

IDENTIFIKASI TAHAP-TAHAP EMBRIONAL PRE-MOULTING 'HORSE-SHOE CRABS' (*Limulus polyphemus*) MENURUT POLA PERKEMBANGAN NORMAL

Ciptono

Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh gambaran perkembangan awal embrio Horseshoe crabs *Limulus polyphemus* dalam kondisi normal dalam habitat tropis. Habitat asli hewan laut ini adalah subtropis, sehingga peneliti ingin melihat bagaimana perbedaan lingkungan iklim terhadap pola perkembangan normal ditinjau dari sisi waktu tahapan atau stadiasinya.

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dengan menekankan pada aktivitas pengamatan tentang gambaran perkembangan normal embrio *Limulus polyphemus*. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah purposive dengan mengamati contoh kasus perkembangan embrio dari telur-telur *Limulus polyphemus* yang diambil dari pasangan yang memiliki telur terbanyak di antara 3 pasangan yang lain yang dapat ditangkap. Sejumlah 250 butir telur fertil diamati perkembangannya. Setiap tahap perkembangan yang teridentifikasi kemudian diambil 5 sampel dan difiksasi dengan formalin 4 % + glyserin 5 % volume dalam botol kecil transparan. Jumlah sample keseluruhan 50 botol dan diurutkan sesuai stadiasi perkembangan embrio yang dicapai. Gambaran morfologik embrio didokumentasikan dari hasil pemotretan dengan mikroskop binokuler perbesaran 8X.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa stadiasi perkembangan embrio *Limulus polyphemus* selama perkembangan embrio *premoulting* dicapai sampai stadium 18. Lama pencapaian perkembangan untuk 18 stadium tadi adalah dalam waktu 10 hari untuk pemeliharaan perkembangan embrio yang mewakili daerah tropis, yang berarti 2 hari lebih lama daripada bila dibandingkan dengan perkembangan normal embrio *Limulus polyphemus* di daerah habitat aslinya (subtropis).

Kata kunci : *Limulus polyphemus*, stadium embrional, *premoulting* dan tropis.

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Sampai saat ini telah ditemukan 4 spesies *Horseshoe crabs* (ketam tapal kuda : **Mimi mintuno**, Jw.) di dunia, yaitu : *Limulus polyphemus* yang hidup di pantai timur bagian utara benua amerika. Lainnya hidup di benua asia *Tachypleus tridentatus* dapat ditemukan di Jepang, China selatan, Vietnam utara dan kepulauan sekitar Asia

tenggara. *Tachypleus gigas* ditemukan di benua Asia sejak dari Vietnam sampai India bagian timur dan kepulauan di wilayah Asia tenggara. Sementara itu *Tachypleus (Carcinoscorpius) rutondicauda* dapat ditemukan di beberapa wilayah benua Asia sejak dari China selatan sampai India bagian timur dan Asia tenggara. Species-species *asian* tadi dapat ditemukan di zona Asia timur, kecuali di Jepang (Itow, 1991 : 251).

Nenek moyang keempat species tersebut di atas rupa-rupanya sama, yaitu *Mesolimulus walchi* yang fosilnya ditemukan di Eropa dan menunjuk era keberadaannya sekitar 200 juta tahun yang lalu. Meskipun saat ini hanya ditemukan 4 spesies horseshoe crabs di dunia, namun dulu-dulunya sebenarnya terdapat lebih banyak lagi species. Seperti di Australia dapat ditemukan species *Horseshoe crabs* berhabitat air tawar, tidak seperti pada umumnya yang hidup di perairan payau atau air laut sepenuhnya (Itow, 2003 : 11).

Lebih lanjut Itow (2003:12) menyebutkan bahwa *Horseshoe crabs* yang ada sekarang ini secara langsung diturunkan dari Trilobita (*Subphylum Trilobitomorpha*) yang berevolusi lanjut ke *Subphylum Chelicerata*, suatu Arthropoda (*Phylum : Arthropoda*) primitif yang hidup pada era Palaeozoic lebih dari 500 juta tahun yang lalu. Baik Trilobita dan *Scorpions* laut, keduanya berkembang bersama sampai pada masa kepunahannya pada era Paleozoic. Hanya *Horseshoe crabs (Subphylum : Chelicerata)* saja yang masih dapat bertahan keberadaannya sampai sekarang ini.

Perkembangan normal embrio *Limulus polyphemus* pascafertilisasi hingga tahap *premolting* dapat dibagi menjadi stadium 1 sampai stadium 18. Sampai dengan tahap ini untuk habitat asli di daerah subtropik dapat dicapai hingga minggu pertama inkubasi (Itow, 1988). Sementara itu menurut Sekiguchi (1973 : 152-162), perkembangan embrio untuk species yang lain (*Tachypleus tridentatus*), tahapan *premolting* pada inkubasi normal di habitat alami yang beriklim subtropik dapat dicapai dalam waktu 23 hari.

Badan Konservasi Sumber Daya Alam (BKSDA) telah menetapkan bahwa hewan ini termasuk yang dilindungi oleh undang-undang konservasi. Hewan ini di

Indonesia lebih dikenal dengan nama **Mimi mintuno**, yang selalu dikaitkan dengan budaya Jawa, dalam hal ini adalah sebagai simbol kesetiaan terhadap pasangan hidup. Perilaku reproduksi hewan ini amat menarik, karena hewan jantan dan betina selalu terlihat bersama-sama di habitatnya selama masa reproduksi. Upaya untuk mengungkap fenomena tersebut, maka peneliti ingin melihat sisi perkembangan awal horseshoe crabs dari semenjak perkembangan telur hingga tahap *premoulting* yang harapannya dapat diikuti tahap-tahapnya secara rinci. Penelitian ini dilakukan pada kondisi normal di laboratorium daerah tropik, yaitu perkembangan embrio diamati dalam keadaan apa adanya tanpa diperlakukan dengan perlakuan yang mengubah pola perkembangannya yang dilakukan di laboratorium Biologi FMIPA UNY.

B. Identifikasi Masalah

Sebaran populasi *Limulus polyphemus* adalah sepanjang sisi timur pantai Amerika Serikat. Iklim untuk habitat aslinya adalah subtropis. Dengan melihat hal tersebut peneliti ingin melihat pola perkembangan embrionya apabila dikembangkan pada kondisi laboratorik di daerah tropis yang diwakili oleh kondisi mikro di laboratorium biologi FMIPA UNY.

C. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, permasalahan yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini adalah bagaimana tahap-tahap perkembangan awal embrio *Horseshoe crabs* sejak telur mengalami fertilisasi hingga tahap *premoulting*.

D. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lebih rinci tahap-tahap perkembangan embrio *horseshoe crabs* semenjak telur mengalami fertilisasi hingga tahap *premoulting*.

E. Manfaat Penelitian

Dapat memberikan gambaran jelas dan rinci tahap-tahap perkembangan awal embrio *horseshoe crabs* melalui dokumentasi yang memadai semenjak telur mengalami fertilisasi hingga embrio mencapai tahap *premoulting*.

F. Batasan Operasional

1. Tahap perkembangan *premoult* adalah tahap perkembangan embrio yang dimulai saat fertilisasi telur dan diakhiri pengamatannya pada saat embrio mulai menunjukkan tanda-tanda akan menetas pertama dengan karakteristik terjadi penggantian cangkang embrio yang pertama kali.
2. Pola perkembangan normal adalah perkembangan embrio tanpa pengaruh perlakuan dari luar seperti perlakuan dengan bahan-bahan kimia toksik atau perlakuan melalui percobaan laboratorik. Perkembangan embrio dalam hal ini diikuti seperti apa adanya hingga tahap yang dimaksudkan.

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi dalam penelitian ini adalah telur-telur fertil *Limulus polyphemus* yang diharapkan berkembang lebih lanjut menjadi embrio.
2. Sampel dalam penelitian ini adalah telur-telur *Limulus polyphemus* yang fertilisasinya dilakukan secara *in vitro* dan diharapkan berkembang lebih lanjut menjadi embrio pada tahap-tahap pembelahan awal hingga *premoult*.

B. Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah :

Tahap-tahap perkembangan embrio *Limulus polyphemus premoult* sesuai urutan waktu yang dilaluinya.

C. Alat dan Bahan

1. bahan penelitian : telur *Limulus polyphemus* fertil
2. bahan untuk media perkembangan embrio :
 - air laut yang jernih
3. bahan untuk fiksasi embrio pada tahap perkembangan tertentu :
 - formalin 4 %
 - gliserin 5% volume

4. Alat :

- cawan petri
- botol sampel transparan
- gelas arloji diameter 5 cm
- pipet ujung tumpul
- mikroskop stereo
- jarum pentul
- perangkat fotomikrografi
- pinset
- kertas tissue

D. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksploratif deskriptif, sehingga tidak ada perlakuan terhadap bahan penelitian. Perkembangan embrio *Limulus polyphemus* diikuti dalam pola perkembangan yang apa adanya dan tahap-tahap perkembangannya didokumentasikan dalam bentuk fotograf. Status perkembangan dideskripsikan dengan standard deskripsi perkembangan *Horseshoe crabs* menurut Itow (1988).

E. Jalannya Penelitian

1. Menyiapkan telur-telur fertil mulai jam ke 0 (nol). Telur-telur matang gonad diambil dari induk betina *Limulus polyphemus*, kemudian dilakukan fertilisasi secara *in vitro* dengan sperma yang diambil dari pejantan dewasa.
2. Penginkubasian di dalam nampan plastik yang berisi media air laut jernih.
3. Observasi viabilitas telur yang benar-benar fertil. Telur yang fertil dan dapat berlanjut perkembangannya ditandai dengan tidak adanya perubahan pigmentasi telurnya. Telur yang tidak terbuahi akan tampak lebih putih daripada keadaan normal/fertil.
4. Telur-telur fertil diambil masing-masing 5 butir kemudian dimasukkan ke dalam botol-botol kecil transparan. Jumlah botol yang disediakan sejumlah 50 botol dan masing-masing diisi dengan media air laut yang jernih.
5. Setelah sampai pada tahap perkembangan pertama (I), botol pertama diberi tanda, kemudian media air laut dibuang digantikan dengan larutan fiksatif berupa formalin 4 % dan gliserin sejumlah 5 % volume, hingga mencapai volume total $\frac{3}{4}$ bagian botol.

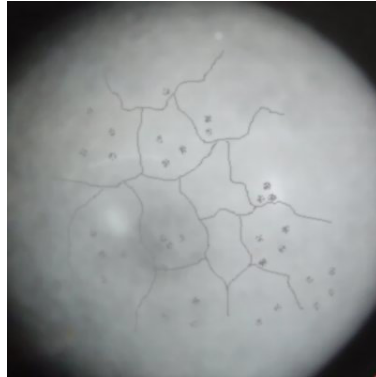
6. Pada tahap perkembangan ke dua (II) dan seterusnya diperlakukan pada botol-botol ke dua (II) dan seterusnya dengan prosedur yang sama seperti langkah ke 5, sehingga nantinya didapatkan sampel-sampel perkembangan yang mewakili tahap-tahap perkembangan embrio *premoulting*.
7. Standard tahap-tahap perkembangan *premoulting* yang dimaksudkan di sini adalah dengan menggunakan referensi dari standard perkembangan normal *Limulus polyphemus* yang dilakukan pengamatannya di habitat asli (*subtropis*) menurut Itow (1988).
8. Perbandingan waktu inkubasi dan capaian tahap-tahap perkembangan yang berbeda dengan habitat asli sangat dimungkinkan, sehingga data yang diperoleh dapat menggambarkan tahap-tahap perkembangan apabila habitatnya adalah daerah tropis (di Indonesia).
9. Hasil sampling dan fiksasi kemudian didokumentasikan dalam bentuk mikrofotograf stereo secara detil dan urut.

F. Analisis Data

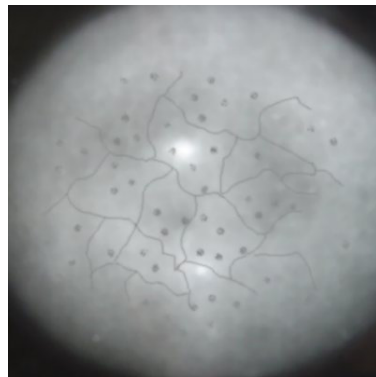
Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif-deskriptif berupa gambaran makroanatomi utuh (*wholemout*) embrio yang dideskripsikan secara lengkap keadaan riilnya. Untuk ini digunakan pendokumentasian dengan mikrofotografi secara detil dan lengkap pada setiap tahap yang dilalui dalam masa perkembangan embrio *Limulus polyphemus* tersebut.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

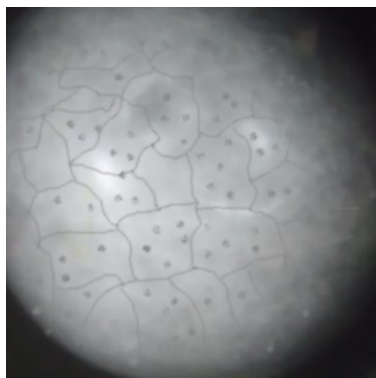
Hasil pengamatan urutan perkembangan embrio *Limulus polyphemus* yang dilakukan di laboratorium Biologi FMIPA UNY adalah sebagai berikut :



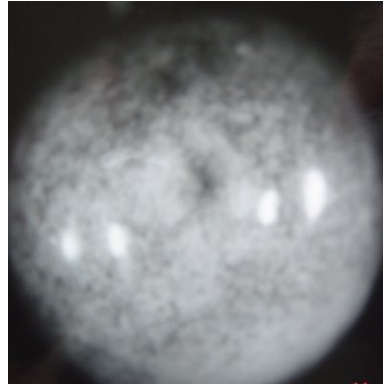
Gambar 1. Selama jam pertama dimulai dari saat fertilisasi, telur mengalami pembelahan-pembelahan pertamanya yang ditandai dengan terbentuknya bidang-bidang pembelahan awal (Stadium I).



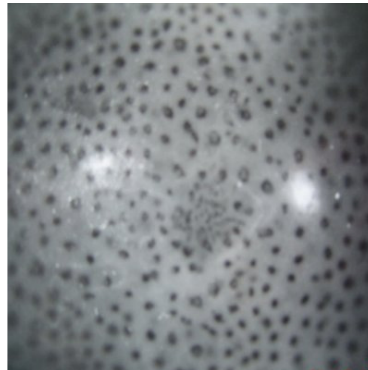
Gambar 2. Pembelahan semakin rapat pada stadium berikutnya, yang ditandai dengan mulai tampaknya inti-inti pada sel-sel hasil pembelahan telur. Kejadian ini dimulai pada jam ke 2 awal (Stadium 2).



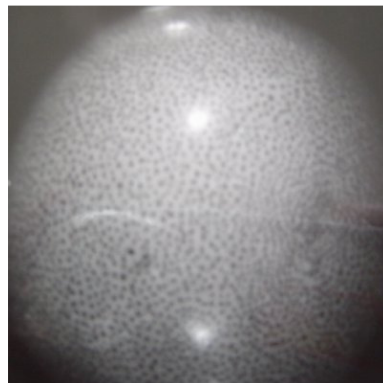
Gambar 3. Pembelahan sel-sel pada stadium ini menampilkan hasil belahan sel yang semakin banyak dan jumlah inti di bagian permukaan telur semakin rapat. Ini terjadi pada pertengahan jam ke 2 akhir hingga jam ke 3 (Stadium III).



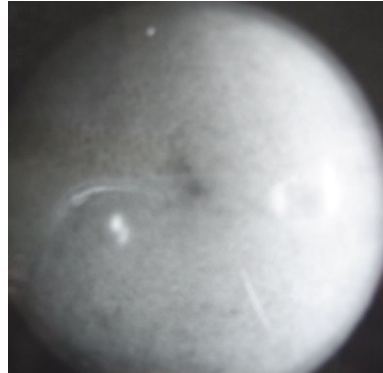
Gambar 4. Pembelahan sel-sel pada stadium ini jua akan menampakkan hasil belahan sel yang semakin banyak dan kerapatan sel di bagian permukaan telur semakin padat. Ini terjadi pada pertengahan jam ke 4 hingga ke 5 (Stadium IV).



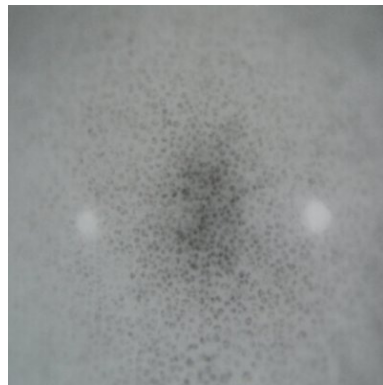
Gambar 5. Semakin rapat kepadatan sel hasil pembelahan, inti-inti sel semakin terlihat jelas. Ini terjadi pada jam ke 5 dan ke 6 (Stadium V).



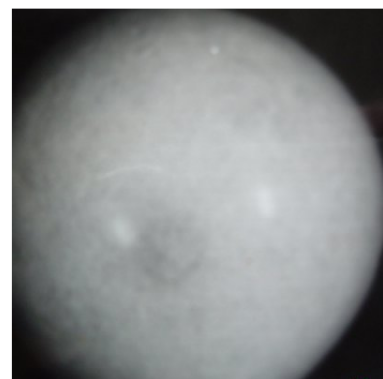
Gambar 6. Seiring semakin rapatnya kepadatan sel hasil pembelahan, inti-inti sel semakin terlihat jelas dan menuju pada menyempurnakan pembentukan *blastoderm*. Ini terjadi pada jam ke 6 dan ke 7 (Stadium VI).



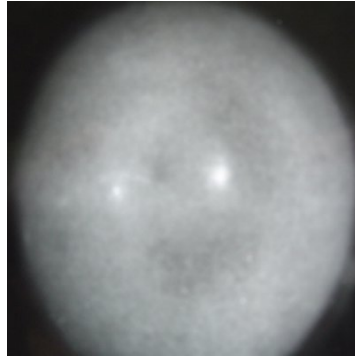
Gambar 7. Embrio telah menampakkan adanya pembentukan *germ disc* atau *discus germinalis* awal, yaitu titik tumbuh awal yang akan menjadi calon individu baru. Ini terjadi pada jam ke 7 sampai jam ke 20 (Stadium VII).



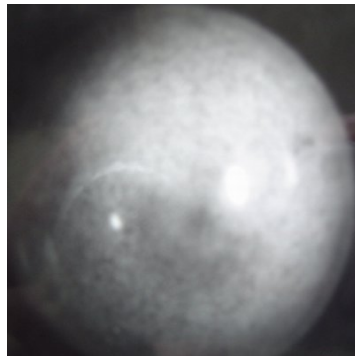
Gambar 8. Embrio telah sampai pada tahap terbentuknya *cumulus posterior*. Berkas kehitaman nantinya akan menjadi *discus germinalis* lengkap. Ini terjadi pada jam ke 20 hingga hari ke 2 (Stadium VIII).



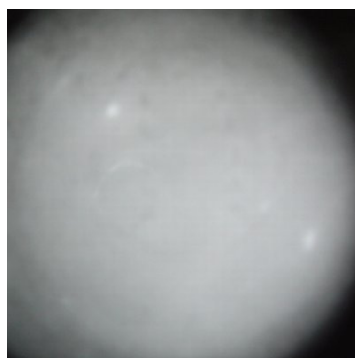
Gambar 9. Terbentuknya *cumulus posterior* sudah membentuk *discus germinalis* lengkap. Ini terjadi pada hari ke 2 hingga 3 (Stadium IX).



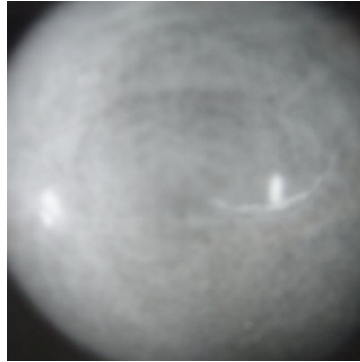
Gambar 10. *Discus germinalis* pada embrio pada tahap ini terbagi menjadi dua bagian yang ditandai dispersi granula yang berbeda warnanya. Perbedaan warna ini menjadi cikal bakal aksis anterior-posterior. Ini terjadi pada hari ke 3 (Stadium X).



Gambar 11. Embrio menapaki tahapan mulai menghilangnya *cumulus posterior*. Pola bentuk calon embrio semakin meluas area pertumbuhannya. Ini terjadi pada hari ke 3 hingga 4 (Stadium XI).



Gambar 12. Area pertumbuhan embrio menjadi lebih tegas batas-batasnya dan mulai tampak pembentukan *segment-segment* atau ruas-ruas embrio. Ini terjadi pada hari ke 4 hingga 5 (Stadium XII).



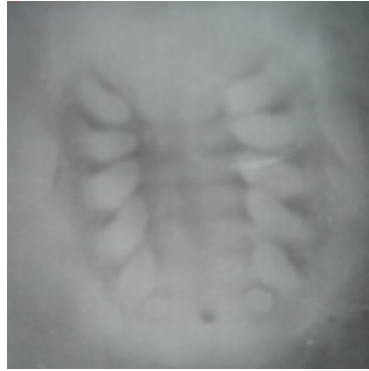
Gambar 13. Pembentukan *segment-segment* atau ruas-ruas embrio semakin jelas. Ini terjadi pada hari ke 6 hingga 7 (Stadium XIII).



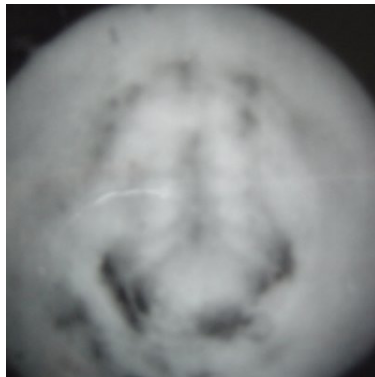
Gambar 14. Embrio sampai pada tahap pembentukan calon-calon organ *anlagen* dari *prosomeal appendages* atau organ ektremitas kaki-kaki. Tahapan ini terjadi pada hari ke 7 (Stadium XIV).



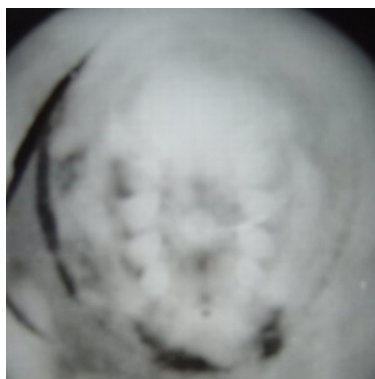
Gambar 15. Embrio sudah sampai pada tahapan pembentukan awal organ-organ lateral, baik berupa calon kaki-kaki maupun sisi-sisi samping kanan dan kiri tubuh embrio. Tahapan ini terjadi pada hari ke 8 (Stadium XV).



Gambar 16. Pembentukan organ-organ lateral, baik berupa calon kaki-kaki maupun sisi-sisi samping kanan dan kiri tubuh embrio mulai tampak jelas bentuk strukturnya. Tahapan ini terjadi pada hari ke 8 (Stadium XVI).



Gambar 17. Pembentukan organ-organ lateral definitif, baik berupa kaki-kaki maupun sisi-sisi samping kanan dan kiri tubuh embrio menuju pada kesempurnaan. Tampakkan struktur menjadi semakin jelas. Tahapan ini terjadi pada hari ke 9 (Stadium XVII).



Gambar 18. Embrio mulai menampilkan bentukan pembungkus luar, sementara bagian embrio semakin definitif strukturnya. Tahapan ini merupakan akhir dari *premoulting* dan terjadi pada hari ke 9 hingga 10 (Stadium XVIII).

Dari hasil penelitian di atas apabila dibandingkan dengan stadiasi perkembangan *Limulus polyphemus* di habitat aslinya di daerah subtropis diperoleh gambaran bahwa terjadi pada hari ke enam (Itow, 1988 : 150). Waktu yang lebih panjang ini (10 hari) dimungkinkan karena terjadi stress klimat saat telur-telur tersebut diikuti perkembangannya pada iklim tropis.

SIMPULAN, SARAN DAN REKOMENDASI

A. Simpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan :

1. Tahapan-tahapan perkembangan embrio *Limulus polyphemus* yang dilalui hingga saat pre-moulting terdiri dari 18 stadium.
2. Di dalam kondisi pengamatan di laboratorium yang dapat dipakai untuk mewakili iklim tropis, penyelesaian semua tahapan pre-moulting di atas dicapai dalam waktu 10 hari.

B. Saran-saran

Agar ketercapaian dan hasil akhir penelitian sejenis dapat lebih baik di waktu yang akan datang, peneliti menyarankan :

1. Pelaksanaan penelitian tropikal mempertimbangkan pemanfaatan habitat aslinya yaitu perairan laut yang dikondisikan pada daerah tropis.
2. Pelaksanaan fertilisasi *in vitro* dapat dijadikan alternatif terbaik untuk dapat mengembangkan dan penangkaran populasi *Horseshoe crabs* yang saat ini di Indonesia sudah terancam kepunahan.

C. Rekomendasi

1. Perlu penelitian lebih mendalam terhadap aspek perkembangan embrional pada hewan-hewan yang sudah termasuk langka (dilindungi) agar lebih dapat difahami karakteristik perkembangannya.
2. Pemahaman terhadap karakteristik perkembangan embrional hewan-hewan langka hendaknya dapat digunakan sebagai dasar untuk kebijaksanaan penangkarnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Dunlap, Julie. 1999. *Extraordinary Horseshoe Crabs*. Carolrhoda Books, Inc., Minneapolis, Minnesota.
- Itow, T. (1986). Inhibitors of DNA synthesis change the differentiation of body segments and increase the segment number of horseshoe crab embryos (Chelicerata, Arthropoda). *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195 : 323-333.
- (1988). *Biology of horseshoe crabs. Treatments with chemical reagents*. Edited by Sekiguchi, K. Science House Co., Ltd. Tokyo.
- Itow, T., Kenmochi, S., and Mochizuki. (1991). Induction of secondary embryos by intra and interspecific grafts of center cells under the blastopore in horseshoe crabs. *Develop. Growth & Differ.*, 33 (3). 251-258.
- Itow, T., Nozawa, S., Igarashi, T., and Okamura, M. (1996). Embryonic center cells of Arthropoda induce secondary embryos in Vertebrata. *Natural Sciences Series No. 47*. Shizuoka Univ. Press.
- Itow, T. (1997). The pollution of coastal waters and malformations of horseshoe crab embryos. *Natural Sciences Series No. 48*. Shizuoka Univ. Press.
- Itow, T., Igarashi, T., Botton, M.L., and Loveland, R.E. (1998). Heavy metals inhibit limb regeneration in horseshoe crab larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 : 457-463.
- Itow, T., Kato, H., and Kato, K. (2003). Horseshoe crabs in Australia. *Natural Sciences Series No. 53*. Shizuoka Univ. Press.
- Loveland, R.E., Botton, M.L. and C.N. Shuster. Life. 1996. Life history of the American horseshoe crab (*Limulus polyphemus L.*) in Delaware Bay and its importance as a commercial resource. pp. 15-22. *Proceedings of the horseshoe crab forum: status of the resource*. (Farrell, J. and C. Martin, Eds.), Lewes, Delaware: University of Delaware Sea Grant College Program.
- Lockwood, S. 1970. The Horse Food Crab. *The American Naturalist*. Vol. 4. No. 5: 257-273.
- Sekiguchi, K. (1973). A normal plate of the development of the Japanese horseshoe crab : *Tachypleus tridentatus*. *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku, B*. Vol 15 (229) : 152-162.

- Sekiguchi, Koichi (ed.) 1998. *Biology of the Horseshoe Crabs*. Science House Co., Ltd., Tokyo.
- Schuster, Carl N., Jr., 1982. A pictorial review of the natural history and ecology of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, with reference to other Limulidae. *Physiology and Biology of Horseshoe Crabs: Studies on Normal and Environmentally Stressed Animals*. New York: Alan R. Liss, Inc.
- Shuster, Carl., Jr., 2000. *An Introduction to Horseshoe Crabs and Biodiversity*. NJT\$B Mad About Biodiversity Spring Conference at Reed's Beach, New Jersey, May 6, 2000.
- Walls, E.A., Berkson J., and S.A, Smith. 2002. The Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*: 200 Million Years of Existence, 100 Years of Study. *Reviews in Fisheries Science*, 10(1): 39-73.