

Profil Hormon-hormon Reproduksi Cacing Nipah *Namalycastis rhodochorde* (Polychaeta: Nereididae)

The Profile of Reproductive Hormones of Nypa Palm Worm Namalycastis rhodochorde (Polychaeta: Nereididae)

Junardi^{*}, Tri Rima Setyawati, Ari Hepi Yanti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura

*E-mail: junardi@fmipa.untan.ac.id

ABSTRACT

The Nypa palm worm *Namalycastis rhodochorde* can be cultivated because it has high economic value; however, knowledge of its reproductive biology is still poorly understood, especially regarding reproductive hormones for engineering and accelerated maturation. This research aimed to obtain profile data of the three reproductive hormones i.e: estradiol, progesterone, and testosterone of Nypa palm worms. Samples were taken from body coelom fluid containing gametes from three stages of development; immature, submature, and mature. Analysis of progesterone and testosterone used the Radio Immunoassay method while estradiol used the Enzyme-linked Immunosorbent Assay method. Analysis of variance was used to determine differences in hormone concentrations based on developmental stages. The concentration of the Estradiol hormone increases with maturation, while the concentrations of progesterone and testosterone do not differ at all stages of development.

Keywords: Estradiol, *namalycastis*, polychaeta, progesterone, reproductive hormone, estosterone.

PENDAHULUAN

Kajian hormon-hormon reproduksi pada Polychaeta awalnya menggunakan pendekatan tidak langsung dengan mengetahui adanya hormon pertumbuhan *Nereidin* (Álvarez-Campos *et al.*, 2022). Pendekatan ini berdasarkan mekanisme kontrol negatif, berkurangnya konsentrasi hormon pertumbuhan akan menyebabkan maturasi individu dan pemijahan. Keberadaan hormon reproduksi Polychaeta selanjutnya dibahas oleh beberapa peneliti. Schenk *et al.*, (2016) menemukan neurohormon metylfernesoat juga memengaruhi reproduksi pada Annelida termasuk Polychaeta. Informasi tentang hormon reproduksi secara umum juga telah dilaporkan pada beberapa spesies dari famili Nereididae (Andries, 2001).

Pada satu dasawarsa terakhir ini juga mulai dilaporkan keberadaan hormon steroid pada berbagai spesies anggota Nereididae, misalnya estradiol 17- β pada *Nereis virens* (García-alonso & Rebscher, 2005) dan estradiol 17- β , progesteron dan testosteron pada *Nereis diversicolor* (Mouneyrac *et al.*, 2006); (Duro & Mouneyrac, 2007); (Meunpol *et al.*, 2007). Umumnya, kajian hormon banyak dilaporkan dari spesies-spesies yang termasuk dalam subfamili Nereidinae. Informasi hormon reproduksi lainnya telah dikemukakan oleh Lawrence & Soame (2009) yang berpendapat

ada lebih banyak hormon yang terlibat dalam proses reproduksi Polychaeta, namun sampai saat ini pendapat tersebut belum banyak dibuktikan.

Hasil penelitian ini merupakan informasi awal tentang keberadaan hormon-hormon reproduksi pada cacing nipah *Namalycastis rhodochorde* (subfamili Namanereidinae) sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk melakukan rekayasa reproduksi seperti induksi hormon untuk mempercepat pematangan gamet. Tujuan penelitian untuk mendapatkan data tiga hormon reproduksi estradiol, progesteron dan testosteron pada cacing nipah *Namalycastis rhodochorde* berdasarkan tahap perkembangan.

METODE

Cacing nipah (*N. rhodochorde*) yang digunakan dikoleksi dari estuari Sungai Kapuas, Kalimantan Barat dibawa dalam keadaan hidup ke laboratorium Zoologi, Universitas Tanjungpura menggunakan kontainer sampel yang diisi dengan lumpur. Sampel cacing dari lapangan dipelihara dalam bak plastik berukuran 50x30x25 cm pada suhu ruang tanpa diberi pakan selama seminggu sebelum digunakan.

Cacing nipah yang digunakan dalam penelitian memiliki karakteristik warna tubuh merah muda dengan segmen-segmen tubuh dengan ukuran bagian anterior kecil, semakin membesar ke arah median kemudian semakin mengecil kembali ke arah posterior tubuh. Panjang tubuh dewasa umumnya lebih dari satu meter. Karakter khas dari spesies ini memiliki ciri tentakel sangat pendek, seta hanya tipe

falciger (tanpa seta spiniger) pada parapodia, seta falciger berukuran pendek terutama pada parapodia di bagian anterior tubuh (Glasby *et al.*, 2007). Maturasi cacing ini dapat dilihat secara visual dengan perubahan warna tubuh. Warna merah muda pada individu muda menjadi merah tua pada betina dan menjadi putih pucat kehijauan pada jantan hanya pada individu *mature*.

Penentuan tahapan perkembangan dilakukan dengan memeriksa gamet. Gamet diambil dari selom tubuh cacing dengan menggunakan pipa kaca kapiler yang ujungnya diruncingkan. Pipa kaca kapiler selanjutnya ditusukkan pada bagian samping tubuh diantara dua segmen bagian ventral. Cairan selom yang didapat kemudian diteteskan pada kaca obyek dan diamati di bawah mikroskop majemuk (Olympus CX 21) pada perbesaran 100x.

Gamet betina (oosit) diukur diameternya menggunakan mikrometer (Olympus Cross) yang dipasang pada lensa okular mikroskop. Oosit yang diukur adalah oosit yang diameternya $>30\mu\text{m}$ karena pada ukuran ini oosit sudah dapat dibedakan dengan eleosit atau klaster sperma (Junardi *et al.*, 2010). Dilakukan pengukuran diameter oosit untuk 30 oosit setiap individu. Tahap perkembangan oosit mengacu pada oogenesis dari Nereididae menurut Eckelbarger (2006) dan Junardi *et al.*, (2010). Perkembangan sperma juga mengacu pada tahap spermatogenesis Nereididae menurut Rouse (2006) dan Junardi *et al.*, (2010). Data perkembangan gamet ini kemudian digunakan untuk menentukan jenis kelamin.

Cacing yang digunakan untuk pengukuran hormon reproduksi diambil sebanyak tiga individu yang mewakili masing-masing tahapan perkembangan. Hormon-hormon yang diukur adalah estradiol dan progesteron dari cacing betina, sementara testosteron, sampel diambil dari betina dan jantan. Total sebanyak sembilan sampel masing-masing dari tiga tahap perkembangan, baik jantan maupun betina.

Sampel yang digunakan untuk analisis hormon diambil dari cairan selom yang mengandung gamet dari bagian median tubuh dengan ukuran segmen yang lebih besar dan lebar dibandingkan bagian tubuh lainnya. Pengambilan cairan selom dilakukan dengan cara memotong bagian posterior tubuh, setelah terpotong, dua potongan tubuh ditekan pada cawan petri berdiameter 6 cm. Cairan selom yang tertampung kemudian disimpan dalam tabung mikro 1 ml.

Analisis progesteron dan testosteron menggunakan metode *Radio Immunoassay* (RIA). Analisis ini dilakukan dengan cara membuat tabung penanda duplikat untuk total (T), *non-specific binding* (NSB) standar nol (Standar 1 = B_0), standar (S_{2-6}), kontrol (C), dan sampel (S_x), *Reagent* dan sampel dicampur, ditambahkan 50 μl pada masing-masing standar, control, dan sampel ke dalam tabung penanda. Larutan perunut ditambahkan sebanyak 100 μl ke dalam semua tabung. Antiserum sebanyak 100 μl kemudian juga ditambahkan ke dalam semua tabung kecuali tabung T dan NSB. Tabung yang telah

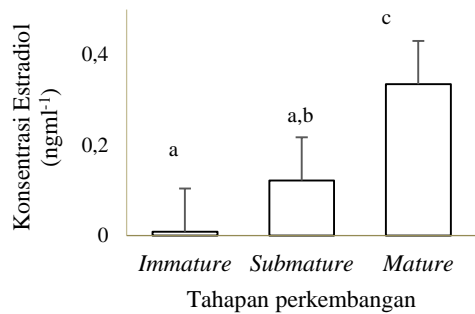
ditambahkan perunut dan antiserum (kecuali tabung T) selama 2-5 detik yang ditempatkan pada rak holder, selanjutnya rak holder ditempatkan pada *plate shaker* dan dikocok selama beberapa detik. Inkubasi tabung dilakukan selama 2 jam pada suhu ruang (20-28°C) dan tabung T ditempatkan pada rak kemudian diaduk bersamaan dengan tabung yang mengandung *Magnetic Immunosorbent* (MIS) sampai homogen. Sebanyak 500 μl sampel ditambahkan ke masing-masing tabung kecuali tabung T. Semua tabung diaduk dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dan dibagi menjadi beberapa bagian kecil serta disentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 15 menit. Kandungan radioaktif pada semua tabung kemudian dihitung.

Estradiol dianalisis menggunakan metode *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dengan kit ELISA komersial DRG^(R) Germany EIA-4399. Sebanyak 100 μL dari setiap standar, kontrol, dan sampel dengan *tips* ke dalam *well* yang sesuai. *Enzyme Conjugate* diambil sebanyak 200 μL dimasukkan ke dalam masing-masing *well* dan diaduk selama 10 detik dan diinkubasi selama 4 jam pada suhu ruang. Isi *well* kemudian digoyangkan dengan cepat, *well* dibilas sebanyak 3 kali dengan *Wash Solution* yang diencerkan masing-masing sebanyak 400 μL . Sisa tetesan diambil dengan kertas *absorbent* sampai hilang kemudian ditambahkan sebanyak 200 μL larutan substrat ke setiap *well* dan selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. *Stop solution* ditambahkan sebanyak 100 μL yang dimasukkan ke dalam setiap *well*. Pembacaan *absorbance* menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm setiap 10 menit. Analisis hormon dilakukan di Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR) BATAN, Jakarta.

Data diuji normalitasnya menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov yang diikuti dengan uji homogenitas varian (Levene's test) sebelum dilakukan dianalisis varian satu arah (*one way ANOVA*). Uji *Post Hoc* dengan *Least Significance Different* (LSD) pada tingkat kepercayaan ($\alpha=0,05$) untuk membedakan konsentrasi hormon (variabel bebas) pada masing-masing tahap perkembangan (variabel terikat). Analisis data menggunakan program Statistika SPSS v21.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hormon-hormon reproduksi cacing nipah yaitu estradiol, progesteron dan testosteron yang ditemukan berbeda konsentrasi pada tahap perkembangan. Konsentrasi estradiol menunjukkan peningkatan seiring dengan tahap maturasi individu (Gambar 1). Konsentrasi estradiol spesies ini pada tahap *mature* lebih tinggi dan hasil ANOVA juga menunjukkan perbedaan signifikan ($P=0,06$, $F=4,48$) konsentrasinya pada individu *mature* dibandingkan dengan tahapan perkembangan lainnya.



Gambar 1. Konsentrasi estradiol rata-rata pada tiga tahap perkembangan. Angka pada bagian atas batang yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan bahwa tidak berbeda signifikan pada taraf kepercayaan 0,05%.

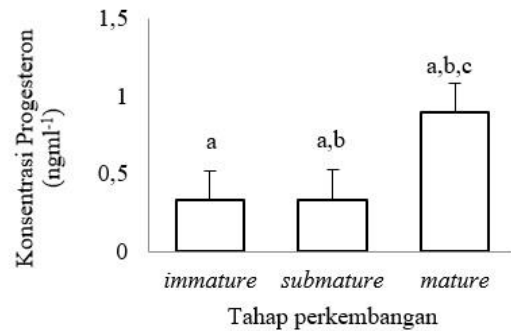
Konsentrasi estradiol ini berbeda dengan hasil penelitian García-alonso & Rebscher (2005) yang mendapatkan pada *N. virens*, estradiol ditemukan lebih tinggi pada individu *immature* sebesar 0,029 ngml⁻¹ dan 0,0129 ngml⁻¹ (betina *mature*) dan 0,0135 ngml⁻¹ (jantan *mature*). Hasil yang berbeda juga diperoleh oleh Durou & Mouneyrac (2007) pada *N. diversicolor*, *immature* memiliki konsentrasi estradiol yang lebih tinggi (1,6 ngml⁻¹) dibandingkan dengan *mature* (0,9 ngml⁻¹).

Estradiol dihasilkan oleh sel-sel eleosit untuk pembentukan vitellogenin, banyaknya sel-sel eleosit pada individu *immature* secara langsung berkorelasi dengan tingginya konsentrasi estradiol. Pada Polychaeta *mature* pembentukan vitellogenin dilakukan secara heterosintesis dengan mengambil dari sel-sel eleosit di sekitarnya (Eckelbarger, 1986). Tingginya konsentrasi estradiol pada betina *mature* nampaknya terkait dengan masih tingginya konsentrasi hormon ini pada cairan selom karena sumber hormon reproduksi selain eleosit juga pada cairan selom tubuh (Álvarez-Campos *et al.*, 2022).

Pengukuran kuantitas vitellogenin dalam cairan selom perlu dilakukan untuk penelitian lebih lanjut sehingga dapat diketahui keselarasannya dengan fluktuasi estradiol yang ditemukan. Selain itu, pada individu *mature* Nereididae, oositnya memiliki banyak kortikal alveoli. Hal ini juga diduga turut menyumbang terhadap tingginya konsentrasi estradiol hasil

penelitian ini. Peran estradiol pada kontrol pembentukan kortikal alveoli telah dibuktikan pada ikan salmon (*Oncorhynchus kisutch*) oleh Forsgren & Young (2012).

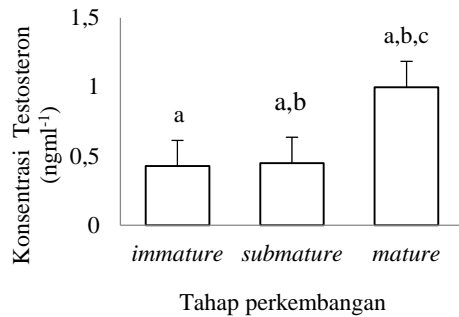
Konsentrasi progesteron *N. rhodochorde* menunjukkan adanya peningkatan (Gambar 2) namun hasil analisis ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan (P=0,47, F=0,85) antartahap perkembangan. Hasil ini menunjukkan terdapat dinamika Progesteron pada tiga tahap perkembangan cacing nipah.



Gambar 2. Konsentrasi progesteron rata-rata pada tiga tahap perkembangan. Angka pada bagian atas batang yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan bahwa tidak berbeda signifikan pada taraf kepercayaan 0,05%.

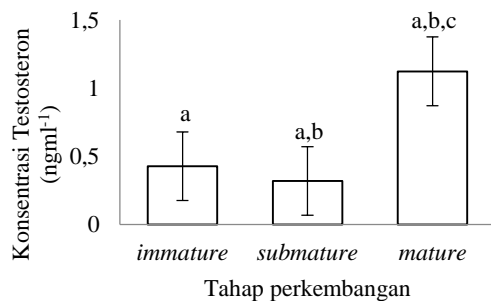
Peran progesteron penting dalam proses vitellogenesis yang disintesis dari sel-sel eleosit untuk membentuk protein yolk atau vitellin (García-alonso & Rebscher, 2005). Pembentukan vitellin pada Nereididae berasal dari sel-sel eleosit pada individu *immature* (Eckelbarger, 1983). Sel-sel eleosit akan semakin berkurang seiring dengan tingkat perkembangan, namun pada penelitian ini nampaknya eleosit masih belum sepenuhnya hilang dari selom, sementara eleosit lainnya sudah digunakan dalam pembentukan vitellin, sehingga konsentrasinya tidak berbeda pada semua tahap perkembangan.

Hasil pengukuran testosteron disajikan pada Gambar 3. Pola fluktuasi hormon pada spesies ini juga mirip dengan progesteron yang cenderung meningkat pada individu *mature* namun tidak berbeda signifikan (P=0,44, F=0,95) antar tahap perkembangan.



Gambar 3. Konsentrasi testosteron rata-rata *N. rhodochorde* betina pada tiga tahap perkembangan. Angka pada bagian atas batang yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan bahwa tidak signifikan pada taraf kepercayaan 0,05%.

Konsentrasi testosteron juga dianalisis pada individu jantan yang disajikan disajikan pada Gambar 4. Konsentrasi hormon ini pada jantan juga lebih tinggi pada *mature*, namun setelah dilakukan analisis dengan ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan ($P=0,41$, $F=0,68$) pada tiga tahap perkembangan individu atau polanya sama seperti pada hasil testosteron betina.



Gambar 4. Konsentrasi testosteron rata-rata individu jantan pada tiga tahap perkembangan. Angka pada bagian atas batang yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan bahwa tidak signifikan pada taraf kepercayaan 0,05%.

Fluktuasi konsentrasi testosteron dan progesteron pada spesies cacing nipah memiliki pola yang sama yang berbeda dengan estradiol. Estradiol ditemukan cenderung meningkat sesuai dengan tahap perkembangan, sedangkan progesteron dan testosteron cenderung sama. Pola yang sama seperti ini telah dilaporkan terjadi pada kerang *Mya arenaria*, diduga

karena adanya peran progesteron pada gametogenesis (Siah *et al.*, 2002).

Hubungan antara konsentrasi hormon reproduksi dengan perkembangan oosit dapat dinyatakan bahwa pada *immature* ditemukan konsentrasi estradiol, progesteron dan testosteron rendah. Pada *submature* juga ditemukan konsentrasi tiga hormon tersebut lebih rendah dari *mature* namun tidak berbeda signifikan. Pada saat *mature*, hanya estradiol yang konsentrasinya tinggi dan berbeda dengan dua hormon lainnya rendah. Pada individu jantan, tahap spermatosit klaster (*immature*) ditemukan konsentrasi testosteron sedang, kemudian rendah pada tahap pembentukan spermatid (*submature*) dan tinggi lagi pada tahap pembentukan spermatozoa (*mature*), namun kondisinya berfluktuasi sehingga hasil analisis statistiknya menunjukkan hasil yang tidak berbeda pada tiga tahap spermatogenesis tersebut.

Konsentrasi hormon pada penelitian ini berbeda dengan konsentrasi hormon reproduksi Nereididae umumnya. Pendekatan untuk mengetahui hormon sebelumnya dilakukan secara tidak langsung menggunakan fungsi kontrol negatif dengan mengukur konsentrasi hormon juvenil. Konsentrasi hormon juvenil tinggi saat *immature* dan akan semakin rendah jika individu telah *mature* (Andries, 2001), namun dari hasil penelitian ini dengan hormon-hormon yang diukur pada berbagai tingkat perkembangan tampak terdapat dinamikanya sehingga hormon reproduksi akan lebih tepat dilakukan dengan mengukurnya secara langsung.

Penelitian ini tidak memisahkan gamet dengan cairan selom untuk analisis sehingga konsentrasi hormon-hormon reproduksinya dapat bertambah banyak saat digabungkan dengan oosit yang matang karena telah terbentuk vitellogenin dan kortikal alveoli yang sempurna dalam oosit. Menurut Forsgren & Young (2012), testosteron dan progesteron berperan dalam proses pembentukan kortikal alveoli pada oosit matang. Pola fluktuasi ketiga hormon ini selama tahap perkembangan juga masih perlu observasi lebih lanjut terkait fluktuasinya saat proses Gametogenesis dengan memisahkan sampel gamet dari cairan selom sehingga dapat dengan tepat diketahui kaitan ketiga hormon reproduksi terhadap perkembangan sel-sel gamet. Estrogen lain seperti estriol dan estron yang telah diketahui reseptornya pada spesies Polychaeta lain (Keay

& Thornton, 2009) perlu juga dipastikan keberadaan dan profilnya. Konsep multi hormon yang berperan dalam reproduksi yang kemukakan oleh Lawrence & Soame (2009) perlu juga dianalisis terkait dengan mekanisme kerja dengan hormon pertumbuhan cacing nipah (*N. rhodochorde*).

KESIMPULAN

Konsentrasi estradiol ditemukan mulai tahap *immature* sampai *mature* dengan konsentrasi terus meningkat seiring tingkat maturasi, sementara untuk Progesteron dan Testosteron konsentrasinya ditemukan tidak berbeda pada masing-masing tahap perkembangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami menyampaikan ucapan terima kasih kepada Ditjen Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui Skema Penelitian Produk Terapan Tahun 2015. Ucapan terima kasih juga sampaikan kepada teknisi, laboran, dan mahasiswa yang telah membantu sampling dan preparasi sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Álvarez-Campos P, Planques A, Bideau L, Vervoort M & Gazave E. 2022. On the Hormonal Control of Posterior Regeneration in the Annelid *Platynereis dumerilii*. *BioRxiv*. **01.21.4772**: 1-44.
- Andries JC. 2001. Endocrine and Environmental Control of Reproduction in Polychaeta. In *Canadian Journal of Zoology*. **79**(2): 254-270.
- Durou C & Mouneyrac C. 2007. Linking Steroid Hormone Levels to Sexual Maturity Index and Energy Reserves in *Nereis diversicolor* from Clean and Polluted Estuaries. *General and Comparative Endocrinology*, **150**(1): 106-113.
- Eckelbarger. 1986. Vitello Genic Mechanisms and the Allocation of Energy to Offspring in Polychaetes Energy. *Bulletin of Marine Science*, **1**(2):165-198.
- Eckelbarger. 2006. Oogenesis. In Greg W Rouse & F Pleijel (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Annelida*. pp: 23-44.
- Eckelbarger K. 1983. Evolutionary Radiation in Polychaete Ovaries and Vitellogenic Mechanisms: Their Possible Role in Life History Patterns. *Canadian Journal of Zoology*. **61**(3):487-504.
- Forsgren KL & Young G. 2012. Stage-Specific Effects of Androgens and Estradiol-17beta on the Development of Late Primary and Early Secondary Ovarian Follicles of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) In Vitro 1. *Biology of Reproduction*. **87**(3):64-65.
- García-alonso J & Rebscher N. 2005. Estradiol Signalling in *Nereis virens* Reproduction. *Invertebrate Reproduction and Development*, **48**(1-3): 95-100.
- Glasby CJ, Miura T, Nishi E & Junardi. 2007. A New Species of *Namalycastis* (Polychaeta: Nereididae: Namanereidinae) from the shores of South-east Asia. *The Beagle: Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory*. **23**:21-27.
- Junardi, Setyawati TR & Yuwono E. 2010. Gametogenesis of Nypha Palm Worm *Namalycastis rhodochorde* (Polychaeta: Nereididae). *Jurnal ILMU DASAR*. **11**(1): 39-44.
- Keay J & Thornton JW. 2009. Hormone-Activated Estrogen Receptors in Annelid Invertebrates: Implications for Evolution and Endocrine Disruption. *Endocrinology*. **150**(4): 1731-1738.
- Lawrence AJ & Soame JM. 2009. The Endocrine Control of Reproduction in Nereidae: A New Multi-hormonal Model with Implications for Their Functional Role in A Changing Environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **364**(1534): 3363-3376.
- Meunpol O, Iam-Pai S, Suthikrai W & Piyatiratitivorakul S. 2007. Identification of Progesterone and 17 α -Hydroxyprogesterone in Polychaetes (*Perinereis* sp.) and The Effects of Hormone Extracts on Penaeid Oocyte Development in Vitro. *Aquaculture*. **270**(1-4): 485-492.
- Mouneyrac C, Pellerin J, Moukrim A, Ait Alla A, Durou C & Viault N. 2006. In Situ Relationship Between Energy Reserves and Steroid Hormone Levels in *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) From Clean and Contaminated Sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **65**(2): 181-187.
- Rouse GW. 2006. Annelid Sperm and Spermiogenesis. In G. W. R. and F. Pleijel (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Annelida*. 45-76.
- Schenk S, Krauditsch C, Frühauf P, Gerner C, & Raible F. 2016. Discovery of Methylfarnesoate as The Annelid Brain Hormone Reveals an Ancient Role of

Sesquiterpenoids in Reproduction. *ELife*,
5:1-23.
Siah A, Pellerin J, Benosman A, Gagné JP &
Amiard JC. 2002. Seasonal Gonad

Progesterone Pattern in The Soft-shell Clam
Mya arenaria. *Comparative Biochemistry
and Physiology - A Molecular and
Integrative Physiology*. 132(2):499-511.