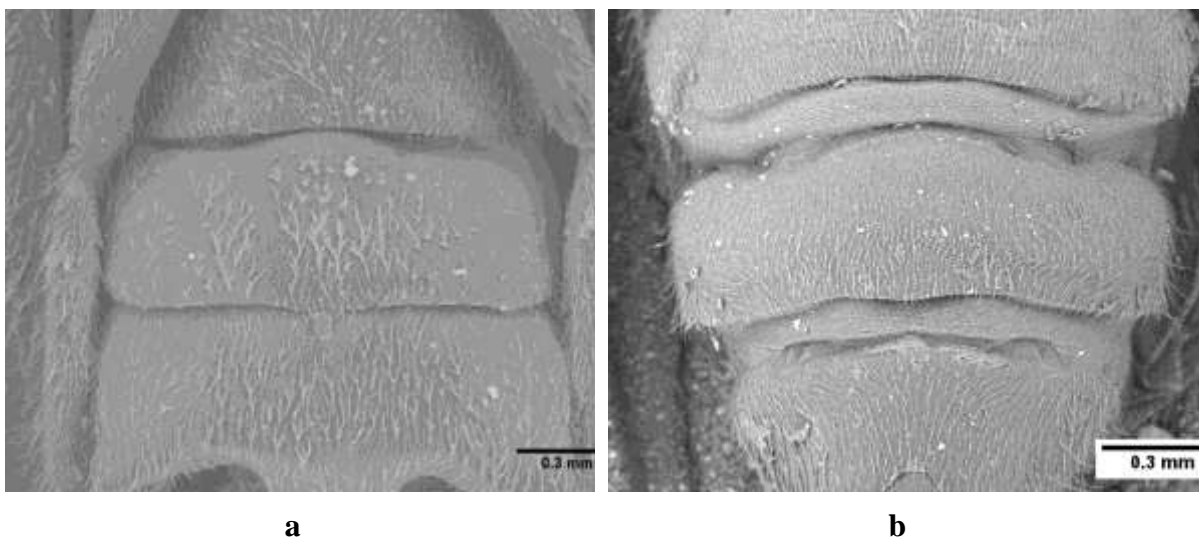
\*signifikan ( $P < 0.05$ )

Saiz organ cahaya *P. tener* jantan yang lebih besar berbanding *P. tener* betina adalah mungkin berkaitan dengan peranannya sebagai pemberi isyarat utama dalam komunikasi kerlipan untuk mencari pasangan mengawan (Case 1980; South et al. 2011; Wing et al. 1983). Individu betina pula cenderung untuk memilih jantan yang menghasilkan cahaya berkeamatan lebih tinggi sebagai pasangan (Cratsley & Lewis 2003) untuk mengawan dan saiz organ cahaya jantan berkadar terus dengan keamatan cahaya yang dihasilkan (Branham & Greenfield 1996; Cratsley & Lewis 2003; Vencl & Carlson 1998).

*Pteroptyx tener* betina menghasilkan keamatan cahaya yang lebih rendah kerana saiz organ cahayanya yang lebih kecil. Kerlipan individu betina hanya untuk menarik perhatian dan menyatakan kesediaannya untuk menjadi pasangan mengawan. Oleh itu, individu betina tidak memerlukan penghasilan cahaya yang terang atau mempunyai keamatan tinggi dalam komunikasi intraspesies. Ini adalah berdasarkan pengamatan yang dilakukan oleh Case (1980) mendedahkan walaupun *P. tener* betina mempunyai organ cahaya yang menutupi keseluruhan sternit keenamnya, cahaya selalunya hanya dihasilkan pada hujung kiri dan kanan organ cahaya sahaja. *Pteroptyx tener* betina juga tidak terlibat dengan komunikasi kerlipan serentak yang

dihasilkan oleh kelip-kelip jantan (Case 1980; Fatimah & Norela 2016). Oleh itu, mungkin *P. tener* betina tidak perlu menghasilkan cahaya yang terang dan tinggi untuk bersaing dengan kerlipan serentak yang dihasilkan *P. tener* jantan.

Pencerapan menggunakan SEM menunjukkan terdapat banyak rambut halus di atas permukaan kutikel abdomen yang menutupi organ cahaya individu jantan dan individu betina (Rajah 4.7). Rerambut halus pada organ cahaya individu jantan mempunyai diameter  $4.46 \pm 0.76 \mu\text{m}$  (n=20) dan panjang  $74.74 \pm 25.23 \mu\text{m}$  (n=20) manakala pada organ cahaya individu betina pula mempunyai diameter  $2.15 \pm 0.34 \mu\text{m}$  (n=20) dan panjang  $44.84 \pm 13.23 \mu\text{m}$  (n=20). Selain daripada fungsinya sebagai organ deria, kehadiran rerambut halus pada permukaan kutikel organ cahaya *P. tener* ini turut membantu dalam penyebaran cahaya yang dihasilkan oleh organ cahaya (Bay et al. 2013).



Rajah 5. Pencerapan organ cahaya menggunakan mikroskop pengimbasan elektron (SEM). a, organ cahaya individu jantan; b, organ cahaya individu betina

## KESIMPULAN

Kepekatan enzim lusiferase yang dikaji dengan menggunakan kaedah asai imunoserap terangkai enzim (ELISA) menunjukkan terdapat perbezaan ( $P > 0.05$ ) kuantiti lusiferase di antara organ cahaya individu jantan dan individu betina yang mana individu jantan mempunyai enzim lusiferase lebih tinggi. Hasil ini mencadangkan perbezaan kepekatan enzim lusiferase menyumbang kepada kepelbagaian kecerahan cahaya yang dihasilkan oleh kelip-kelip *P. tener*. Secara keseluruhannya organ cahaya *P. tener* jantan dan betina dilihat terdiri daripada elemen dan struktur umum yang sama. Walaupun *P. tener* jantan dan betina mempunyai struktur umum organ cahaya yang sama, masih terdapat beberapa perbezaan yang dapat dilihat terutama pada saiz organ cahaya yang menyumbang kepada perbezaan kerlipan antara kelip-kelip individu jantan dan individu betina. Hasil kajian ini diharapkan dapat membantu dalam memahami lebih lanjut mengenai mekanisme pengawalan penghasilan biopendarkilau dan turut membantu usaha pemuliharaan spesies kelip-kelip di Malaysia khususnya penggunaan cahaya dari luar untuk menarik kumpulan kelip-kelip datang kepada bot pelancong dan pemuliharaan serangga lain secara amnya.

### **PENGHARGAAN**

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada pembiaya kajian ini iaitu TNB Research Sdn. Bhd. melalui geran ST-2017-013. Selain itu penyelidik ingin berterima kasih di atas kerjasama penduduk Kampung Kuantan, Kuala Selangor dalam membantu kerja-kerja di lapangan.

### **PERCANGGAHAN KEPENTINGAN**

Tiada.

## RUJUKAN

- Aprille, J.R., Lagace, C.J., Modica-Napolitano, J. & Trimmer, B.A. 2004. Role of nitric oxide and mitochondria in control of firefly flash. *Integrative and Comparative Biology* 1(44): 213–219.
- Ballantyne, L.A & Menayah, R. 2000. Redescription of the Synchronous Firefly, *Pteroptyx tener* Olivier (Coleoptera: Lampyridae) of Kampung Kuantan, Selangor. *Malayan Nature Journal* 54-4: 323–328.
- Ballantyne, L.A. & McLean, M.R. 1970. Revisional studies on the firefly genus *Pteroptyx* Olivier (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae: Luciolini). *Transactions of the American Entomological Society* 96(2): 223–305.
- Ballantyne, L.A. 1987. Further revisional studies on the firefly genus *Pteroptyx* Olivier (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae: Luciolini). *Transactions of the American Entomological Society* 1987: 117–170.
- Ballantyne, L.A. & Lambkin, C.L. 2013. Systematics and phylogenetics of Indo-Pacific Luciolinae fireflies (Coleoptera: Lampyridae) and the description of new genera. *Zootaxa* 3653(1): 1–162.
- Ballantyne, L., Lambkin, C., Boontop, Y. & Jusoh, W.F.A.W. 2015. Revisional studies on the Luciolinae fireflies of Asia (Coleoptera: Lampyridae): 1. The genus *Pyrophanes* Olivier with two new species. 2. Four new species of *Pteroptyx* Olivier and 3. A new genus *inflata* Boontop, with redescription of *Luciola indica* Motsch. *Zootaxa* 3959(1): 1–84.
- Bay, A., Cloetens, P., Suhonen, H. & Vigneron, J.P. 2013. Improved light extraction in the bioluminescent lantern of a *Photuris* firefly (Lampyridae). *Optics Express* 21(1): 764–780.
- Beams, H.W. & Anderson, E. 1955. Light and electron microscope studies on the light organ of the firefly (*Photinus pyralis*). *The Biological Bulletin* 109(3): 375–393.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248–254.
- Branham, M. & Greenfield, M. 1996. Flashing males win mate success. *Nature* 381: 745–746.
- Branham, M.A. & Wenzel, J.W. 2003. The Origin of photic behavior and the evolution of sexual communication in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Cladistics* 19(1): 1–22.
- Buck, J. 1988. Synchronous Rhythmic Flashing of Fireflies. *The Quarterly Review of Biology* 63(3): 301-314.
- Buck, J.B. 1948. The anatomy and physiology of the light organ in fireflies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 49(3): 397–485.
- Case, J.F. 1980. Courting behavior in a synchronously flashing, aggregative firefly, *Pteroptyx tener*. *The Biological Bulletin* 159(3): 613–625.

- Cratsley, C.K. & Lewis, S.M. 2003. Female preference for male courtship flashes in *Photinus ignitus* Fireflies. *Behavioral Ecology* 14(1): 135-140.
- Engvall, E., Jonsson, K. & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin g, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 251(3): 427-434.
- Fatimah, R. & Norela, S. 2016. Synchronization of Malaysian fireflies: The case of *Pteroptyx tener* at Kampung Kuantan, Selangor, Malaysia. *Malayan Nature Journal* (68): 223-228.
- Gandelman, O.A., Brovko, L.Y., Ugarova, N.N., Chikishev, A.Y. & Shkurimov, A.P. 1993. Oxyluciferin fluorescence is a model of native bioluminescence in the firefly Luciferin-Luciferase System. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology* 19(3): 187-191.
- Ghiradella, H. 1977. Fine Structure of the tracheoles of the lantern of a *Photurid* firefly. *Journal of Morphology* 153(2): 187-203.
- Goh, K.S., Sheu, H.S., Hua, T.E., Kang, M.H. & Li, C.W. 2013. Uric Acid spherulites in the reflector layer of firefly light organ. *PlosOne* 8(2): 56406.
- Kluss, B.C. 1958. Light and electron microscope observations on the photogenic organ of the firefly, *Photuris pennsylvanica*, with special reference to the innervation. *Journal of Morphology* 103(1): 159-185.
- Lloyd, J.E. 1971. Bioluminescent communication in insect. *Annual Review of Entomology* 16: 97-122.
- Mcelroy, W.D., Seliger, H.H. & White, E.H. 1969. Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly Luciferin. *Photochemistry and Photobiology* 10(3): 153-170.
- Nur Khairunnisa Salleh, Nurul Wahida Othman, Norela Sulaiman & Ismail Sahid. 2019. Ultrastructure on the light organ of tropical synchronize firefly, *Pteroptyx tener*. *Sains Malaysiana* 48(4): 727-733.
- Nur Khairunnisa Salleh, Nurul Wahida Othman & Norela Sulaiman. 2016. The localization of luciferase in *Pteroptyx tener* (Coleoptera: Lampyridae) light organ. *Serangga* 21(1): 51-59.
- Oertel, D., Linberg, K. & Case, J. 1975. Ultrastructure of the larval firefly light organ as related to control of light emission. *Cell and Tissue Research* 164(1): 27-44.
- Papi, F. 1969. Light emission, sex attraction and male flash dialogues in a firefly, *Luciola lusitanica* (Charp.). *Monitore Zoologico Italiano* 3: 135-184.
- Peterson, M.K. 1970. The fine structure of the larval firefly light organ. *Journal of Morphology* 131(1): 103-115.

- Peterson, M.K. & Buck, J. 1968. Light organ fine structure in certain asiatic fireflies. *Biological Bulletin*: 335–348.
- Seliger, H.H., Mcelroy, W.D., White, E.H. & Field, G.F. 1961. Stereospecificity and firefly bioluminescence, a comparison of natural and synthetic Luciferins. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 47(8): 1129–1134.
- South, A., Stanger-Hall, K., Jeng, M.L. & Lewis, S.M. 2011. Correlated evolution of female neoteny and flightlessness with male spermatophore production in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Evolution* 65(4): 1099–1113.
- Strause, L.G., Deluca, M. & Case, J.F. 1979. Biochemical and morphological changes accompanying light organ development in the firefly, *Photuris pennsylvanica*. *Journal of Insect Physiology* 25(4): 339–347.
- Ugarova, N.N. 2008. Bioluminescence: Fireflies revisited. *Nature Photonics* 2(1): 8–9.
- Vencl, F.V. & Carlson, A.D. 1998. Proximate mechanisms of sexual selection in the firefly *Photinus pyralis* (Coleoptera: Lampyridae). *Journal of Insect Behavior* 11(2): 191-207.
- Wing, S., Lloyd, J.E. & Hongtrakul, T. 1983. Male competition in *Pteroptyx* Fireflies: Wing-cover clamps, female anatomy, and mating plugs. *Florida Entomologist* 66(1): 86–91.
- Yasutake, S., Okita, S. & Takeshige, Y. 1963. The fine structure of the light organ of firefly (*Luciola cruciata*), especially the photocyte granules. *Journal of Electron Microscopy* 12(4): 240–253.