

PROFIL EKSPRESI GEN DETERMINASI SEKS, BIOREPRODUKSI, FENOTIPE, DAN PERFORMA LOKOMOTORI PENYU LEKANG (*Lepidochelys olivacea*) YANG DIINDUKSI PADA SUHU INKUBASI BERBEDA

EXPRESSION PROFILE OF SEX DETERMINATION GENE, BIOREPRODUCTION, PHENOTYPE, AND LOCOMOTORY PERFORMANCES OF OLIVE RIDLEY, *Lepidochelys olivacea* INDUCED BY DIFFERENT INCUBATION TEMPERATURE

Alfred O.M. Dima^{1*}, Dedy D. Solihin², Wasmen Manalu³, dan Arief Boediono³

¹Jurusan Biologi FST Universitas Nusa Cendana (UNDANA), Kupang; ²Departemen Biologi FMIPA-IPB, Bogor; ³Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB, Bogor

*E-mail: onny_dima@yahoo.co.id

ABSTRACT

Sex determination in turtle species is not only based on genotype, but also rely on the incubation temperature. In addition, sexual differentiation takes place during the thermo-sensitive period (TSP). This study was conducted to determine the effects of incubation temperature on sex expression profile of determination gene, bioreproduction, phenotype, and locomotory performances of olive ridley turtle hatchlings. Fertile eggs incubated at two temperatures, namely feminine temperature (30-33°C), and masculine temperature (26-27°C). Value of cycle threshold (C_T) measured during TSP, i.e 23-25 embryonic development stage, and after TSP, i.e 26-27 embryonic development stage using real time PCR techniques. Comparison of gene expression at both incubation temperatures were analyzed by ANOVA, and Student's t test. Hatchling bioreproduction and phenotype measurement consist of the incubation period, embryo growth, morphometrics, and locomotory performances hatchlings were analyzed with regression analysis and Student's t test. The results showed expression of both aromatase and Rspnd 1 genes (which plays a role in ovarian differentiation) after the TSP that incubated at feminine temperature higher and different with masculine temperature. In conjunction with the bioreproduction and phenotype, the incubation period of feminine temperature shorter than that of masculine. Likewise, growth of the embryo of feminine temperature was faster than that of masculine. Incubation at feminine temperature significantly affect to carapace width, length and width of the plastron, long flippers and rear arms, long neck, and the frequency of the swing flippers.

Keywords: *thermo-sensitive period (TSP), gene expression, phenotype, *Lepidochelys olivacea**

ABSTRAK

Penentuan seks pada penyu tidak hanya berdasarkan genotipe, tetapi juga bergantung suhu inkubasi. Selain itu, diferensiasi seks berlangsung selama *thermosensitive period (TSP)*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh suhu inkubasi terhadap profil ekspresi gen determinasi seks, bioreproduksi, fenotipe, dan performa lokomotori tukik penyu lekang. Telur yang fertil diinkubasi pada dua suhu, yaitu suhu feminin (30-33°C), dan suhu maskulin (26-27°C). Pengukuran nilai *cycle threshold (C_T)* dilakukan selama *TSP*, yaitu stadia perkembangan embrio 23-25, dan setelah *TSP*, yaitu stadia perkembangan embrio 26-27 menggunakan teknik *real time PCR*. Perbandingan ekspresi gen pada kedua suhu inkubasi dianalisis dengan *ANOVA*, dan dilanjutkan dengan uji *t student*. Hasil pengukuran bioreproduksi dan fenotipe tukik, yaitu, pertumbuhan embrio, lama inkubasi, morfometrik, dan performa lokomotori tukik dianalisis dengan analisis regresi dan uji *t Student's*. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi gen aromatase dan Rspnd 1 (yang berperan dalam diferensiasi ovarium) setelah *TSP* dari embrio yang diinkubasi pada suhu feminin lebih tinggi dan berbeda dengan suhu maskulin. Berkaitan dengan bioreproduksi, maka periode inkubasi pada suhu feminin lebih singkat dari suhu maskulin. Demikian juga pertumbuhan embrio yang lebih cepat pada suhu feminin. Inkubasi pada suhu feminin berpengaruh nyata terhadap fenotipe tukik, yaitu lebar karapas, panjang dan lebar plastron, panjang *flipper* dan lengan belakang, panjang leher, dan frekuensi ayunan *flipper*.

Kata kunci: *thermo-sensitive period (TSP), ekspresi gen, fenotipe, *Lepidochelys olivacea**

I. PENDAHULUAN

Penyu leang (*Lepidochelys olivacea*), merupakan salah satu spesies penyu yang menyebar secara luas telah mengalami penurunan populasi dalam beberapa tahun terakhir terutama karena faktor antropogenik (Cornelius *et al.*, 2007). Oleh karena itu, penyu leang tergolong reptil yang dilindungi dengan kategori Appendix I CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*) (Shanker *et al.*, 2003). Penurunan populasi tersebut terlihat dari jumlah penyu leang betina yang mendarat di Taman Buru Bena, Pulau Timor sebagai lokasi pengambilan sampel telur untuk melestarikan telurnya selama 5 tahun (2010-2014) secara berurutan sebanyak 117, 202, 63, 28, dan 82 ekor. Demikian juga, jumlah tukik yang dilepas ke laut berturut-turut sebanyak 12.921, 20.499, 6.618, 2.355, dan 5.418 ekor. Faktor utama yang memengaruhi penurunan populasi penyu leang, yaitu adanya penangkapan penyu dewasa untuk dimanfaatkan daging, cangkang, dan pengambilan telur penyu di sarang alami.

Penyu termasuk reptil yang perkembangan gonad dan diferensiasi seksnya bergantung pada suhu (*Temperature-dependent sex determination, TSD*). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa suhu berperan secara langsung selama periode inkubasi, dan memengaruhi fenotipe tukik. Suhu sarang memengaruhi perkembangan embrio penyu, yaitu nisbah kelamin tukik (Standora and Spotila, 1985; Packard and Packard, 1988; Maulany *et al.*, 2012); kualitas tukik (Booth *et al.*, 2004), dan performa lokomotori tukik (Deeming, 2004; Booth, 2006; Burgess *et al.*, 2006; Ischer *et al.*, 2009). Adanya variasi fenotipe tersebut umumnya berimplikasi terhadap kebugaran tukik (Shine, 2004).

Penentuan seks spesies penyu sensitif terhadap suhu inkubasi dan hormon steroid eksogen selama *thermo-sensitive period*. *TSP* bervariasi antara spesies, tetapi umumnya terjadi sekitar sepertiga tengah perkembangan embrio, periode di mana diferensiasi sek-

sual gonad terjadi (Lang and Andrews, 1994; Ewert *et al.*, 1994). Jika induksi suhu maupun hormon steroid eksogen diberikan sebelum *TSP*, maka akan merubah perkembangan gonad penyu, dan sebaliknya induksi suhu maupun hormon steroid eksogen diberikan setelah *TSP* tidak akan merubah perkembangan dan diferensiasi gonad karena gonad telah definitif.

Penentuan seks pada tukik hingga usia muda masih sulit dilakukan, karena secara morfologi penyu tidak memiliki karakter dimorfisme dan kromosom seks heteromorfik (Wibbels *et al.*, 1991; Yao and Capel, 2005). Saat ini, salah satu tantangan utama dalam studi spesies *TSD* adalah untuk menemukan cara sederhana untuk menentukan seks tukik yang muncul dari sarang alami dan menaksir nisbah kelamin. Untuk itu, pendekatan penentuan seksual pada skala laboratorium mesti dicoba untuk ekstrapolasi hasil eksperimen laboratorium ke habitat alami.

Induksi suhu inkubasi memengaruhi ekspresi sejumlah gen yang terlibat dalam determinasi seks dan pada akhirnya akan memengaruhi nisbah kelamin pada tukik. Penentuan seks pada spesies penyu sensitif terhadap suhu dan hormon steroid eksogen selama *thermo-sensitive period*. *TSP* bervariasi antara spesies, tetapi umumnya terjadi sekitar sepertiga tengah perkembangan embrio, yaitu periode di mana diferensiasi seksual gonad terjadi (Wibbels *et al.*, 1991; Mrosovsky and Pieau, 1991). Dengan demikian, jika induksi suhu atau hormon steroid sebelum *TSP* pada telur penyu yang diinkubasi suhu feminin dan/atau maskulin, akan berpengaruh terhadap seks tukik. Sedangkan, jika dilakukan induksi tersebut setelah *TSP*, maka tidak terjadi perubahan seks tukik karena telah memasuki fase perkembangan embrio yang bersifat definitif.

Perubahan cepat ekspresi gen-gen determinasi seks yang mengikuti perubahan suhu inkubasi, menegaskan peran gen-gen tersebut dalam pembentukan gonad dan mengatur perkembangan organ (Shoemaker *et al.*, 2007). Sampai saat ini, terdapat 18 gen

yang terlibat dalam determinasi seks pada vertebrata dan bersifat konservatif dalam perkembangan testis dan ovarium dengan level ekspresi yang bervariasi antara spesies (Pieau *et al.*, 2001; Rhen and Schroeder, 2010).

Aromatase dan Rspnd 1 merupakan gen yang terlibat dalam perkembangan dan diferensiasi ovarium. Aromatase adalah enzim yang mengkonversi (androgen) androstenedion atau testosteron menjadi estrone, estrogen, atau 17β -estradiol (E_2) (Simpson *et al.*, 1994). Pada kura-kura dan penyu, suhu yang lebih tinggi menyebabkan peningkatan secara eksponen aktivitas aromatase, sebaliknya pada suhu yang lebih rendah aktivitas aromatase tetap rendah. Perbedaan level aromatase tersebut kemudian menjadi petunjuk perbedaan dari gonad tidak berbeda menjadi ovarium atau testis. (Pieau *et al.*, 2004; Sare *et al.*, 2004). Demikian pula, Rspnd 1 adalah gen yang ekspresinya lebih tinggi pada suhu feminin dan bertanggung jawab terhadap diferensiasi ovarium (Smith *et al.*, 2008), dengan mekanisme fisiologi jejaring kerja gen determinasi seks seperti aromatase (Shoemaker and Crews, 2008).

Hasil penelusuran pustaka menunjukkan belum tersedia informasi secara lengkap tentang profil ekspresi semua gen determinasi seks pada penyu *L. olivacea*, selain gen Dax1, Dmrt1, dan Sox 9 yang secara simultan terlibat dalam diferensiasi ovarium dan testis (Torres *et al.*, 2002).

Mengingat penelitian dan informasi tentang ekspresi gen determinasi seks, bioreproduksi, fenotipe, dan performa lokomotori penyu lekang yang diinkubasi secara buatan masih jarang dan relatif sedikit yang dilakukan pada perairan Indonesia, maka penelitian ini dapat dilakukan. Untuk itu pemahaman tentang hubungan antara suhu inkubasi, ekspresi gen determinasi seks selama tahap perkembangan pada embrio, bioreproduksi, fenotipe, dan juga performa lokomotori tukik adalah penting juga sehingga efektif untuk pengelolaan dan konservasi pada penyu.

II. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2013 sampai Mei 2014 di Kawasan Taman Buru Bena, Pulau Timor ($124^{\circ}13'$ – $124^{\circ}22'$ BT dan $10^{\circ}4'$ – $10^{\circ}10'$ LS). Tahapan inkubasi telur dilakukan pada inkubator, di Farm. PT. Al Nusa Kranggan Cibubur. Pengukuran profil ekspresi gen dilakukan di laboratorium biologi molekuler PSSP-LPPM IPB.

2.2. Metode Pengambilan sampel dan Analisis Data

Pengambilan sampel dilakukan di Kawasan Taman Buru Bena, Pulau Timor, NTT berupa telur penyu lekang, dan dibawa (kurang dari 3 x 24 jam) ke laboratorium untuk diinkubasi pada dua suhu, yaitu suhu feminin, yang akan menghasilkan seks betina (30 – 33°C) dan suhu maskulin, yang menghasilkan seks jantan (26 – 27°C). Selanjutnya, RNA total diekstraksi dari jaringan otak embrio penyu lekang pada stadia perkembangan embrio 23–27 untuk masing-masing suhu inkubasi. RNA total diekstraksi dan diisolasi menggunakan kit RNeasy Qiagen. sesuai prosedur perusahaan. Primer gen target, yaitu gen aromatase: qmAromatase *forward* ($5'$ -TGGGTTACAGTGCATTGGC- $3'$) dan qmAromatase *reverse* ($5'$ -GAGGCCTGGACCAGACAA- $3'$), dan untuk Rspnd-1: *forward* ($5'$ -TCGGT-GTTCGCAATCCAGAC- $3'$), *reverse* ($5'$ -TTTGTGCAAAAGTTTCGGCTG- $3'$). Untuk kontrol ekspresi, menggunakan gen β -actin: *forward*: $5'$ GCTC GTCGT-CGACCACGGCTC- $3'$ dan *reverse*: $5'$ -CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC- $3'$. Pengecekan produk RT-PCR dilakukan dengan menggunakan mesin Gel Doc (Bio Red) yang dielektroforesis pada 1,8% gel agarosa dan di *running* pada tegangan 100 volt selama 0,45 jam. Profil ekspresi gen dikuantifikasi menggunakan SYBR Green I dye (Invitrogen) dan dijalankan dengan mesin *real time PCR* iQ Real-Time PCR Detection System (Bio Red). Kondisi PCR

dilakukan pada 55°C (Aromatase), dan 54°C (Rspnd-1) selama 30 detik dan kondisi amplifikasi; denaturasi awal 94°C: 5 menit (sekali), *annealing* 94°C: 15 detik, ekstensi 72°C: 1 menit untuk 45 siklus dan 72°C: 1 menit untuk ekstensi akhir. Setiap sampel dijalankan secara duplo (duplikasi) dan nilai tengah *cycle threshold* (C_T) yang diperoleh digunakan untuk analisis. Nilai C_T yang lebih kecil menunjukkan bahwa gen target teramplifikasi lebih banyak (level ekspresi lebih tinggi).

Cycle threshold adalah siklus dimana nilai fluoresensi mulai meningkat dan terdeteksi pada *base line* grafik yang menunjukkan jumlah ampikon yang teramplifikasi pada siklus tersebut. Kriteria nilai C_T yang diperoleh pada setiap gen, yaitu nilai C_T yang diperoleh berbanding terbalik dengan level ekspresi gen. Artinya pada stadia perkembangan embrio yang sama, level ekspresi gen aromatase dan Rspnd-1 yang tinggi jika memiliki nilai C_T yang lebih kecil. Sebaliknya, pada stadia perkembangan embrio yang sama, nilai C_T yang lebih besar memiliki level ekspresi gen target yang lebih rendah pada kedua suhu inkubasi.

Pengukuran bioreproduksi terdiri dari periode inkubasi dan pertumbuhan embrio. Pengukuran fenotipe bobot badan tukik, ukuran morfometrik, dan performa lokomotori. Pertumbuhan embrio diukur dengan cara menghitung bobot embrio penyus (g) sesuai tahap perkembangan embrional. Pengukuran fenotipe, yaitu bobot badan tukik diukur segera setelah tukik menetas (g), dan 9 karakter morfometrik tukik, yaitu panjang karapas (PKs), lebar karapas (LKs), panjang plastron (PP), lebar plastron (LP), panjang lengan depan (PLD), panjang lengan belakang (PLB), panjang kepala (PK), lebar kepala (LK), dan panjang leher (PL). Performa lokomotori diukur meliputi frekuensi ayunan lengan depan dan kecepatan membalikkan tubuh.

Analisis ragam (ANOVA) digunakan untuk membandingkan level ekspresi mRNA pada berbagai stadia perkembangan embri-

onal pada kedua suhu inkubasi, yaitu suhu maskulin dan suhu feminin. Untuk membandingkan level mRNA pada suhu inkubasi feminin dan maskulin pada berbagai stadia perkembangan embrional digunakan uji *t Student*. Selanjutnya, analisis regresi digunakan untuk mengukur pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan embrio (g) pada setiap stadia perkembangan embrio. Sedangkan untuk membandingkan periode inkubasi, morfometrik tukik, frekuensi ayunan lengan depan (*flipper*) dan kecepatan membalikkan tubuh tukik pada dianalisis menggunakan uji *t Student* pada suhu maskulin dan suhu feminin. Pada hasil pengukuran ini dijadikan sebagai karakter pembeda antara tukik yang dinkubasi pada kedua suhu inkubasi.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

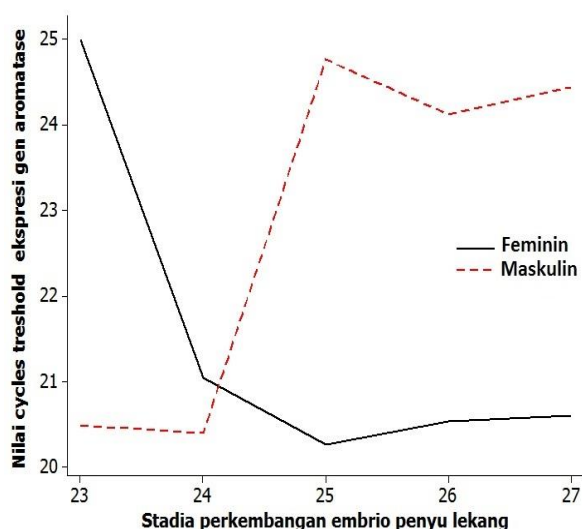
3.1. Hasil

3.1.1. Perbandingan Profil Ekspresi Gen Determinasi Seks

Profil ekspresi gen aromatase, dan Rspnd-1 pada otak embrio yang diinkubasi pada kedua suhu ditunjukkan secara berturut-turut pada Gambar 1 dan 2. Profil ekspresi gen aromatase (110 bp) terekspresi pada semua stadium perkembangan embrio dan pada kedua suhu inkubasi dengan intensitas yang berbeda. Pada stadia perkembangan embrio selama periode termosensitif (*TSP*) pada stadia 23 dan 24 terlihat ekspresi gen aromase pada suhu maskulin lebih tinggi dibandingkan dengan suhu feminin. Sebaliknya pada stadia perkembangan embrio 25-27, ekspresi gen aromatase suhu maskulin menunjukkan penurunan secara berturut-turut dibandingkan dengan ekspresi gen aromatase pada suhu feminin. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa ekspresi gen aromatase pada kedua suhu inkubasi tidak berbeda nyata (ANOVA, $p = 0,331$). Perbedaan yang tidak signifikan juga terlihat ketika membandingkan level mRNA aromatase pada periode termosensitif (stadia 23-25) terhadap periode setelah periode termosensitif (stadia

26-27) untuk suhu feminin. dan suhu maskulin (uji *t* Student $p = 0,335$). Sebaliknya, perbedaan signifikan level mRNA aromatase diamati ketika membandingkan stadia setelah periode termosensitif (stadia 26 dan 27) pada kedua suhu inkubasi (uji *t* Student, $p = 0,028$).

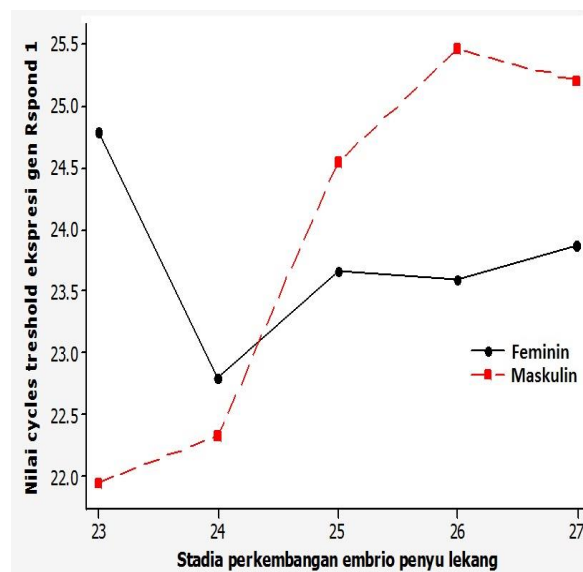
Analisis *RT-PCR* gen *Rspnd-1* dengan panjang fragmen 98 bp, menunjukkan intensitas yang hampir sama pada kedua suhu inkubasi. Berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa level ekspresi *Rspnd 1* suhu maskulin pada stadia perkembangan 23 dan 24 lebih rendah dibandingkan dengan suhu feminin. Sebaliknya, ekspresi *Rspnd-1* stadia perkembangan 25-27 pada suhu feminin lebih tinggi dari suhu maskulin.



Gambar 1. Profil ekspresi gen aromatase (C_T) pada tahapan embrional penyulekang.

Hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan tidak signifikan (ANOVA, $p = 0.852$) ekspresi gen *Rspnd-1* pada kedua suhu inkubasi. Hasil yang sama juga terlihat ketika membandingkan level mRNA *Respond-1* pada periode termosensitif (stadia 23-25) terhadap periode setelah periode termosensitif (stadia 26-27) untuk suhu feminin dan suhu maskulin (uji *t* Student, $p = 0.852$). Sebaliknya, level mRNA *Rspnd-1* pada stadia setelah periode termosensitif (26 dan

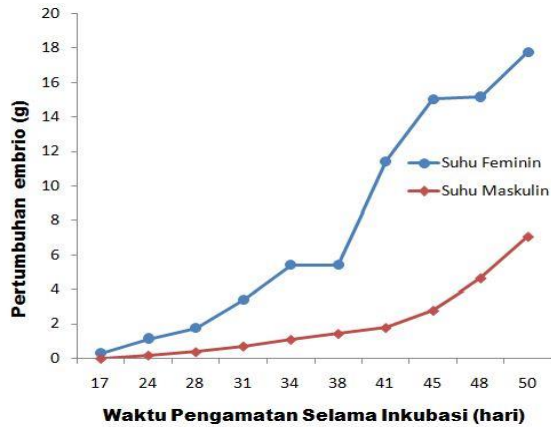
27) pada kedua suhu inkubasi menunjukkan berbeda nyata (uji *t* student, $p = 0,013$).



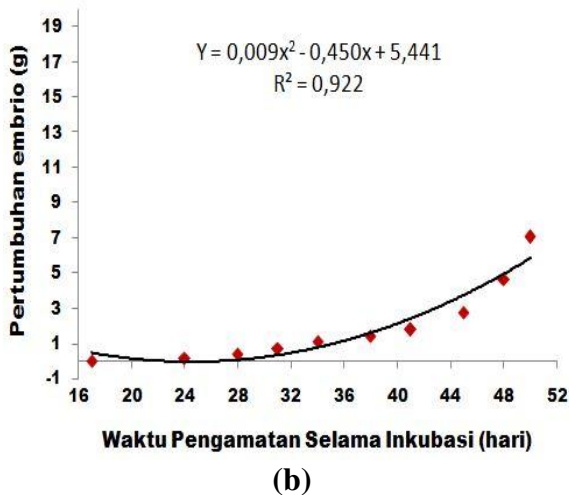
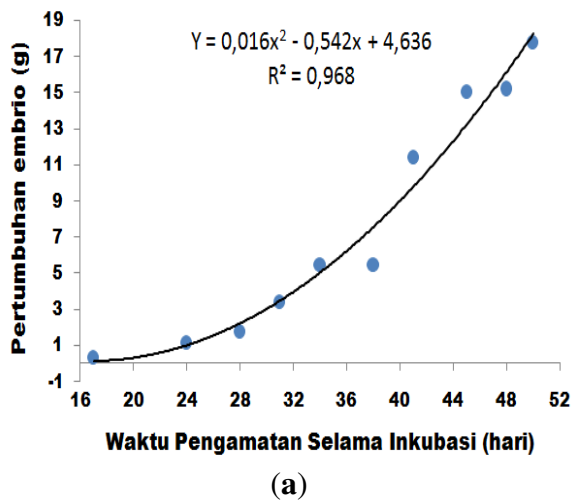
Gambar 2. Profil ekspresi gen *Rspnd 1* (C_T) pada tahapan embrional penyulekang.

3.1.2. Bioreproduksi, Fenotipe, dan Performa Lokomotori Tukik Penyulekang yang Diinkubasi pada Suhu Berbeda

Hasil penelitian menunjukkan bahwa periode inkubasi untuk telur yang diinkubasi pada suhu feminin berkisar 49-52 hari. Telur yang diinkubasi pada suhu maskulin berkisar 71-73 hari. Selanjutnya untuk mengetahui pertumbuhan embrional penyulekang telah dilakukan pengukuran bobot embrio pada seluruh stadia perkembangan embrional. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara empiris pertumbuhan embrio (g) penyulekang yang diinkubasi pada suhu feminin lebih besar dari suhu maskulin (Gambar 3). Berdasarkan hasil analisis regresi terlihat bahwa pertumbuhan embrio untuk perlakuan suhu feminin sebesar $Y_f = 0,016X^2 - 0,542X + 4,636$ dengan nilai koefisien determinan (R^2) sebesar 96,80%. Sedangkan pada perlakuan suhu maskulin sebesar $Y_m = 0,009X^2 - 0,450X + 5,441$ dengan koefisien determinan (R^2) sebesar 92,20%.



Gambar 3. Pertumbuhan embrio penyus lekang (g) yang diinkubasi pada dua suhu yang berbeda.



Gambar 4. Pertumbuhan embrio penyus lekang (g) yang diinkubasi pada dua suhu feminin (a) dan suhu maskulin (b).

Pengukuran morfometri dan performans tukik penyus lekang ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil pengujian perbandingan rata-rata ke-10 karakter morfometrik tukik yang diinkubasi pada suhu berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0,05$) untuk ke-7 karakter secara berturut-turut, yaitu bobot badan (BB), lebar karapas (LKs), panjang plastron (PP), lebar plastron (LP), panjang lengan depan (PLD), panjang lengan belakang (PLB), dan panjang leher (PL). Sedangkan untuk karakter lainnya, yaitu karakter panjang karapas (PKs), panjang kepala (PK), dan lebar kepala (LK), tidak berbeda ($p > 0,05$).

Hasil analisis statistik menunjukkan frekuensi ayunan tukik yang diinkubasi suhu feminin ($63,02 \pm 6,52$ kali per menit) berbeda nyata ($p = 0,00$) tukik yang diinkubasi pada suhu maskulin ($47,41 \pm 1,89$ kali per menit). Sedangkan kecepatan membalikkan tubuh (KB) tukik pada kedua suhu inkubasi menunjukkan tidak berbeda nyata ($p = 0,48$).

3.2. Pembahasan

3.2.1. Perbandingan Profil Ekspresi Gen Determinan Seks

Hasil penelitian menunjukkan mRNA aromatase yang berasal dari jaringan otak terekspresi pada semua stadia perkembangan (Gambar 1). Analisis statistik menunjukkan bahwa level ekspresi mRNA aromatase pada kedua suhu inkubasi untuk semua stadia perkembangan maupun pada periode sensitif suhu (*TSP*), yaitu stadia 23-25 tidak berbeda nyata. Sebaliknya, level mRNA aromatase setelah *TSP* pada embrio yang diinkubasi pada suhu feminin lebih tinggi dan berbeda nyata dengan suhu maskulin.

Berdasarkan hasil analisis tersebut, menunjukkan bahwa induksi suhu inkubasi berpengaruh terhadap profil ekspresi gen aromatase pada periode setelah *TSP* dengan level mRNA lebih tinggi (nilai C_T lebih kecil) pada tukik yang diinkubasi pada suhu feminin. Beberapa studi pada reptil lainnya menunjukkan hasil yang sama dengan pene-

Tabel 1. Bioreproduksi, fenotipe, dan performa lokomotori tukik penyu lekang yang diinduksi pada dua suhu inkubasi.

Variabel	Suhu inkubasi		Uji statistik
	Feminin 30-33°C ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Maskulin 26-27°C ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	
Lama inkubasi (hari)	50,20±0,89	71,91±0,70	$p=0,00$
Daya tetas (%)	83,33	61,11	-
Frekuensi ayunan <i>flipper</i> (kali/menit)	63,02±6,52	47,41±1,89	$p=0,00$
Kecepatan membalikkan tubuh (detik)	2,34±0,87	2,54±1,01	$p=0,48^{in}$
Bobot badan (g)	17,77±1,34	18,90±1,26	$p=0,02$
Panjang karapas (cm)	3,73 ±0,12	3,75±0,14	$p=0,79^{in}$
Lebar karapas (cm)	3,22 ±0,09	2,83 ±0,15	$p=0,00$
Panjang plastron (cm)	2,99 ±0,14	2,69±0,16	$p=0,00$
Lebar plastron (cm)	2,59 ±0,10	2,31±0,11	$p=0,00$
Panjang lengan depan (cm)	3,55 ±0,14	3,07 ± 0,1	$p=0,00$
Panjang lengan belakang (cm)	1,61 ±0,07	1,51 ±0,11	$p=0,01$
Panjang kepala (cm)	1,45 ±0,05	1,44±0,04	$p=0,84^{in}$
Lebar kepala (cm)	0,87 ±0,01	0,90±0,00	$p=0,12^{in}$
Panjang leher (cm)	0,93 ±0,11	0,83±0,10	$p=0,02$

Keterangan: *in* = tidak berbeda nyata

tian ini dilaporkan pada spesies *TSD*, seperti kura-kura *T. scripta* (Murdock and Wibbels, 2003), *Alligator mississippiensis* (Gabriel *et al.*, 2001), *C. picta* dan spesies *GSD*, kura-kura *Apolone mutica* (Valenzuela and Shikano, 2007) menunjukkan level mRNA aromatase yang tidak berbeda antara suhu feminin dan suhu maskulin selama periode termosensitif, tetapi lebih tinggi pada betina setelah periode termosensitif. Hasil penelitian ini memberikan data yang menunjukkan bahwa suhu inkubasi dapat menekan atau mengstimulasi ekspresi aromatase pada sejumlah reptil, termasuk penyu lekang yang penentuan seks bergantung pada suhu inkubasi.

Ekspresi gen aromatase dan aktivitasnya dapat diatur oleh lingkungan, misalnya suhu dan hormon sintetik (Orlando *et al.*, 2002). Sebagai contoh, pada beberapa jenis ikan dan reptil, peningkatan suhu air setelah stadia perkembangan awal dapat meningkatkan ekspresi gen aromatase dan aktivitas enzimatis sehingga akan menghasilkan seks betina, sebaliknya, pengaruh suhu tersebut dapat dihambat dengan penggunaan inhibitor aromatase yang akan menekan ekspresi gen

aromatase sehingga akan menghasilkan seks jantan (Tsai *et al.*, 2003; Rhen *et al.*, 2007).

Diferensiasi seks gonad pada penyu *TSD* berlangsung selama *TSP*. Pieau *et al.* (1999) menyatakan bahwa aromatase adalah kompleks enzim yang merubah androgen menjadi estrogen. Pada awal *TSP*, mRNA reseptor estrogen diekspresikan pada gonad. Ketika tahap diferensiasi ovarium, transkrip mRNA reseptor estrogen ditemukan di bagian medula dan konteks korda ovarium, sebaliknya pada diferensiasi testis hanya ditemukan pada bagian medula korda testikular (Bergeron *et al.*, 1998). Saat diferensiasi ovarium, epitel germinal menebal karena adanya proliferasi sel epitel dan sel germinal hingga membentuk kantong oogonia dan akhirnya membentuk ovarium definitif. Sebaliknya, diakhir *TSP* tahap perkembangan embrio, diameter korda testikuler semakin menurun sebagai akibat menurunnya kandungan protein dalam testis (Pieau *et al.*, 1999). Crews *et al.* (1991) dan Bergeron *et al.* (1994) menyatakan bahwa estrogen alami dan sintetik dapat menginduksi diferensiasi ovarium pada suhu feminin secara normal

selama *TSP*. Pada ikan *Oreochromis niloticus*, level ekspresi mRNA P450aromA diperlukan untuk diferensiasi ovarium dan menghambat diferensiasi testikuler. Implikasinya, suhu inkubasi dapat mengatur ekspresi dan aktivitas gen aromatase (Kitano *et al.*, 2000; Pieau and Dorizzi, 2004).

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan level ekspresi gen aromatase yang diinduksi suhu selama masa inkubasi meningkatkan produksi estrogen yang berperan dalam diferensiasi ovarium selama *TSP* dan mempertahankan struktur ovarium setelah *TSP* pada suhu feminin, sebaliknya induksi suhu maskulin selama perkembangan embrio berperan dalam diferensiasi testis.

Visualisasi gel elektroforesis gen Rspnd-1 konsisten muncul di semua stadia perkembangan embrio penyu lekung dengan intensitas yang berbeda. Demikian pula analisis *real-time* PCR menunjukkan bahwa ekspresi mRNA Rspnd 1 yang berasal dari jaringan otak terekspresi pada semua stadia perkembangan (Gambar 2). Hasil analisis statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan level ekspresi mRNA Rspnd 1 antara yang diinkubasi pada suhu maskulin dan suhu feminin pada seluruh stadia perkembangan embrional. Demikian juga perbandingan level ekspresi Rspnd 1 antara periode *TSP* (stadia 23-25) pada kedua suhu inkubasi. Meskipun demikian, level mRNA Rspnd 1 setelah *TSP* (stadia 26-27) pada embrio yang diinkubasi pada suhu feminin lebih tinggi dan berbeda dengan suhu maskulin. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Rspnd-1 berfungsi, yaitu mempertahankan ekspresi gonad betina dan menekan diferensiasi dan perkembangan testis.

Smith *et al.* (2008) menjelaskan bahwa ekspresi Rspnd-1 pada sejumlah vertebrata, seperti tikus, ayam, dan kura-kura (*Trachemys Scripta*), menunjukkan peranan yang konservatif dalam perkembangan ovarium. Pada *T. Scripta*, reptil yang determinasi seks tergantung pada suhu, ekspresi Rspnd-1 secara signifikan lebih tinggi di

awal *TSP* dan terus meningkat pada suhu feminin (31°C) dibandingkan suhu maskulin (26°C). Selanjutnya, ekspresi Rspnd 1 menurun secara signifikan pada embrio yang suhu inkubasinya diganti dari suhu feminin ke suhu maskulin. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi Rspnd-1 dipengaruhi oleh suhu, baik pada suhu feminin dan pergantian suhu inkubasi. Demikian juga pada spesies ikan *Oryzias latipes*, Zhou *et al.* (2012) menemukan tiga anggota famili Rspnd (1-3) yang menunjukkan profil ekspresi dimorfik secara seksual pada gonad betina di semua stadium perkembangan embrio. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi Rspnd 1 dipengaruhi oleh suhu, baik pada suhu feminin dan pergantian suhu inkubasi, dan gen Rspnd sangat diperlukan untuk diferensiasi ovarium. Kocer *et al.* (2008) menyatakan bahwa gen Rspnd-2 berperan sebagai gen kandidat untuk diferensiasi ovarium.

3.2.2. Bioreproduksi, Fenotipe, dan Performa Lokomotori Tukik Penyu Lekang yang Diinkubasi pada Suhu Berbeda

Berdasarkan hasil penelitian terlihat bahwa telur yang diinkubasi pada suhu feminin lebih singkat periode inkubasi (49-52 hari) dibandingkan dengan telur yang diinkubasi pada suhu maskulin (71-73 hari). Hasil penelitian ini sejalan dengan Mrosovsky *et al.* (1999) yang menyatakan bahwa lama inkubasi menjadi lebih singkat pada sarang suhu feminin, sebaliknya, lama inkubasi menjadi lebih panjang pada sarang suhu maskulin. Durasi embriogenesis yang lebih pendek dan laju pertumbuhan embrio penyu lebih cepat disebabkan tingkat metabolisme lebih tinggi pada suhu feminin dibandingkan dengan telur penyu yang diinkubasi pada suhu maskulin (Packard and Packard 1988). Adanya pola pertumbuhan yang lebih tinggi pada embrio yang diinkubasi pada suhu feminin juga akan memengaruhi ukuran morfometrik tukik yang akan dihasilkan.

Suhu inkubasi telur penyu yang ideal agar embrio tumbuh dengan baik berkisar antara 24-33°C. Masa inkubasi bergantung pada suhu pasir di pantai. Marquez (1990) menyatakan bahwa suhu optimal untuk penetasan telur penyu sisik secara semialami adalah 28-32°C. Jika suhu selama masa inkubasi jauh lebih rendah atau lebih tinggi dari suhu optimal tersebut maka hasil penetasan akan kurang dari 50%. Hasil penelitian menunjukkan ada korelasi negatif antara suhu inkubasi dengan durasi periode inkubasi.

Jayasuari *et al.* (1994) menjelaskan bahwa penyu terrapin diamondback (*Malaclemys terrapin*) yang diinkubasi pada suhu $\geq 31^\circ\text{C}$ menghasilkan tukik betina dengan lama inkubasi 45 hari. Telur yang diinkubasi pada suhu $\leq 27^\circ\text{C}$ menghasilkan tukik jantan dengan lama inkubasi 60 hari.

Hasil analisis regresi pertumbuhan embrio yang diinkubasi pada kedua suhu inkubasi (Gambar 4) menunjukkan adanya perbedaan nilai koefisien regresi (bi) pada masing-masing suhu inkubasi. Nilai koefisien regresi pada suhu feminin ($0,016X^2 - 0,542X$) lebih besar dari koefisien regresi pada suhu maskulin ($0,009X^2 - 0,450X$). Hal ini berarti, bahwa pertumbuhan embrio yang diinkubasi pada suhu feminin selama tahap perkembangan embrio lebih cepat dibandingkan embrio yang diinkubasi pada suhu maskulin. Secara biologi, tingginya laju pertumbuhan embrio pada suhu feminin menunjukkan kuning telur sebagai cadangan energi lebih cepat dikonversi menjadi jaringan selama perkembangan embrionik.

Secara umum, pertumbuhan embrio yang diinkubasi pada suhu feminin memiliki kecenderungan lebih cepat dibandingkan dengan embrio yang diinkubasi pada suhu maskulin, terutama pada hari pengamatan 38-50 periode inkubasi. Jika dikaitkan dengan periode inkubasi, terlihat bahwa pada suhu feminin (30-33°C), pertumbuhan embrio lebih cepat dengan periode inkubasi lebih pendek (49-52 hari), dan sebaliknya pada suhu inkubasi maskulin (26-27°C), pertumbuhan

embrio lebih lambat dengan periode inkubasi lebih panjang (71-73 hari). Periode inkubasi lebih panjang dan lebih banyak kuning telur dikonversi menjadi jaringan tukik sehingga menghasilkan ukuran tubuh lebih besar. Akan tetapi, tukik yang ditetaskan memiliki performa berenang yang lebih lambat karena cadangan energi yang berasal dari kuning telur yang mesti disimpan justru telah dikonversi untuk proses organogenesis (Booth and Astil 2001). Transformasi dari zigot ke tukik diperpanjang oleh kondisi dingin karena suhu mengatur tingkat aktivitas kimia, termasuk yang berkontribusi terhadap tingkat metabolisme secara keseluruhan (Hoegh-Guldberg and Pearse, 1995).

Berdasarkan pengukuran morfometri panjang lengan depan (PLD) tukik menunjukkan perbedaan signifikan di antara kedua suhu inkubasi. Hal yang sama juga ditunjukkan pada kecepatan mendayung (*power stroke*) dari *flipper* tukik yang berbeda pada kedua suhu inkubasi. Rendahnya frekuensi ayunan lengan depan pada tukik yang diinkubasi pada suhu rendah (26-27°C) diduga juga berkaitan dengan meningkatnya efisiensi konversi cadangan energi (kuning telur) pada jaringan akibat lamanya periode inkubasi dan durasi embriogenesis penyu lelang. Kondisi ini berdampak langsung pada berkurangnya ketersediaan energi pada tukik yang ditetaskan dan akan mengurangi frekuensi ayunan lengan depan (Packard and Packard, 1988).

Pada penelitian ini juga dilakukan perbandingan performa lokomotori tukik pada kedua suhu inkubasi. Pada suhu feminin, frekuensi ayunan *flipper* lebih banyak (63.02 ± 6.52) dibandingkan dengan tukik yang ditetaskan pada suhu maskulin (47.41 ± 1.89). Hasil ini sejalan dengan ukuran morfometri panjang *flipper* pada suhu feminin lebih panjang dengan tukik pada suhu maskulin. Gyuris (2000) dan Pilcher *et al.* (2000) menyatakan bahwa performa lokomotori penyu hijau adalah faktor utama dalam menentukan peluang penyu untuk bertahan hidup, yaitu pada periode saat menetas dan

muncul dari sarang hingga mencapai pantai perairan yang lebih dalam. Tukik penyu hijau yang lebih besar memiliki tingkat kelangsungan hidup yang tinggi karena kurang rentan dimangsa predator (Gyuris, 2000). Kemampuan berenang yang cepat berkaitan dengan ukuran *flipper*, karena tukik lebih besar memiliki tungkai yang lebih panjang dan melangkah lebih cepat (Janzen *et al.*, 2000). Booth (2006) menyatakan bahwa ukuran telur berkorelasi dengan ukuran *flipper*. Hal ini disebabkan pada suhu maskulin, periode inkubasi lebih panjang dan lebih banyak kuning telur dikonversi menjadi jaringan tukik, sehingga menghasilkan ukuran tubuh lebih besar. Akan tetapi, tukik yang ditetaskan memiliki performa berenang yang lebih lambat karena cadangan energi yang berasal dari kuning telur yang mesti dicadangkan justru telah dikonversi untuk proses organogenesis (Booth and Astil, 2001). Transformasi dari zigot ke tukik diperpanjang oleh kondisi dingin karena suhu mengatur tingkat aktivitas kimia, termasuk yang berkontribusi terhadap tingkat metabolisme secara keseluruhan (Hoegh-Guldberg and Pearse, 1995). Berkaitan dengan performa berenang, hasil pengujian laboratorium pada tukik penyu hijau dalam air laut pada beberapa suhu inkubasi, menunjukkan perbedaan yang nyata, yaitu tukik dari telur diinkubasi pada 25,5°C dan 26°C memiliki frekuensi kecepatan lengan depan mendayung (*power stroke*) dan daya tahan (*survival*) yang lebih rendah dari tukik yang diinkubasi pada 28°C dan 30°C. Perbedaan ini disebabkan oleh kelelahan otot-otot tukik yang lebih cepat pada suhu inkubasi rendah (Burgess *et al.*, 2006).

Implikasi dari data bioreproduksi, fenotipe, dan performa lokomotori tukik penyu lekang, dapat membantu dalam identifikasi jenis kelamin penyu lekang, dan memprediksi nisbah kelamin tukik yang dihasilkan di sarang alami. Sebagai contoh, hasil pengamatan rata-rata lama inkubasi pada inkubasi buatan pada suhu feminin (50,20±0,89 hari), ketujuh ukuran morfometrik yang ber-

beda nyata, dan frekuensi ayunan *flipper* yang lebih banyak (63,02±6,52 kali per menit) dapat dijadikan sebagai parameter dimorfisme seks. Demikian juga, dengan pengukuran ekspresi kedua gen determinasi seks, yaitu aromatase dan *Rspnd 1* untuk diferensiasi ovarium pada penyu lekang. Berkaitan dengan pemanasan global yang akan meningkatkan suhu lingkungan, maka induksi suhu maskulin merupakan langkah mitigasi dengan melakukan *restocking* tukik sebagai pengkayaan populasi pada suhu maskulin (26-27°C) sehingga kelangsungan populasi penyu di alam terjaga dengan seimbang.

IV. KESIMPULAN

Induksi suhu inkubasi memberikan pengaruh terhadap ekspresi gen determinasi seks, aromatase dan *Rspnd 1* pada stadia perkembangan embrio setelah periode termosensitif (*TSP*) dengan level ekspresi yang lebih tinggi pada suhu feminin. Hasil yang sama juga terlihat pada pengukuran periode inkubasi, pertumbuhan embrio, ketujuh karakter morfometrik, dan frekuensi ayunan *flipper* tukik penyu lekang yang menunjukkan suhu feminin merupakan suhu inkubasi yang terbaik penyu lekang sebagai spesies *TSD* dan dapat digunakan sebagai untuk dimorfisme seks pada sarang alami.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Kepala Balai Besar Konservasi Sumber Daya Alam Wilayah I NTT beserta staf, Direktur dan staf PT. Al Nusa Farm. Kranggan, Cibubur, dan Kepala dan staf Pusat Studi Satwa Primata-LPPM IPB Bogor yang bersedia membantu selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

Bergeron, J.M., M. Gahr, K. Horan, T. Wibbels, and D. Crews. 1998. Cloning and in situ hybridization analysis

- of estrogen receptor in the developing gonad of the reared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Development, Growth and Differentiation*. 40(2):243-254. Doi :10.1046/j.1440-169X.1998.00013. x.
- Booth, D.T. 2006. Influence of incubation temperature on hatchling phenotype in reptiles. *Physiol. Biochem. Zool.* 79:274–281. doi:10.1086/499988.
- Booth, D.T. and K. Astill. 2001. Incubation temperature, energy expenditure and hatchling size in the green turtle (*Chelonia mydas*), a species with temperature-sensitive sex determination. *Aust. J. Zool.* 49:389–396. doi:10.1071/ZO01006.
- Burgess, E., D.T. Booth, and J.M. Lanyon. 2006. Swimming performance of hatchling green turtles is affected by incubation temperature. *Coral Reefs*, 25:341-349.
- Cornelius, S.E., R. Arauz, J. Frete, M.H. Godrey, R. Márquez, and K. Shanker. 2007. Effect of land-based harvest of *Lepidochelys*. In: Plotkin, P.T. (ed.). *Biology and conservation of ridley sea turtles*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 231-251pp.
- Deeming, D.C. 2004. Post hatching phenotypic effects of incubation in reptiles, In: Deeming, D.C. (ed.). *Reptilian incubation: environment, evolution and behavior*. Nottingham University Press, Nottingham. 229-252pp.
- Eckrich, C.E. and D.W. Owens. 1995. Solitary versus arribadas nesting in the olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*): a test of the predator-satiation hypothesis. *Herpetologica*, 51:349-354.
- Ewert, M.A., D.R. Jackson, and C.E. Nelson. 1994. Pattern of temperature dependent sex determination turtles. *The J. of Experimental Zoology*, 270:3-15.
- Gabriel, W.N., B. Blumberg, S. Sutton, A.R. Place, and V.A. Lance. 2001. Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures. *J. of Experimental Zoology*, 290:439-448.
- Gyuris, E. 2000. The relationship between body size and predation rates on hatchlings of the green turtle (*Chelonia mydas*): is bigger better. In: Pilcher *et al.* (eds.). *Sea turtles of the Indo Pacific: research management and conservation*. Academic Press, New York, 143-147pp.
- Hoegh-Guldberg, O. and J.S. Pearse. 1995. Temperature, food availability, and the development of marine invertebrate larvae. *Am. Zool.*, 35:415-425.
- Honarvar, S., M.P. O'Connor, and J.R. Spotila. 2008. Density dependent effects on hatching success of the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*. *Oecologia*, 157:221-230.
- Ischer, T., K. Ireland, and D.T. Booth. 2009. Locomotion performance of green turtle hatchlings from the Heron Island Rockery, Great Barrier Reef. *Marine Bio*, 156:1399-1409.
- Janzen, F.J., J.F. Tucker, and G.L. Paukstis. 2000. Experimental analysis of an early life-history stage: selection on size of hatchling turtles. *Ecology*, 81:2290-2304.
- Jeyasuriya, P., W.M. Roosenburg, and A.R. Place. 1994. Role of P-450 aromatase in sex determination of the diamondback terrapin, *Malaclemys terrapin*. *J. Exp. Zool.* 270:95-111.
- Kitano, T., K. Takamune., Y. Nagahama, and S.I. Abe. 2000. Aromatase inhibitor and 17 alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Pa-*

- ralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Devel*, 56:1-5.
- Kocer, A., I. Pinheiro, M. Pannetier, L. Renault, P. Parma, O. Radi, K.A. Kim, G. Camerino, and E. Pailhoux. 2008. R-spondin-1 and FOXL2 act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation. *BMC Dev. Biol*, 8:36. doi:10.1186/1471-213X-8-36.
- Lang, J.W. and H.V. Andrews. 1994. Temperature dependent sex determination in Crocodylians. *The J. of Experimental Zoology*, 270:28-44.
- Marquez, M.R. 1990. Sea turtles of the world an annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Species Catalog, FAO Fisheries Syn. 81p.
- Maulany, R.I., D.T. Booth, and G.S. Baxter. 2012. Emergence success and sex ratio of natural and relocated nests of olive ridley turtles from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia. *Copeia*, 4:738-747.
- Moreno-Mendoza N., V. Harley, and H. Merchant-Larios. 1999. Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male or female-promoting temperatures. *J. Exp Zool.*, 284:705-710.
- Mrosovsky, N. and C.L. Yntema. 1980. Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation practices. *Biological Conservation*, 18:271-280.
- Mrosovsky, N., C. Baptistotte, and M.H. Godfray. 1999. Validation of incubation duration as an index of the sex ration hatchling sea tyrtle. *Can. Journal Zoology*, 77:831-835.
- Murdock, C. and T. Wibbels. 2003. Cloning and expression of aromatase in a turtle with temperature dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinolog*, 130: 109-119.
- Orlando, E.F., W.P. Davis, and L.J. Guillette. 2002. Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent. *Environmental Health Perspectives*, 4(3): 429-433.
- Packard, G.C. and M.J. Packard. 1988. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. In: Ecology B. Gans, *et al.* (eds.). Biology of the reptilian. Alan R. Liss Press, New York. 523-605pp.
- Pilcher, N.J., S. Enderby, T. Stringell, and L. Bateman. 2000. Nearshore turtle hatchling distribution and predation. In: Pilcher *et al.* (eds.). Sea turtles of the Indo-Pacific: research, management and conservation. Academic Press, New York. <http://www.arbec.com.my/sea-turtles/art.htm>. [Retrieved on 10 April 2013]. 113-119pp.
- Pieau, C., M. Dorizzi, and N.R. Mercier. 1999. Temperature dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55:887-900.
- Pieau, C., M. Dorizzi, and N.R. Mercier. 2001. Temperature dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *EXS.*, 91:117-141.
- Pieau, C. and M. Dorizzi. 2004. Oestrogens and temperature dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J. Endocrin.*, 181:367-377.
- Rhen, T., K. Metzger, A. Schroeder, and R. Woodward. 2007. Expression of putative sex-determining genes during the of gonad development in the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. *Sexual Development*, 1:255-270. doi: 10.1159/000104775.
- Rhen, T. and A. Schroeder. 2010. Molecular mechanisms of sex determination in reptiles. *Sexual Development*, 4:16-28.
- Sarre, S.D., A. Georges, and A. Quinn. 2004. The ends of a continuum: genetic

- and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays*, 26:639-645.
- Shanker, K., B. Pandav, and B.C. Choudhury. 2003. An assessment of the olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*) nesting population in Orissa, India. *Biological Conservation*, 115: 149-160.
- Shine, R. 2004. Adaptive consequences of developmental plasticity, *In*: Deeming D.C. (ed.). *Reptilian incubation: environment, evolution and behaviour*, Nottingham University Press, Nottingham. 187-210pp.
- Shoemaker, C.M., J. Queen, and D. Crews. 2007. Temperature-responsive genes involved in gonadogenesis. *Molecular Endocrinology*, 21(11):1-15. doi:10.1210/me.2007-0263.
- Shoemaker, C.M. and D. Crews. 2008. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cells and Developmental Biology*. 20(3):293-303.
- Simpson, E.R., M.S. Mahendroo, G.D. Means, M.M. Kilgore, M.M. Hinselwood, S. Graham-Lorence, B. Amarneh, Y. Ito, C.R. Fisher, M.D. Michael, C.R. Mendelson, and S.E. Bulun. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrinol. Rev.*, 15:342-355.
- Smith, C.A., C.M. Shoemaker, K.N. Roeszler1, J. Queen, D. Crews, and A.H. Sinclair. 2008. Cloning and expression of RSpondin-1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Developmental Biology*, 8:72 doi:10.1186/1471-213X-8-72.
- Standora, E.A. and J.R. Spotila. 1985. Temperature dependent sex determination in sea turtles. *Copeia*, 3:711-722.
- Torres-Maldonado, L., A.L. Piedra, N. Moreno-Mendoza, A.M. Valencia, A.M. Martinez, and H. Merchant-Larios. 2002. Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 129:20-26.
- Tsai, M.J. and B.W. O'Malley. 1994. Molecular mechanism of action of steroid /thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.*, 63:451-489.
- Valenzuela, N. and T. Shikano. 2007. Embryological ontogeny of aroma-tase gene expression in *Chrysemys picta* and *Apalone mutica* turtles: comparative patterns within and across temperature-dependent and genotypic sex determining mechanisms; *Dev. Genes. Evol.*, 217:55-62.
- Wallace, B.P., P.R. Sotherland, J.R. Spotila, R.D. Reina, B.F. Franks, and F.V. Paladino. 2004. Biotic and abiotic factors affect the nest environment of embryonic leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*. *Physiol. Biochem. Zool.*, 77:423-432.
- Wibbels, T., J.J. Bull, and D. Crews. 1991. Chronology and morphology of temperature dependent sex determination. *J. Exp Zool.*, 260:371-381.
- Yao, H.H.C. and B. Capel. 2005. Temperature, genes, and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. *J. of Biochemistry*, 138:5-12.
- Zhou, L., T. Charkraborty, X.Yu, L.Wu, G. Liu, S. Mohapatra, D.Wang, and Y. Nagahama. 2012. R-spondins are involved in the ovarian differentiation in a teleost, medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev. Biol.*, 12:36. doi:10.1186/1471-213X-12-36.
- Dierima* : 11 Maret 2015
Direview : 1 Juni 2015
Disetujui : 23 Juni 2015

