

Produksi *Embryonic Stem Cells* dari *Inner Cell Mass* Blastosis yang Diisolasi dengan Metode Enzimatis dan *Immunosurgery*

(PRODUCTION OF EMBRYONIC STEM CELLS FROM INNER CELL MASS OF BLASTOCYST ISOLATED BY ENZYMATIC AND IMMUNOSURGERY METHODS)

Thomas MataHine¹, Iman Supriatna², Dondin Sajuthi², Arief Boediono³

¹Laboratorium Reproduksi dan Kesehatan Hewan, Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana, Kupang
Telp. 08219296248. E-mail: thomasmatahine@yahoo.co.id

²Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Laboratorium Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan metode isolasi *inner cell mass (ICM)* yang lebih efektif dalam memproduksi *embryonic stem cells (ESC)*. Penelitian ini menggunakan embrio yang berada pada stadium blastosis yang dipanen dari mencit DDy. Zona pelusida blastosis dilisiskan dengan 0,25% pronase, isolasi ICM dengan metode enzimatis atau *immunosurgery*, dan kultur dalam *Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM)* yang disuplementasi dengan mercaptoethanol, gentamycin, *fetal bovine serum (FBS)*, dan sel kumulus digunakan sebagai *feeder layer*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode *immunosurgery* menghasilkan *attachment rate* dan tingkat pembentukan koloni primer ESC yang lebih tinggi ($P < 0,05$) yaitu 93,85% dan 43,08%, daripada metode enzimatis yaitu 79,63% dan 18,52%, tetapi viabilitas ICM pada kedua metode isolasi tidak berbeda ($P > 0,05$) yaitu 93,59% pada metode enzimatis dan 98,56% pada metode *immunosurgery*. Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa metode *immunosurgery* lebih efektif untuk isolasi ICM dan produksi ESC daripada metode enzimatis.

Kata kunci: *Embryonic stem cells, inner cell mass, enzimatis, immunosurgery*

ABSTRACT

The objective of the research is determining the ICM isolation method to produce ESC. Blastocyst stage of DDy mice embryos were used in this study. Zona pellucida of blastocysts were removed by 0.25% pronase, the ICM isolation were done by enzymatic or immunosurgery method, and then they were cultured in DMEM-high glucose supplemented with mercaptoethanol, gentamycin, fetal bovine serum, and cumulus cells as feeder layer. The result of the research indicated that immunosurgery method yielding attachment rate and number ESC colony 93.85% and 43.08%, respectively, higher ($P < 0.05$) than enzymatic method that were 79.63% and 18.52%, respectively, but the viability of ICM cells were equal ($P > 0.05$) that are 93.59% in enzymatic method and 98.56% in immunosurgery method. This research concluded that immunosurgery more effective method for isolation of ICM and ESC production than enzymatic method.

Key word: Embryonic stem cells, inner cell mass, enzymatic, immunosurgery

PENDAHULUAN

Embryonic stem cells (ESC) adalah sel yang belum berdiferensiasi yang dapat diarahkan untuk membentuk berbagai tipe sel. Dibandingkan dengan jenis *stem cell* yang lain, ESC memiliki karakteristik yang unik yaitu dapat memperbanyak diri selama periode yang panjang dan pada kondisi kultur tertentu dapat

diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi semua tipe sel tubuh (Czyz *et al.* 2003), seperti sel syaraf (Bouhon *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2006), sel pankreas (Roche *et al.* 2005), sel jantung (Kanno *et al.* 2004, Guo *et al.* 2006, Hong *et al.* 2007), sel ginjal (Kim & Dressler 2005), otot, sel darah, sel tulang dan sebagainya (Boheler *et al.* 2002). Berdasarkan sifat tersebut, ESC dapat digunakan untuk terapi regeneratif melalui

transplantasi sel pada berbagai jaringan atau organ yang mengalami kerusakan (Pour *et al.* 2004). Salah satu penyakit pada hewan percobaan yang telah dapat disembuhkan dengan transplantasi ESC adalah diabetes (Sameer *et al.* 2006). Selain itu, ESC juga dapat dimanfaatkan untuk pengujian obat baru dan studi perkembangan (Wobus & Boheler 2005, Lu *et al.* 2006).

ESC dihasilkan dari *inner cell mass* (ICM) yang terdapat pada embrio stadium blastosis. Dengan demikian, untuk memproduksi ESC maka blastosis tersebut harus dikultur dalam lingkungan *in vitro* (laboratorium) pada suatu medium yang memungkinkan ICM yang terdapat dalam blastosis tersebut dapat berproliferasi untuk membentuk ESC. Teknik produksi ini telah dilakukan oleh beberapa peneliti namun menghasilkan produksi ESC yang tidak optimal. Hasil penelitian Matahine (2006) menunjukkan bahwa dari 46 blastosis utuh (tanpa pemisahan ICM dari trofoblas) yang dikultur hanya 9 blastosis (19,57%) yang dapat berkembang membentuk koloni primer ESC. Rendahnya produksi ESC dari hasil kultur blastosis utuh karena adanya hambatan dari sel trofoblas yang berada disekeliling ICM, sehingga ICM ini tidak dapat dengan leluasa berkembang membentuk koloni primer ESC.

Untuk menjawab masalah tersebut maka dalam penelitian ini digunakan dua metode isolasi untuk memisahkan ICM dari trofoblas, yaitu metode enzimatik dan metode *immunosurgery*. Pada metode enzimatik digunakan tripsin yang berfungsi untuk merenggangkan ikatan antar sel, sehingga diharapkan trofoblas yang terdapat di bagian luar dapat dipisahkan dengan mudah dari ICM. Disisi lain, metode *immunosurgery* merupakan metode pemisahan ICM yang bekerja melalui penggunaan *antiserum-complement* (Solter 1975). Pemaparan blastosis tanpa zona pelusida dalam antiserum mencit akan menyebabkan sel-sel trofoblas yang terdapat pada bagian luar blastosis akan terikat dengan antibodi yang selanjutnya dihancurkan oleh *complement*, sedangkan ICM yang terdapat di dalamnya tetap dipertahankan dalam keadaan utuh. Kedua metode ini diharapkan memiliki kemampuan yang berbeda dalam mengisolasi ICM dari sel-sel trofoblas yang selanjutnya berdampak pada perbedaan produksi ESC.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Superovulasi dan Koleksi Embrio.

Sebanyak 30 ekor mencit betina strain DDY umur 6-8 minggu diinduksi dengan injeksi *intraperitoneal* 5 IU *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG; Folligon, Intervet, Holand) diikuti 48 jam kemudian dengan injeksi 5 IU *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG; Chorulon, Intervet, Holand) (Lin *et al.* 2003). Pada saat injeksi hCG mencit betina tersebut dikawinkan dengan mencit jantan dari strain yang sama dengan perbandingan antara jantan dan betina adalah 1:1. Pada pagi hari berikutnya dilakukan pengamatan sumbat vagina (*vaginal plug*) yang mengindikasikan telah terjadi perkawinan. Panen blastosis dilakukan pada hari keempat setelah injeksi hCG dengan menggunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS; Gibco) sebagai medium penampung.

Isolasi ICM.

Sebanyak 159 embrio yang berada pada stadium blastosis dipaparkan dalam pronase 0,25% selama 5 menit untuk menghilangkan zona pelusida. Isolasi ICM dilakukan dengan dua metode yang berbeda yaitu metode enzimatik dan *immunosurgery*. Metode enzimatik dilakukan dengan memaparkan blastosis tanpa zona pelusida dalam larutan 0,25% trypsin – 0,04% EDTA (Sigma, USA) selama 10 menit, dan selanjutnya dilakukan *pipetting* untuk memisahkan ICM dari sel-sel trofoblas. Metode *immunosurgery* dilaksanakan dengan memaparkan blastosis tanpa zona pelusida dalam *rabbit anti-mouse antibody* (Sigma, USA) selama 60 menit dan *complement* (Sigma, USA) selama 30 menit pada suhu 37°C, cuci dalam DMEM plus 10% FBS dan selanjutnya dilakukan *pipetting* untuk memisahkan ICM dari sel-sel trofoblas.

Kultur ICM.

Kultur ICM dilakukan dalam *Dulbeccos Modified Eagle's Medium* (DMEM)-*high glucose* (Sigma, USA), yang disuplementasi dengan 1% *non essential amino acid* (NEAA; Gibco), 20% fetal bovine serum (FBS, Gibco) 50 unit/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 0,1 mM mercaptoethanol (Sigma, USA), dan *feeder layer* yang digunakan adalah sel kumulus (Matahine *et al.* 2007).

Evaluasi viabilitas ICM dilakukan segera setelah pemisahan ICM dari trofoblas. ICM

diwarnai dengan dengan *hoechst 33258-propidium iodide* (Hoechst-PI). selama 10 hingga 20 menit, dan selanjutnya diamati di bawah mikroskop *fluorescent*. Inti sel yang berwarna hijau menunjukkan sel dalam keadaan hidup, sedangkan yang berwarna merah menunjukkan sel yang mati. *Attachment rate* dihitung berdasarkan jumlah ICM yang melekat pada *feeder layer*, sedangkan tingkat pembentukan koloni primer ESC dihitung berdasarkan jumlah ICM yang yang berproliferasi membentuk koloni yang besar. Data penelitian dianalisis dengan analisis ragam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi embrio dilakukan pada hari keempat kebuntingan dengan harapan bahwa pada saat tersebut embrio telah mencapai stadium blastosis. Walaupun demikian, dalam kenyataannya menunjukkan bahwa selain blastosis, embrio yang dikoleksi juga ada yang masih berada pada stadium morula. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan perkembangan bervariasi antara individu embrio. Embrio yang berada pada stadium morula ditandai oleh adanya hubungan antara sel yang sangat kompak dan belum memiliki blastosul, sedangkan blastosis telah memiliki blastosul dan dibedakan dalam tiga kelompok yakni blastosis awal (ukuran blastosul kurang dari 50% volume embrio), blastosis (ukuran blastosul 50 – 80% volume embrio) dan blastosis ekspan memiliki ukuran blastosul yang besar (lebih dari 90% volume embrio) (Gambar 1). Embrio-embrio yang berada pada stadium morula diinkubasi dalam medium kultur hingga mencapai stadium blastosis dan selanjutnya digunakan untuk penelitian.

Embrio tersebut dipaparkan dalam larutan pronase 0,25% selama 3 hingga 5 menit untuk menghilangkan zona pelusida. Embrio tersebut dibagi dalam dua kelompok: a) isolasi ICM dilakukan dengan menggunakan metode enzimatik (Gambar 2A-2D), b) isolasi ICM dilakukan menggunakan metode *immunosurgery* (Gambar 2E-2G). Efektivitas dari kedua metode tersebut diukur berdasarkan viabilitas sel ICM, *attachment rate* dan tingkat pembentukan koloni primer.

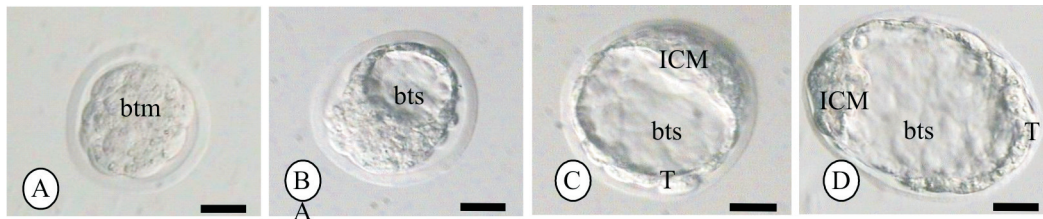
Viabilitas ICM

Evaluasi viabilitas ICM dilakukan segera setelah pemisahan ICM dari trofoblas. ICM diwarnai dengan dengan *hoechst 33258-propidium iodide* selama 10 hingga 20 menit, dan selanjutnya diamati di bawah mikroskop *fluorescent*. Inti sel yang berwarna hijau menunjukkan sel dalam keadaan hidup (Gambar 2H), sedangkan yang berwarna merah menunjukkan sel yang mati.

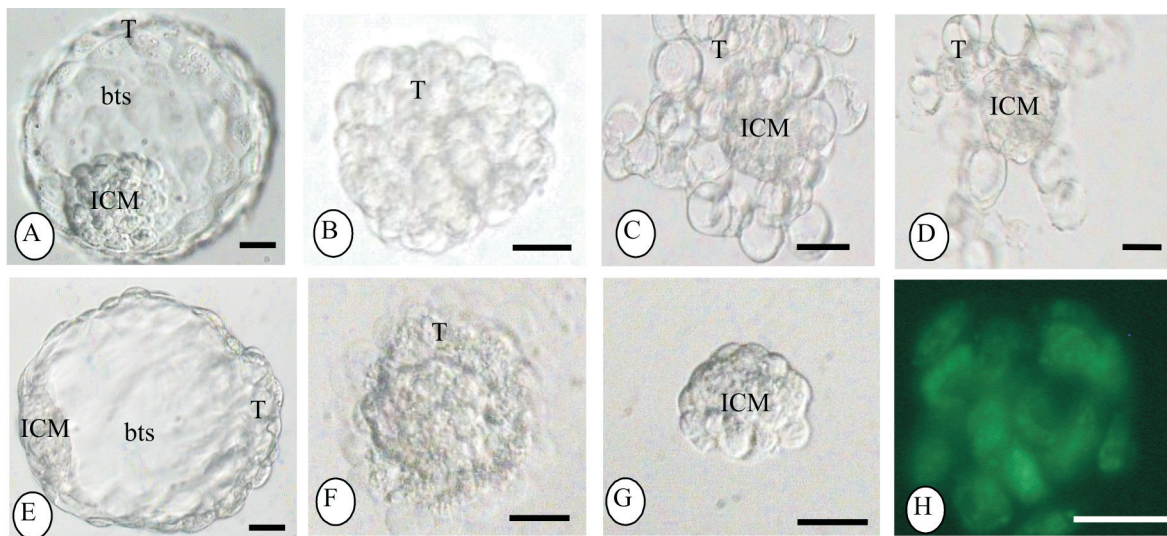
Viabilitas ICM tertinggi dihasilkan oleh embrio yang diisolasi dengan metode *immunosurgery* (98,56%) sedangkan pada metode enzimatik adalah 93,59%. Walaupun demikian, secara statistik, viabilitas ICM pada kedua metode menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0,05$) (Tabel 1).

Walaupun viabilitas ICM antara kedua metode isolasi tersebut tidak berbeda, namun penggunaan tripsin dalam metode isolasi enzimatik memerlukan kontrol dan pengamatan yang sangat teliti selama blastosis dipaparkan pada enzim tersebut. Hal ini disebabkan karena setiap individu blastosis memiliki tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap tripsin, sehingga sulit menentukan waktu paparan yang optimal untuk mengisolasi ICM. Jika waktu paparan terlalu panjang, maka bukan hanya sel-sel trofoblas yang berpecah tetapi juga akan menyebabkan perenggangan ikatan antara sel ICM, dan pada beberapa kasus sel-sel ICM terlepas dari kumpulan ICM sehingga sulit membedakan sel tersebut dari sel-sel trofoblas. Selain itu, waktu paparan yang terlalu panjang juga akan menyebabkan lisisnya ICM bersamaan dengan sel-sel trofoblas. Sebaliknya, jika waktu paparan terlalu pendek maka tripsin tidak dapat memutuskan ikatan antara sel-sel trofoblas sehingga akan menyulitkan proses isolasi ICM pada saat *pipetting*. Dengan demikian, untuk melakukan pemisahan ICM dengan metode enzimatik, peneliti harus terus mengamati blastosis di bawah mikroskop sehingga dapat menentukan saat yang tepat untuk melakukan isolasi.

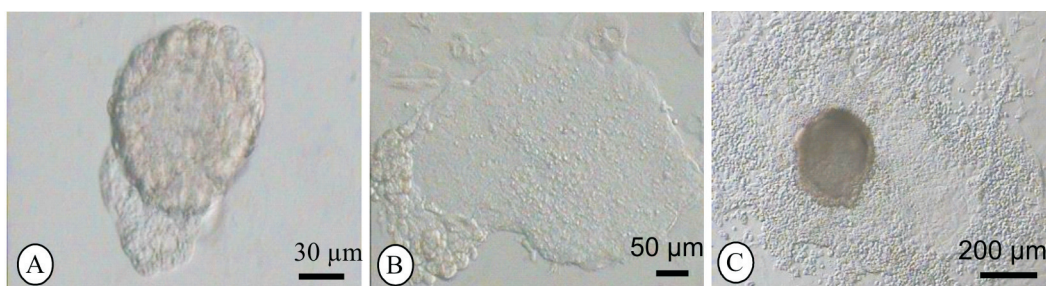
Isolasi ICM dengan metode *immunosurgery*, dapat ditentukan waktu paparan blastosis yang optimal dalam antiserum dan *complement*. Dari penelitian pendahuluan, didapatkan bahwa isolasi ICM dapat dilakukan secara baik dengan paparan blastosis dalam antiserum selama 60 menit dan dalam *complement* selama 30 menit. Jika lama paparan dalam antiserum kurang dari 60 menit akan menyebabkan



Gambar 1. Embrio pada berbagai stadium yang dikoleksi pada hari keempat kebuntingan. A: morula, B: blastosis awal, C: blastosis, D: blastosis ekspan, btm: blastomer, bts: blastosul, ICM: *inner cell mass*, T: trofoblas. Bar = 30 μ m



Gambar 2. Proses isolasi ICM dengan metode enzimatik (A – D), dan *immunosurgery* (E – G). A, E: blastosis nir-zonapelusida, B: blastosis pada saat dipaparkan dalam larutan tripsin, C,D: ICM setelah dipisahkan dari trofoblas, F: blastosis pada saat dipaparkan dalam complement, G: ICM setelah dipisahkan dari sel-sel trofoblas, H: ICM setelah pewarnaan dengan hoechst-propidium iodide. bts: blastosul, ICM: *inner cell mass*, T: trofoblas. Bar = 30 μ m.



Gambar 3. Profil ICM dan ESC dalam kultur *in vitro*. A: ICM yang *attach* pada hari ke-2 kultur, B: koloni primer ESC yang terbentuk pada hari ke-4 kultur, C: koloni ESC pada hari ke-6 kultur.

Tabel 1. Viabilitas ICM setelah isolasi dengan metode enzimatik dan *immunosurgery*

Metode Isolasi	Jumlah ICM	Total sel ICM	Profil sel ICM		
			Hidup	Mati	Viabilitas (%)
Enzimatik	20	468	438	30	93,59 ^a
<i>Immunosurgery</i>	20	487	480	7	98,56 ^a

Superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) antara perlakuan

Tabel 2. *Attachment rate* dan tingkat pembentukan koloni primer ESC setelah isolasi dengan metode enzimatik dan *immunosurgery*

Metode Isolasi	Jumlah embrio	<i>Attachment rate</i> (%)	Tingkat Pembentukan
			Koloni Primer ESC (%)
Enzimatik	54	43 (79.63 %) ^b	10 (18.52 %) ^b
<i>Immunosurgery</i>	65	61 (93.85 %) ^a	28 (43.08 %) ^a

Superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) antara perlakuan

banyak dari sel-sel trofoblas yang tidak dapat dilisis oleh *complement*. Sel-sel yang tidak dapat dilisis oleh *complement* tersebut diduga karena sel-sel tersebut belum terpapar dan berikatan secara sempurna dengan antibodi yang ada di dalam antiserum. Hasil temuan ini berbeda dengan hasil penelitian beberapa peneliti sebelumnya yaitu 30 menit dalam antiserum dan 30 menit dalam *complement* (Solter & Knowles 1975). Adanya perbedaan tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan antiserum dan *complement* yang digunakan. Solter dan Knowles menggunakan antiserum dan *complement* dari serum segar, sedangkan dalam penelitian ini menggunakan produk pabrik yang sudah dalam bentuk serbuk.

Beberapa hal yang menguntungkan dari metode *immunosurgery* yaitu: 1) waktu pemaparan yang lebih panjang pada antiserum atau *complement* tidak memiliki efek negatif terhadap viabilitas ICM. Solter dan Knowles (1975) menguji tingkat permeabilitas embrio mencit terhadap antiserum. Untuk itu mereka memaparkan blastosis pada antiserum selama 4, 10, 16, dan 24 jam, dan selanjutnya ditransfer ke dalam *complement* selama 30 menit. Sel-sel trofoblas pada semua kasus mengalami lisis secara sempurna, sementara ICM tetap dipertahankan dalam keadaan intak dan

mampu berkembang dalam kultur *in vitro*. Hal ini mengindikasikan bahwa blastosis tidak permeabel terhadap antiserum walaupun dipaparkan selama 24 jam. Pemaparan dalam waktu yang lebih lama dari 24 jam tidak dianjurkan mengingat ICM sudah mulai berdiferensiasi, dan melekat pada dasar cawan sehingga ICM tidak terlindungi secara sempurna oleh trofoblas, 2) lama pemaparan blastosis dalam antiserum dan *complement* dapat ditentukan secara pasti, 3) proses isolasi atau pemisahan ICM dari sel-sel trofoblas lebih mudah karena semua sel trofoblas yang terpapar dengan antiserum dapat dilisis dengan *complement* dan mempermudah pada saat *pipeting*, 4) ICM tetap dipertahankan dalam keadaan utuh, 5) dapat digunakan untuk mengisolasi ICM dalam skala besar dalam waktu yang relatif pendek.

Walaupun demikian, ada beberapa hal yang perlu dihindari dalam penggunaan metode ini yaitu tidak boleh menggunakan blastosis yang memiliki ikatan sel yang sudah rusak. Blastosis-blastosis yang demikian biasanya ditandai oleh mengecilnya blastosul yang diakibatkan oleh adanya pengeluaran air ke arah luar, dan biasanya terjadi pada proses penghilangan zona peluzida dengan enzim pronase atau pada saat *handling* atau pencucian blastosis.

Attachment Rate dan Tingkat Pembentukan Koloni Primer

Walaupun viabilitas ICM pada kedua metode isolasi tidak berbeda, ternyata *attachment rate* dan tingkat pembentukan koloni primer (Gambar 3) dari ICM yang diisolasi dengan metode *immunosurgery* lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada metode enzimatik. *Attachment rate* dan tingkat pembentukan koloni primer ICM yang diisolasi dengan metode *immunosurgery* secara berturut-turut adalah 93,85% dan 43,08% lebih tinggi ($P < 0,05$) dari metode enzimatik yakni 79,63% dan 18,52% (Tabel 2). Hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan tripsin dalam proses isolasi ICM memberi pengaruh negatif terhadap kemampuan sel untuk melekat pada *feeder layer* dan selanjutnya berdampak pada rendahnya tingkat perkembangan untuk membentuk koloni primer.

Salah satu penyebab rendahnya *attachment rate* dan tingkat pembentukan koloni primer pada embrio yang diisolasi dengan metode enzimatik adalah mungkin diakibatkan oleh adanya kerusakan sel selama proses pemisahan ICM dari sel-sel trofoblas. Pemaparan embrio dalam larutan tripsin menyebabkan ikatan antar sel trofoblas menjadi renggang, sehingga tripsin dengan mudah masuk ke dalam embrio dan mencapai ICM. Dengan terpaparnya ICM terhadap tripsin, menyebabkan ikatan antara sel-sel tersebut menjadi renggang dan mungkin juga mempengaruhi viabilitas sel tersebut. Hal ini nampak dari viabilitas setelah isolasi, walaupun tidak berbeda secara statistika tetapi ada kecenderungan perlakuan enzimatik meningkatkan jumlah sel ICM yang mati. Disisi lain, hal yang demikian tidak terjadi pada perlakuan *immunosurgery*. Sel-sel ICM pada perlakuan *immunosurgery* tetap dipertahankan dalam keadaan utuh, dan hanya sel-sel trofoblas saja yang lisis oleh *complement* pada perlakuan isolasi *immunosurgery*.

Proses isolasi ICM pada perlakuan enzimatik juga mengalami kendala karena tripsin tidak dapat secara sempurna memisahkan ICM dari sel-sel trofoblas (Gambar 2D). Pemaparan embrio dalam larutan tripsin hanya menyebabkan perenggangan ikatan antara sel-sel trofoblas tetapi tidak mampu melepaskan ikatan antara sel tersebut secara sempurna. Perenggangan ikatan sel trofoblas menyebabkan tripsin dapat masuk ke dalam embrio dan menyebabkan terjadinya perenggangan ikatan antara sel-sel ICM, sehingga ICM menjadi tidak

kompak dan seringkali menyulitkan identifikasi pada saat *pipetting* untuk memisahkan ICM dari sel-sel trofoblas.

Secara umum, *attachment rate* dan tingkat pembentukan koloni primer yang dihasilkan lebih rendah dari hasil penelitian Li *et al.* (2003) pada embrio babi dengan menggunakan metode enzimatik, yaitu *attachment rate* mencapai 100% dan tingkat pembentukan koloni primer adalah 68%. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan jenis embrio dan metode kultur ESC yang digunakan.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode *immunosurgery* lebih efektif untuk memisahkan ICM dari sel-sel trofoblas dan memproduksi ESC yang lebih baik daripada metode enzimatik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh BPPS Dirjen DIKTI. dan merupakan bagian dari penelitian untuk penyusunan disertasi dalam rangka menyelesaikan studi S3 (Doktor) di Institut Pertanian Bogor. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada instansi tersebut di atas, Lab Embriologi FKH IPB beserta staf, dan seluruh kolega terkasih yang telah membantu penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Boheler KR, J Czyz, D Tweedie, H-T Yang, SV Anisimov, and AM Wobus. 2002. Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 91:189-201.
- Bouhon IA, H Kato, S Chandran, ND Allen. 2005. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in chemically defined medium. *Brain Research Bulletin* 68: 62–75.
- Czyz J, C Wiese, A Rolletschek, P Blyszczuk, M Cross, and AM Wobus. 2003. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol. Chem.* 384:1391-1409.
- Guo X-M, Y-S Zhao, H-X Chang, C-Y Wang, E Ling-Ling, X-A Zhang, C-M Duan, L-Z Dong, H Jiang, J Li, Y Song, and X Yang. 2006. Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells. *Circulation* 113:2229-2237.
- Hong S, JK Kang, CJ Bae, ES Ryu, SH Lee,

- JH Lee. 2007. Development of efficient cardiac differentiation method of mouse embryonic stem cells. *Key Engineering Materials* 342: 25-28.
- Kanno S, PKM Kim, K Sallam, J Lei, TR Billiar, LL Shears. 2004. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101:12277-12281.
- Kim D, GR Dressler. 2005. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 3527-3534.
- Li M, D Zhang, Y Hou, L Jiao, X Zheng, and W-H Wang. 2003. Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 65:429-434.
- Lin H, JQ Lei, D Wininger, M-T Nguyen, R Khanna, C Hartmann, WL Yan, SC Huang. 2003. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. *Stem Cells* 21:152-161.
- Lu J, RHou, CJ Booth, S-H Yang, M Snyder. 2006. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:5688-5693.
- Matahine T. 2006. Pengaruh beberapa metode isolasi *inner cell mass* dan stadium perkembangan blastosis terhadap tampilan produksi embryonic stem cell mencit. Laporan Penelitian Dosen Muda, Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana.
- Matahine T, A Boediono, dan K Uly. 2007. Pengembangan metode produksi *embryonic stem cells* dari *inner cell mass* blastosis sebagai upaya penyediaan sel untuk kegiatan transplantasi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing, Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana.
- Pour AAM, M Salehnia, AA Pourfatollah, and M. Soleimani. 2004. CFU-GM like colonies from embryonic stem cells cultured on the bone marrow stromal cells. *Iran Biomed. J.* 8:1-5.
- Roche E, P Sepulcre, JA Reig, A Santana, B Soria. 2005. Ectodermal commitment of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *The FASEB Journal* 19:1341-1343.
- Sameer M, M Balasubramanyam, V Mohan. 2006. Stem cells and diabetes. *Current Science* 91:1158-1165.
- Solter D, BB Knowles. 1975. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72:5099-5102.
- Wobus AM, KR Boheler. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 85:635-678.
- Zhang J-Q, X-B Yu, B-F Ma, W HuaYu, A-X Zhang, G Huang, FF Mao, X-M Zhang, Z-C Wang, S-N Li, BT Lahn, AP Xiang. 2006. Neural differentiation of embryonic stem cells induced by conditioned medium from neural stem cell. *Developmental Neuroscience* 17:981-986.