

## SUHU INKUBASI MEMPENGARUHI LEVEL EKSPRESI *SOX9* PADA TAHAP AWAL PERKEMBANGAN GONAD EMBRIO *Chelonia mydas* (PENYU HIJAU)

Syamsul Bahri

Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan PMIPA FKIP Universitas Mataram  
Jl. Majapahit 62 Mataram, 83125

**Abstrak :** Salah faktor penting yang diduga terlibat dalam penentuan jenis kelamin hewan TSD adalah Sox9. Protein ini berperan dalam cascade determinasi seks. Ketika kadar protein Sox9 mencapai nilai ambang tertentu maka gonad indiferen akan memasuki jalur diferensiasi testis. Penelitian ini bertujuan mengamati level ekspresi gen tersebut pada tahap awal perkembangan gonad *Chelonia mydas* yang termasuk dalam kelompok hewan TSD. Sebagian telur diinkubasi pada suhu  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$  untuk menghasilkan 100% individu betina (Suhu Feminisasi, SF), sedangkan telur lainnya diinkubasi pada suhu  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  untuk menghasilkan 100% individu jantan (Suhu Maskulinisasi, SM). Pengamatan dilakukan pada level mRNA yang terekspresi sejak periode pra TSP hingga TSP akhir. Level ekspresi Sfl kompleks adrenal-gonad-ginjal dari embrio tahap perkembangan 12, 14, 16 (pra TSP), 17, 19 dan 22 (TSP) yang diinkubasi pada suhu feminisasi ( $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) atau suhu maskulinisasi ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) dideteksi dengan menggunakan metode RT-PCR. Sebagai pembanding digunakan *housekeeping gene*  $\beta$ -actin. Hasil amplifikasi di elektroforesis pada Agarose-TAE kemudian di foto dengan kamera digital. Densitas larik DNA yang terbentuk pada masing-masing tahap perkembangan embrio dan perlakuan ditentukan dengan menggunakan software ScionImage. Rata-rata bacaan pada setiap larik di visualisasi dalam bentuk diagram garis. Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa suhu inkubasi mempengaruhi level ekspresi Sox9. Level ekspresi Sox9 tampak lebih tinggi pada embrio yang diinkubasi pada SM ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) dibandingkan dengan level ekspresi Sox9 embrio yang diinkubasi pada SF ( $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Perbedaan level ekspresi tersebut terlihat sejak tahap pra TSP tengah hingga TSP tengah. Perbedaan terbesar terlihat menjelang embrio memasuki tahap TSP. Perbedaan level ekspresi Sox9 pada tahapan tersebut menunjukkan bahwa Sox9 memainkan peran yang penting dalam proses awal determinasi seks gonad *Chelonia mydas*.

**Kata kunci :** Sox9, Temperature-dependent Sex Determination (TSD), Thermosensitive period (TSP), *Chelonia mydas*.

## INCUBATION TEMPERATURE INFLUENCE EXPRESSION PATTERN OF SOX9 IN THE EARLY STAGE OF GONADAL DEVELOPMENT OF *Chelonia mydas* EMBRYO

**Abstract :** One of the important factor that is seems to be involved in sex determination of TSD animal is Sox9. Sox9 has an important role in the molecular sex-determining cascade. When the level of Sox9 protein reach the treshold, it could drive the bipotential gonad to a testis differentiation . The research is conducted to examine Sox9 expression level in the early stage of gonadal development of *Chelonia mydas*, a species with TSD. Eggs were incubated in FPT ( $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) incubator to produce 100% of female embryo, and the remaining in MPT ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) produce 100% of male embryo. The examination level expression of mRNA was performed since preTSP till the end of TSP period. Quantification of Sfl level expression from adrenal-gonad-kidney (AGK) complex of embryonic stage 12, 14, 16 (pre TSP), 17, 19 dan 22 (TSP), incubated in FPT ( $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) or MPT ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) were performed using RT-PCR method. Level expression of housekeeping gene  $\beta$ -actin is used as a control. Amplification product was electrophorized on TAE-Agarose gel and then documenting by using digital camera. The density of each DNA band were examined by using ScionImage Software. The average of 10 scores for each band was convert into a line diagram. RT-PCR result showed that the incubation temperature influenced mRNA expression level of Sox9. Expression level of Sox9 is higher in embryo which were incubated in MPT ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) than in FPT ( $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Differential expression level of the gene appear from the middle of preTSP till the middle of TSP. The highest level of the difference appear soon before Thermosensitive Period. Differential expression of Sox9 during the stage showed that Sox9 has an important role during the early stage of sex determination gonad of *Chelonia mydas*.

**Key words:** Sox9, Temperature-dependent Sex Determination (TSD), Thermosensitive period (TSP), *Chelonia mydas*

### I. PENDAHULUAN

Determinasi seks atau penentuan jenis kelamin sangat penting dalam kelangsungan hidup suatu spesies. Pada vertebrata dikenal 2 jenis mekanisme determinasi seks, yaitu GSD (*Genotypic Sex Determination*) dan ESD (*Environmental Sex Determination*). Pada GSD, seks ditentukan saat fertilisasi oleh gen yang terpaut pada kromosom seks, sedangkan seks hewan ESD ditentukan oleh faktor lingkungan [1]. Hewan ESD yang seksnya ditentukan oleh suhu dikenal sebagai hewan TSD (*Tem-*

*perature-dependent Sex Determination*), dan sebagian besar hewan ESD termasuk dalam kelompok ini [2]

Berbeda dengan vertebrata amniota lainnya yang jenis kelaminnya ditentukan secara genetik pada saat fertilisasi, jenis kelamin anakan pada banyak spesies reptil ditentukan secara permanen oleh suhu inkubasi embrio [3]. Rasio seks anakan pada taksa tersebut dapat berubah drastis akibat pergeseran suhu inkubasi meskipun hanya sebesar  $1^{\circ}\text{C}$  saja [4]. Karena rasio seks merupakan salah satu parameter demografik yang penting untuk viabilitas populasi, maka pemahaman yang lebih baik terhadap peran

lingkungan dalam mempengaruhi rasio seks jelas sangat dibutuhkan [5].

Penelitian–penelitian untuk mencari penentu utama arah perkembangan gonad hewan TSD telah banyak dilakukan terutama pada periode termosensitif (TSP, *thermosensitive period*) karena suhu inkubasi pada periode tersebut terbukti sangat mempengaruhi arah perkembangan gonad. Bila perlakuan suhu diberikan setelah TSP berlalu maka arah determinasi dan diferensiasi gonad tidak terpengaruh. Meskipun demikian gen/gen-gen yang menjadi penentu utama arah perkembangan gonad hewan TSD hingga saat ini belum diketahui. Akibat perbedaan suhu inkubasi, gen/gen-gen tersebut diduga telah terekspresi berbeda pada jaringan gonad dan sekitarnya sebelum embrio memasuki periode TSP. Perbedaan ekspresi gen-gen pada periode pra TSP ini yang diduga berperan menginisiasi perbedaan ekspresi gen-gen lain pada gonad tahap perkembangan selanjutnya.

Salah satu gen yang diduga memiliki peran penting dalam proses determinasi seks vertebrata adalah *Sox9*. Pada mencit protein ini dibutuhkan dalam jumlah yang cukup agar gonad indifere berkebang menjadi testis [6]. Pada manusia dan mencit, *Sox9* berinteraksi langsung dengan *Sfl* untuk meningkatkan level ekspresi *AMH* [7]. *AMH* adalah anggota dari superfamili TGF-1 yang merupakan faktor pertama yang disekresikan oleh sel-sel Sertoli testis yang telah terdiferensiasi yang menyebabkan terjadinya regresi duktus Müller bakal uterus, cervix, dan tuba Fallopii [8]. Hubungan pengaturan ekspresi antara *Sox9* dan *AMH* pada kelompok mamalia tampaknya tidak sama dengan hewan-hewan pada kelompok lain. Pada ayam yang GSD misalnya, perbedaan level ekspresi *AMH* justru terjadi sebelum level ekspresi *Sox9* berbeda. Keterkaitan antar kedua gen tersebut belum diketahui dengan pasti [9]. Pola ekspresi tersebut mirip dengan pola ekspresi gen yang sama pada spesies TSD *Alligator mississippiensis* [10].

Pada spesies TSD lain seperti *Eublepharis macularius* dan *Lepidochelys olivaceae* perbedaan level ekspresi *Sox9* pada suhu inkubasi yang berbeda tidak terlihat hingga TSP akhir [11]. Pada *Trachemys scripta*, level ekspresi *AMH* tampak jelas lebih tinggi pada suhu maskulinisasi pada periode TSP tengah [12], meskipun [13] menemukan perbedaan tersebut terlihat justru setelah TSP berlalu. Pada penelitian lain, level ekspresi *Sox9* tampak tidak berbeda pada suhu inkubasi yang berbeda [14]. Dengan demikian penelitian pola ekspresi *Sox9* pada spesies TSD yang berbeda menarik untuk dilakukan dalam rangka lebih memahami mekanisme molekuler yang mungkin terjadi pada proses awal determinasi seks, khususnya spesies TSD dengan menggunakan *Chelonia mydas* sebagai hewan percobaan. Disamping itu hasil ddRT-PCR kompleks adrenal-gonad-ginjal *Chelonia mydas* yang dilakukan oleh [15] menunjukkan bahwa *Sox9* merupakan salah satu gen terduga yang menunjukkan perbedaan level ekspresi pada kompleks adrenal-gonad-ginjal *Chelonia mydas* yang langsung atau tidak langsung disebabkan oleh perlakuan suhu. Adanya perbedaan level ekspresi dari gen terduga ini telah terlihat sebelum embrio memasuki periode TSP sehingga verifikasi perbedaan level ekspresi gen tersebut perlu dilakukan.

## II. BAHAN DAN METODE

### 2.1 Embrio *Chelonia mydas*

Jaringan kompleks adrenal-gonad-ginjal yang menjadi bahan utama penelitian ini diisolasi dari embrio *Chelonia mydas* yang diinkubasi pada suhu tertentu. Telur-telur sumber adrenal-gonad-ginjal ini diperoleh dari telur yang baru dioviposisikan di lokasi peteluran penyu Pantai Pangumbahan Sukabumi Selatan, Jawa Barat. Telur-telur tersebut dibawa ke Laboratorium Analisis Struktur dan Perkembangan SITH, ITB, tempat pemberian perlakuan. Selama dalam perjalanan, telur-telur tersebut ditempatkan dalam kemasan khusus (*carrier box*) yang berisi pasir laut lembab untuk mempertahankan kelembaban telur sepanjang perjalanan. Telur-telur selanjutnya dipindahkan ke dalam baskom plastik berisi pasir laut basah hingga telur-telur tertimbun didalamnya.

Telur-telur diinkubasi di dalam inkubator (Blue M) pada suhu  $31^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  (suhu feminisasi, SF), atau disimpan di dalam ruang berpendingin suhu  $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  (suhu maskulinisasi, SM). Pasir laut disiram dengan air ledeng setiap 2 atau 3 hari sekali agar telur tidak kering selama proses inkubasi berlangsung.

### 2.2 Isolasi Gonad

Kompleks adrenal-gonad-ginjal diisolasi dari embrio tahap perkembangan 12, 14, 16 (tahap pra TSP), 17, 19 dan 22 (tahap TSP). Tahapan perkembangan embrio ditentukan menurut [16]. Embrio yang diinkubasi pada suhu feminisasi hingga tahap 12 disebut SF12, sedangkan embrio yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi hingga tahap 12 disebut SM12. Embrio yang telah mencapai tahap perkembangan yang telah ditentukan selanjutnya didekapitasi. Sebanyak 20 mg – 30 mg kompleks adrenal-gonad-ginjal yang diisolasi dari 5 – 12 ekor embrio (tergantung tahapan perkembangan embrio) kemudian dimasukkan ke dalam PBS dingin. Setelah ditimbang dengan menggunakan neraca analitik (Sartorius BF121S), kompleks organ-organ tersebut dipindahkan ke dalam *cryotube* dan disimpan dalam nitrogen cair pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 Ekstraksi RNA, Pengukuran Kuantitas dan Kualitas RNA Total

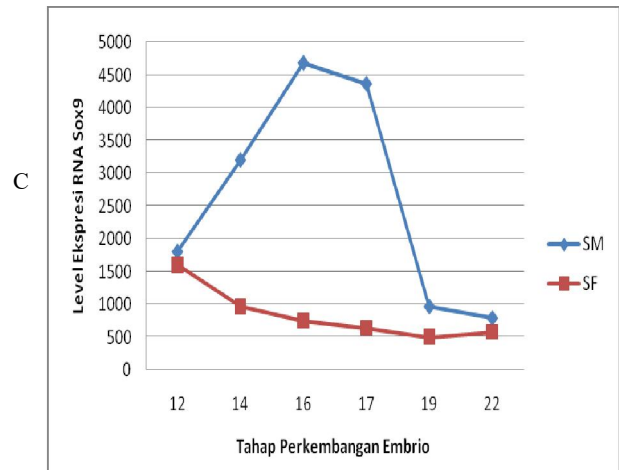
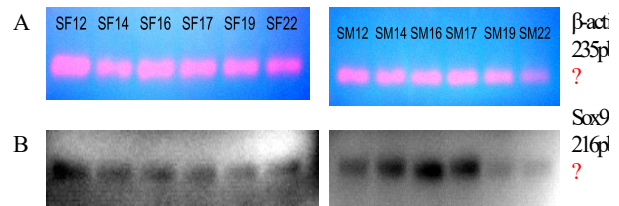
RNA total dari kompleks adrenal-gonad-ginjal diekstraksi menggunakan RNeasy Mini Kit (Qiagen). Konsentrasi RNA total diukur dengan menggunakan spektrofotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia, Biotech®) dengan mengukur absorbansi RNA terlarut pada panjang gelombang 260 nm ( $A_{260}$ ). Nilai absorbansi sebesar satu (1) pada panjang gelombang 260 nm sebanding dengan 40  $\mu\text{g}$  RNA per ml ( $A_{260} = 1 \pm 40 \mu\text{g/ml}$ ) (Davis dkk., 1994). Kemurnian RNA total ditentukan dengan menghitung rasio absorbansi UV pada panjang gelombang 260 nm ( $A_{260}$ ) dan 280 nm ( $A_{280}$ ), sedangkan kualitas RNA diamati dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa 1% yang mengandung etidium bromida dalam larutan bufer elektroforesis 1X BBE (Borate Boric EDTA). Adanya larik 18S rRNA dan 28S rRNA pada gel elektroforesis menunjukkan bahwa RNA total yang telah diisolasi tidak terdegradasi dan dapat digunakan dalam RT-PCR.

#### 2.4 RT-PCR dan Elektroforesis

RNA total yang diperoleh pada tahap sebelumnya selanjutnya disintesis menjadi cDNA (*complementary DNA*) dengan proses *reverse-transcription (RT)* menggunakan Superscript® III First-Strand Synthesis System for RT PCR (Invitrogen) dengan Random Hexamer primers. Fragmen cDNA hasil RT selanjutnya diamplifikasi dengan campuran reaksi yang mengandung 1,25 unit Taq DNA Polymerase (BioLabs), 0,5  $\mu$ M forward primer 5'AGTGGCAGC TACGGAATCA3' dan 0,5  $\mu$ M reverse primer 5'GCTGTAATGGCTCGGACTG3' (Invitrogen). PCR dilakukan pada suhu denaturasi awal 95°C selama 10 menit, kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi sebanyak 32 siklus pada suhu denaturasi 95°C selama 30 detik, suhu *annealing* 55°C selama 1 menit, dan suhu pemanjangan 72°C selama 1 menit. Pemanjangan akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit. Sebagai kontrol digunakan *housekeeping gene  $\beta$ -actin* yang diamplifikasi dengan pasangan primer 5'GCCAACAGAGAGAAGATGAC3' (forward primer) dan 5'TCTTCATGAGGTAGTCCGTC-3' (reverse primer) (Invitrogen). Hasil amplifikasi fragmen target dan *housekeeping gene  $\beta$ -actin* dielektroforesis bersama *DNA ladder* 100 bp (Invitrogen) pada gel TAE-agarosa 2%. Jumlah relative amplicon pada setiap larik DNA yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan software Scion Image. Nilai densitas setiap larik ditentukan dari rata-rata 10 kali bacaan. Level ekspresi *Sfl* ditentukan dengan menghitung rasio nilai rata-rata hasil Scion Image larik DNA *Sfl* terhadap nilai rata-rata hasil Scion Image larik DNA  $\beta$ -actin pada tahap perkembangan embrio dan perlakuan yang sama. Nilai-nilai tersebut kemudian dikonversi ke dalam bentuk grafik garis.

### III. HASIL PENELITIAN

Dalam penelitian ini telah dilakukan pengamatan level ekspresi gen *Sox9* pada level RNA. *Reverse transkripsi* dan PCR dilakukan pada seluruh sampel untuk mengamati pola ekspresi gen ini dengan menggunakan primer spesifik yang didesain untuk mengamplifikasi fragmen gen *Sox9* (Gambar 1B), dan sebagai kontrol internal dilakukan pula pengamatan terhadap level ekspresi frgamen gen  $\beta$ -actin (Gambar 3.A).



**Gambar 3.** Elektroferogram hasil RT-PCR *Sox9* (A) dan  $\beta$ -actin (B), serta grafik level ekspresi *Sox9* hasil scion image (C). SF (suhu feminisasi); SM (suhu maskulinisasi); SF 12 (Hasil amplifikasi RNA kompleks adrenal-gonad-ginjal *Chelonia mydas* yang diinkubasi pada suhu feminisasi hingga tahap 12); SM12 (Hasil amplifikasi RNA kompleks adrenal-gonad-ginjal *Chelonia mydas* yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi hingga tahap 12).

Hasil pengamatan ekspresi gen *Sox9* pada level RNA (Gambar 3C) menunjukkan adanya perbedaan pola antarkelompok perlakuan. Level ekspresi mRNA *Sox9* kompleks adrenal-gonad-ginjal dari embrio yang diinkubasi pada suhu jantan (SM) terdeteksi lebih tinggi dibandingkan dengan embrio yang diinkubasi pada suhu betina (SF). Perbedaan tersebut tampak jelas teramati sejak embrio tahap 14 (pra TSP tengah) hingga embrio tahap 19 (TSP tengah). Perbedaan terbesar terlihat pada embrio tahap 16 yang merupakan tahap menjelang embrio memasuki TSP. Pada TSP akhir (embrio tahap 22) level ekspresi gen ini hampir tidak berbeda pada suhu inkubasi yang berbeda.

### IV. PEMBAHASAN

Pada *Chelonia mydas*, suhu diduga menjadi inisiator yang mengarahkan gonad berkembang menjadi testis atau ovarium. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suhu inkubasi mempengaruhi pola ekspresi *Sox9*. Level ekspresi gen ini terlihat lebih tinggi pada embrio yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi (SM) dibandingkan dengan embrio yang diinkubasi pada suhu feminisasi (SF). Lebih tingginya level ekspresi *Sox9* pada SM diduga disebabkan oleh tingginya level ekspresi *Sfl*. [17] menemukan level ekspresi *Sfl* lebih tinggi pada embrio *Chelonia mydas* yang diinkubasi pada suhu maskulinisasi sejak embrio tahap 12. Dengan demikian peningkatan level ekspresi *Sox9* yang terlihat pada embrio

tahap 14 diduga merupakan akibat dari terjadinya peningkatan level ekspresi *Sfl* yang terbentuk pada embrio tahap sebelumnya. Inkubasi embrio pada suhu rendah (SM) diduga mengaktifasi molekul target tertentu (yang berbeda dari molekul yang teraktivasi pada SF) untuk meningkatkan produksi *Sfl* sehingga kadar *Sfl* pada jaringan gonad dan sekitarnya mencapai batas ambang tertentu yang dibutuhkan untuk meningkatkan level ekspresi *Sox9* dan *AMH*. Ekspresi *Sox9* pada sel Sertoli gonad yang telah terdiferensiasi berperan mengaktifasi ekspresi *Amh* [18] yang dibutuhkan untuk meregresi duktus Müller [19]. Protein AMH selanjutnya juga dapat berperan menekan ekspresi gen-gen *aromatase* [20] sehingga gonad bipotensial memasuki jalur determinasi testis. Peningkatan level ekspresi *Sox9* juga diduga berperan menekan level ekspresi *aromatase*. [21] menemukan terjadinya penurunan level protein *aromatase* yang terdeteksi pada gonad embrio yang diinkubasi pada SM. Hal tersebut diduga akibat meningkatnya level ekspresi *Sfl* yang selanjutnya berdampak pada meningkatnya level ekspresi *Sox9* dan *AMH*. Protein AMH selanjutnya dapat berperan dalam menekan ekspresi gen-gen *aromatase* [20]. Data-data tersebut menunjukkan bahwa ekspresi *Sox9* dan *Sfl* memiliki peran yang sangat penting dalam tahap awal perkembangan gonad spesies ini.

Suhu tinggi (SF) kemungkinan berperan mengaktifasi molekul target tertentu untuk menekan produksi *Sfl* yang selanjutnya mengarahkan *Sfl* untuk berikatan dengan *Dax1*. *Sfl* bersama *Dax1* mampu berperan dalam menghambat fungsi *Wt1* dan sekaligus menghambat transkripsi gen *Sox9* dan *AMH*. Kondisi ini mampu mengarahkan gonad bipotensial mengikuti jalur determinasi ovarium.

## V. KESIMPULAN

Pola ekspresi *Sox9* pada tahap awal perkembangan gonad dipengaruhi oleh suhu inkubasi. Embrio yang diinkubasi pada suhu rendah (SM) menunjukkan level ekspresi *Sox9* yang lebih tinggi dibandingkan dengan level ekspresi *Sox9* embrio yang diinkubasi pada suhu tinggi (SF). Hal tersebut terlihat sejak embrio memasuki tahap sangat awal pembentukan gonad yaitu pra TSP, hingga embrio tahap TSP tengah. Hal ini menunjukkan bahwa *Sox9* memiliki peran yang penting dalam proses determinasi seks gonad embrio *Chelonia mydas*, terutama untuk mengarahkan perkembangan gonad bipotensial menjadi gonad jantan.

## DAFTAR PUSTAKA

[1] Bull, J.J. (1983): *Evolution of sex determining mechanisms*, Menlo Park, California, Benjamin/Cummings Publishing Company Inc 316p  
 [2] Valenzuela N., Adams. C., Janzen F. J., 2003. Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *The American Naturalist* 161: 676-683  
 [3] Bull, J. J. (1980): Sex determination in reptiles, *Q. Rev. Biol.*, **55**, 3–21  
 [4] Paukstis, G. L., dan Janzen, F. J. (1990): Sex determination in reptiles summary of effects of

constant temperatures of incubation on sex ratios of offspring. *Smithson. Herpetol. Inform.Serv*, **83**, 1-28.

[5] Stelkens, R.B. dan Wedekind, C. (2010): Enviromental sex reversal, Trojan sex genes, and sex ratio adjustment: condition and population consequences, *Mol. Ecol.*, **19**, 627-646.  
 [6] Vidal VPI, Chaboissier M-C, de Rooij DG, Schedl A. 2001. *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28:216–217.  
 [7] de Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat G, Berta P. 1998. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18:6653–6665.  
 [8] Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. (1990): Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Mullerian inhibiting substance. *Nature* 345:167–170  
 [9] Oreal E, Pieau C, Mattei M-G, Josso N, Picard J-Y, Carre-Eusebe D, Magre S. 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn* 212:522–532.  
 [10] Western, P.S., Harry, J.L., Marshall, Graves, J.A., Sinclair, A.H. (1999): Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev. Dynam*  
 [11] Moreno-Mendoza, N., Harley, V.R. dan Merchant-Larios, H. (1999): Differential expression of SOX9 in gonad of sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures, *Journal of Experimental Zoology*, **284**, 705-710.  
 [12] Takada S, DiNapoli L, Capel B, Koopman P. 2004. *Sox8* is expressed at similar levels in gonads of both sexes during the sex determining period in turtles. *Dev Dyn* 231:387–395.  
 [13] Spotila, L., Spotila, J.R., Hall, S.E. (1998): Sequence and expression analysis of *WT-1* and *SOX9* in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J. Exp. Zool.* **281**, 417–427.  
 [14] Kettlewell JR, Raymond CS, Zarkower D. 2000. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis* **26**:174–178.  
 [15] Bahri, Syamsul (2009) Pola ekspresi gen kandidat penentu seks gonad *Chelonia mydas* sebelum periode termosensitif. Laporan Penelitian Hibah Doktor. ITB, Bandung  
 [16] Greenbaum, E. (2002): A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*, *Can.J. Zool.*, **80**, 1350-1370  
 [17] Bahri, Syamsul (2011) Pola ekspresi steroidogenic factor 1 (*Sfl*) pada tahap awal perkembangan gonad embrio *Chelonia mydas*. *Biologi Tropis* **12**:1

- [18] Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., dan Koopman, P. (1996): A male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination, *Development*, **122**, 2813–2822
- [19] Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., dan Lovell-Badge, R. (1995): Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene, *Development*, **121**, 1603-1614
- [20] Pieau, C., Dorizzi, M. dan Richard-Mercier, N. (1999): Temperature dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles, *Cell.Molec.LifeScie.*, **55**, 887–900
- [21] Equilibrina, I. (2007): *Kehadiran aromatase pada gonad embrio penyu hijau (Chelonia mydas) selama periode termosensitif*. Skripsi Sarjana Biologi. ITB, Bandung