

Sel Kumulus Sebagai *Feeder Layer* pada Kultur *Stem Cells Embrionic* Mencit

(*CUMULUS CELLS AS FEEDER LAYER IN CULTURE
OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS*)

Thomas Mata Hine¹, Arief Boediono², Iman Supriatna³, Dondin Sajuthi³

¹Program Studi Ilmu Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana
Telp. 085219296248. E-mail: thomasmatahine@yahoo.co.id
Alamat rumah: Perumahan Dosen Undana Blok E38, Kelurahan Lasiana, Kupang - NTT

²Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah menguji efektivitas sel kumulus sebagai *feeder layer* dalam menunjang pertumbuhan *stem cells* embrionik mencit. Embrio pada stadium blastosis dipaparkan dalam larutan pronase, dan selanjutnya diinkubasi dalam *rabbit anti-mouse antibody* dan *guinea pig complement* untuk melisiskan sel trofoblas dari *inner cell mass*. *Inner cell mass* selanjutnya dikultur dalam cawan petri yang berisi *feeder layer* kumulus, *mouse embryonic fibroblast*, atau tanpa *feeder layer*; dengan medium dasar adalah medium *stem cells*. Koloni *stem cells* yang dihasilkan dipasase dengan tripsin, dilakukan pemipetan berulang hingga dihasilkan sejumlah subkoloni kecil atau sel tunggal. Subkoloni dan sel tunggal tersebut dikultur seperti sebelumnya dalam beberapa cawan petri yang baru. Karakterisasi *stem cells* dilakukan menggunakan alkaline phosphatase *staining*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa efektivitas sel kumulus sebagai *feeder layer* untuk kultur *stem cells* mencit sebanding dengan *mouse embryonic fibroblast*, dan keduanya lebih baik daripada tanpa *feeder layer*. Tingkat pembentukan koloni primer (KP), tingkat pembentukan *cell line* (CL), tingkat pertumbuhan koloni (TPK) masing-masing mengalami peningkatan sebesar 41,30; 8,70, dan 54,20%, dan terjadi pemendekan *doubling time* (DT) 10,21 jam dibanding dengan metode tanpa *feeder layer*. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa *feeder layer* kumulus efektif untuk menunjang pertumbuhan *stem cells* embrionik mencit.

Kata kunci: *feeder layer*, kumulus, *stem cells*, mencit

ABSTRACT

The purpose of this study was to verify the effectiveness of cumulus cells as a feeder layer in supporting the growth of mouse embryonic stem cells. Embryos at blastocyst stage were exposed in pronase solution, and then incubated in rabbit anti-mouse antibody and guinea pig complement to lyse and separate the trophoblast cells from the inner cell mass. Inner cell mass subsequently cultured in a petri dish containing a cumulus feeder layer, mouse embryonic fibroblasts, or without a feeder layer, in stem cells medium. The resulting stem cells colony passaged in trypsin solution, pipetted repeatedly to produce subcolonies or single cells, and cultured as before in some new petri dishes. Characterization of stem cells was identified by using alkaline phosphatase staining. The results showed the effectiveness of cumulus cells as feeder layer for culture of mouse embryonic stem cells was comparable with mouse embryonic fibroblasts, and both of them were better than without a feeder layer method. The number of primary colony, cell lines, and colony growth rate increased 41.30, 8.70, and 54.20%, respectively, while doubling time was shorter 10:21 hours compared to the growth without feeder layer method. These results prove that the cumulus feeder layer effectively supports the growth of mouse embryonic stem cells.

Key words: feeder layer, cumulus, embryonic stem cells, mouse

PENDAHULUAN

Penelitian dalam bidang *stem cells* masih dalam tahap pengembangan, sehingga berbagai sistem kultur yang dikembangkan untuk memproduksi sel tersebut masih bersifat uji coba. Beberapa peneliti sebelumnya telah menggunakan *feeder layer* yang dibuat dari sel epitel amnion (Lai *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010), atau dari *mouse embryonic fibroblast* (MEF) untuk kultur *stem cells*. Penggunaan MEF sebagai *feeder layer* didasarkan pada hasil temuan bahwa MEF menghasilkan berbagai *growth factor* dan sitokin yang berperan dalam proliferasi *stem cells* (Li *et al.*, 2004). Namun demikian, terdapat sejumlah kelemahan dalam produksi MEF yaitu mudah terkontaminasi dengan bakteri dan jamur terutama pada awal kultur, dan proses pembuatannya relatif lebih rumit dan panjang (Nagy *et al.*, 2006a,b). Sebagai upaya untuk mengatasi masalah tersebut maka telah digunakan sel kumulus sebagai *feeder layer* untuk kultur *stem cells* embrionik mencit.

Sel kumulus adalah sel-sel yang menyertai oosit pada saat ovulasi, dan berperan dalam meregulasi proses pematangan oosit dan perkembangan embrio (Vanderhyden *et al.*, 2003; Cillo *et al.*, 2007). Sel kumulus mengekspresikan berbagai faktor seperti *transforming growth factor- β /TGF- β* (Mulheron *et al.*, 1992), *activin A* (Lau *et al.*, 1999), *Wnt2* dan *β -catenin* (Wang *et al.*, 2009), *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor* (IGF), dan *transforming growth factor/TGF* (Memili *et al.*, 2007). Beberapa zat aktif tersebut telah dibuat secara sintetik dan terbukti mampu meregulasi proliferasi *stem cells* (Levenstein *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2007; James *et al.*, 2005; Miyabayashi *et al.*, 2007). Dengan kandungan berbagai *growth factor* tersebut, diasumsikan bahwa sel kumulus mampu menunjang proliferasi *stem cells*, selain itu, proses produksi *feeder layer* kumulus juga relatif mudah dan dapat diproduksi secara murni sejak pasase awal. Walaupun demikian, berhubung tidak dapat diproduksi dalam jumlah yang banyak seperti sel fibroblas, maka sel kumulus hanya aplikatif untuk kultur *stem cells* berskala kecil. Tujuan penelitian ini adalah menguji efektivitas sel kumulus sebagai *feeder layer* dalam menunjang pertumbuhan *stem cells* embrionik mencit

METODE PENELITIAN

Pembuatan *Feeder Layer* Kumulus

Sel kumulus dipanen bersama oosit mencit pada 16 jam pascapenyuntikan hormon gonadotropin. Sel kumulus dipisahkan dari oosit dengan menggunakan hyaluronidase 0,3%, dan selanjutnya dikultur dalam *feeder layer medium* yang tersusun atas *Dulbeccos modified eagles medium* (DMEM)-*high glucose* yang disuplementasi dengan *heat inactivated fetal bovine serum* 10% (FBS), *nonessential amino acid* 1% (NEAA), dan *gentamicin* 50 μ g/ml. *Feeder layer* kumulus terbentuk setelah tujuh hari kultur dan siap digunakan untuk kultur *stem cells*.

Pembuatan MEF *Feeder Layer*

Mencit betina yang sebelumnya telah diinjeksi dengan *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG) dan *human chorionic gonadotropin* (hCG) dikawinkan dengan mencit jantan dengan perbandingan 1:1. Pada hari ke-13,5 kebuntingan, mencit tersebut dibius dan nyawanya dikorbankan. Proses pengeluaran fetus dilakukan dengan cara membedah rongga perut dan uterus, dan selanjutnya karkasnya dipisahkan dari bagian nonkarkas. Karkasnya dicacah dengan menggunakan gunting dan ditempatkan dalam larutan *trypsin* 0,05%-EDTA 0,004% selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatannya dicampur dengan *feeder layer medium* dan disentrifugasi tiga kali pada 1000xg selama lima menit. Setelah supernatan dibuang, sel tunggal yang terdapat pada dasar tabung dikultur dalam *feeder layer medium*. Pasase dilakukan ketika sel hampir memenuhi dasar cawan, dan selanjutnya dikultur kembali seperti sebelumnya. Pada pasase keempat MEF diinaktivasi dalam *mitomycin C* 10 μ g/ml selama 2,5 jam, dan selanjutnya siap digunakan untuk kultur *stem cells*.

Isolasi dan Kultur *Inner Cell Mass Blastosis*

Sebanyak 138 embrio stadium blastosis dipaparkan dalam larutan pronase 0,25%, dan selanjutnya dicuci tiga kali dalam *modified phosphate buffered saline* (mPBS). Blastosis selanjutnya diinkubasi dalam *rabbit anti mouse antibody* selama 60 menit, dan *guinea pig complement* selama 30 menit pada suhu 37°C (Matahine *et al.*, 2008.), kemudian dipipet berulang hingga sel trofoblas yang terdapat

pada bagian luar blastosis terpisah dari *inner cell mass* (ICM). ICM selanjutnya dikultur pada *feeder layer* kumulus, MEF, atau tanpa *feeder layer*. Sebagai medium kultur adalah *stem cells medium* yang tersusun atas DMEM-*high glucose* yang disuplementasi dengan FBS 10%, NEAA 1%, dan *gentamicin* 50 µg/ml, mercaptoethanol 0,1 mM, dan *leukemia inhibitory factor* 20 ng/ml (Salomonis *et al.*, 2010; Matahine *et al.*, 2008, 2010); pada suhu 37°C, 5% CO₂. Kultur dilakukan selama tujuh hari hingga terbentuk koloni primer *stem cells*.

Kultur dan Karakterisasi Stem Cells

Koloni *stem cells* yang dihasilkan dipasase dengan memaparkan koloni *stem cells* tersebut dalam larutan tripsin 0,25%-EDTA 0,04% selama lima menit, dipipet berulang hingga dihasilkan sejumlah subkoloni kecil atau sel tunggal. Subkoloni dan sel tunggal tersebut dikultur seperti sebelumnya dalam beberapa cawan petri yang baru. Setelah lima kali pasase, dilakukan karakterisasi dengan memaparkan *stem cells* dalam paraformaldehide 4% selama 20 menit, dan diwarnai dengan larutan *alkaline phosphatase* (ALP) yang tersusun atas naphtol AS-MX phosphatase 200 µg/ml, *fast red TR salt* 1 mg/ml, dan *Tris Buffer* 100 mM, selama 30 menit pada suhu ruang. Koloni yang positif terhadap ALP (ALP⁺), berwarna merah dan mengindikasi masih bersifat pluripoten (Kitiyant *et al.*, 2000).

Variable yang diukur adalah tingkat perlekatan ICM (TP): persentase ICM yang melekat pada dasar cawan yang ditandai oleh

tidak terjadi perpindahan tempat ketika cawan kultur dimiringkan; tingkat pembentukan koloni primer (KP): persentase ICM yang berkembang membentuk koloni sel *multilayer* yang besar; tingkat pembentukan *cell line* (CL): persentase ICM yang menghasilkan galur *stem cells* yang bertahan hingga pasase kelima; tingkat pertumbuhan koloni (TPK): rataan pertambahan diameter koloni harian dibagi dengan diameter awal dikali 100%; dan *doubling time* (DT): jumlah satuan waktu (jam) yang dibutuhkan ESC untuk menggandakan diri; penghitungan diperoleh dari lama kultur (jam) dibagi jumlah kelipatan pertambahan diameter koloni.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data.

Penelitian dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Data penelitian dianalisis dengan sidik ragam/*analysis of variance* dan dilanjutkan dengan Uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

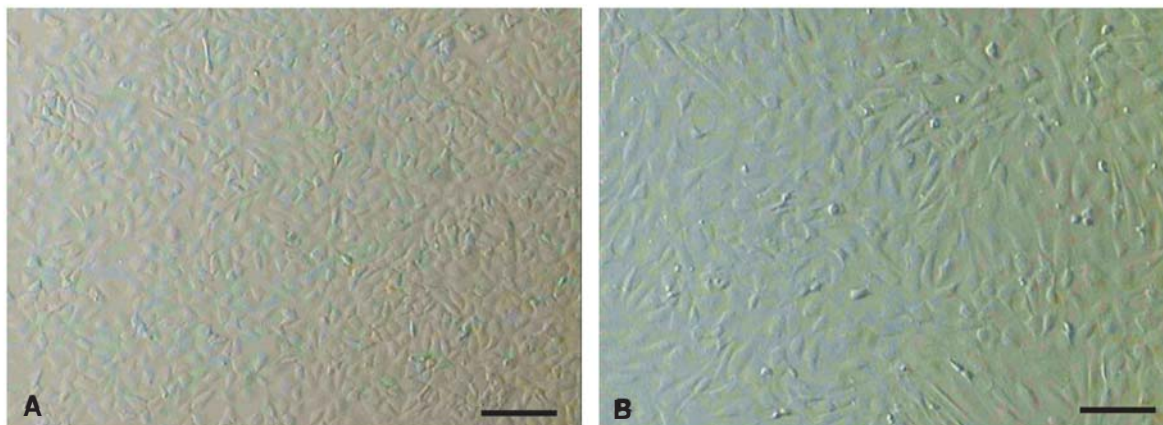
Data tentang profil pertumbuhan *stem cells* yang dikultur pada *feeder layer* kumulus /FLK (Gambar 1A), MEF (Gambar 1B), dan tanpa *feeder layer* disajikan pada Tabel 1. Profil pertumbuhan *stem cells* diukur berdasarkan tingkat perlekatan (TP) *inner cell mass* pada dasar cawan (Gambar 2A), tingkat pembentukan koloni primer *stem cells* (KP), tingkat pembentukan *cell line* (CL), tingkat pertumbuhan koloni (TPK) dan *doubling time*

Tabel 1. Profil pertumbuhan *stem cells* embrionik mencit yang dikultur pada *feeder layer* kumulus, MEF, dan tanpa *feeder layer*

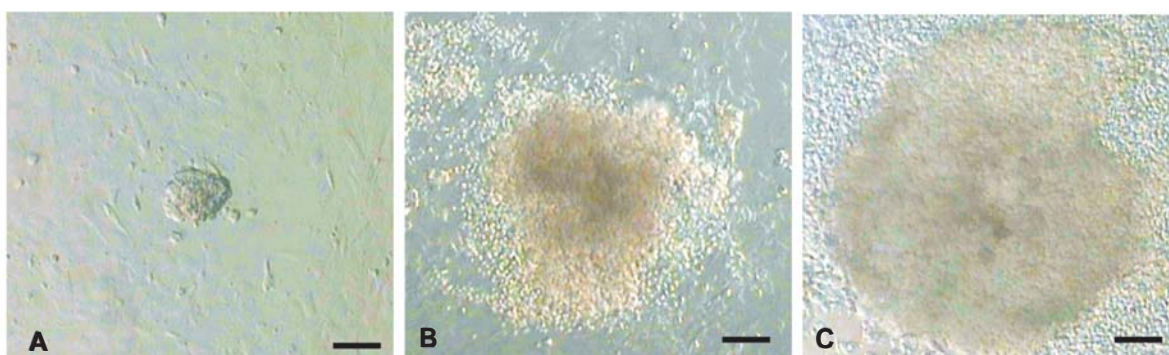
Variabel Penelitian	Tanpa Feeder Layer	Perlakuan	
		Feeder Layer Kumulus	MEF
TP	86,96 ± 4,25 ^a	93,48 ± 6,65 ^a	91,30 ± 10,95 ^a
KP	8,70 ± 7,06 ^b	50,00 ± 8,39 ^a	52,17 ± 7,90 ^a
CL	0,00 ± 0,00 ^b	8,70 ± 2,14 ^a	10,87 ± 4,48 ^a
TPK (%)	75,03 ± 11,82 ^b	129,23 ± 20,39 ^a	129,98 ± 19,33 ^a
DT (jam)	27,27 ± 4,03 ^b	17,06 ± 2,54 ^a	16,91 ± 2,17 ^a

Superscript yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Keterangan: TP: tingkat perlekatan ICM; KP: tingkat pembentukan koloni primer: persentase ICM yang berkembang membentuk koloni sel *multilayer* yang besar; CL: tingkat pembentukan *cell line*; TPK: tingkat pertumbuhan koloni DT: *doubling time*



Gambar 1. *Feeder layer* kumulus/FLK (A) dan *mouse embryonic fibroblast*/MEF *feeder layer* (B) yang digunakan untuk kultur *stem cells*. Bar: 100 μ m.



Gambar 2. Perkembangan *stem cells* embrionik mencit dalam kultur *in vitro*: A: ICM pada hari ke-2 kultur, B: Koloni *stem cells* pada hari ke-5 kultur, C: koloni *stem cells* pada hari ke-7 kultur. Bar: 100 μ m.

(DT). Tingkat perlekatan *inner cell mass* yang dikultur pada *feeder layer* kumulus, MEF dan tanpa *feeder layer* cukup tinggi (berada di atas 80%), dan tidak ada perbedaan ($P>0,05$) di antara ketiga sistem kultur tersebut. Seiring dengan pertambahan lama kultur, sejumlah besar *inner cell mass* mengalami degenerasi dan menyebabkan jumlah koloni primer *stem cells* yang terbentuk pada ketiga sistem kultur menjadi rendah. Jumlah *inner cell mass* yang mengalami degenerasi pada sistem kultur tanpa *feeder layer* mencapai 91,3%, yang menyebabkan KP pada sistem kultur tersebut menjadi sangat rendah yakni 8,70%, lebih rendah ($P<0,05$) daripada yang dikultur pada *feeder layer* kumulus (50,00%) dan MEF (52,17%). Koloni primer *stem cells* (Gambar 2B,C) yang terbentuk selanjutnya dipasase dengan harapan akan diperoleh sejumlah CL yang dapat bertahan hingga pasase kelima. Jumlah koloni primer yang berproliferasi dan bertahan hingga pasase kelima pada ketiga

sistem kultur berada di bawah 11%, dengan persentase CL pada MEF dan *feeder layer* kumulus yaitu masing-masing 10,87% dan 8,70%, lebih tinggi ($P<0,05$) daripada yang dikultur pada sistem tanpa *feeder layer* yakni 0,00%. Koloni *stem cells* pada sistem kultur tanpa *feeder layer* tidak ada yang bertahan hingga pasase kelima maka pengukuran TPK pada ketiga sistem kultur dilakukan pada pasase kedua, berdasarkan rata-rata pertambahan diameter koloni *stem cells* harian. Tingkat pertumbuhan koloni *stem cells* yang dikultur pada *feeder layer* kumulus tidak berbeda ($P>0,05$) dengan MEF, dan keduanya lebih tinggi ($P<0,05$) daripada sistem kultur tanpa *feeder layer*. Tingkat pertumbuhan koloni *stem cells* yang tinggi pada *feeder layer* kumulus dan MEF berdampak pada lebih pendeknya ($P<0,05$) *doubling time* (periode waktu yang dibutuhkan koloni *stem cells* untuk menggandakan diri) pada kedua sistem kultur tersebut dibandingkan dengan tanpa *feeder layer*. Koloni *stem cells*

yang bertahan hingga pasase kelima selanjutnya dikarakterisasi dengan *alkaline phosphatase staining*, dan hasilnya adalah lebih dari 75% koloni *stem cells* pada *feeder layer* kumulus dan MEF positif terhadap pewarnaan tersebut (data tidak ditampilkan), sedangkan pada sistem kultur tanpa *feeder layer* tidak dilakukan pewarnaan karena tidak satu pun koloni *stem cells* yang bertahan hingga pasase kelima. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *feeder layer* kumulus mampu secara optimal mempertahankan pluripotensi *stem cells* embrionik mencit.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa efektivitas sel kumulus sebagai *feeder layer* pada kultur *stem cells* mencit sebanding dengan MEF, dan keduanya lebih baik daripada sistem kultur tanpa *feeder layer*. Hampir semua variabel penelitian pada *feeder layer* kumulus dan MEF kecuali TP, lebih baik daripada sistem kultur tanpa *feeder layer*. Koloni primer, CL, TPK mengalami peningkatan masing-masing sebesar 41,30%; 8,70%, dan 54,20%, dan terjadi perpendekan DT 10,21 jam ketika *stem cells* dikultur pada *feeder layer* kumulus dibandingkan dengan tanpa *feeder layer* (Tabel 1). Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa *feeder layer* kumulus menghasilkan faktor penunjang atau menyediakan lingkungan kultur yang lebih kondusif bagi pertumbuhan *stem cells* embrionik mencit.

Menurut Kane *et al.*, (1992), *feeder layer* berpengaruh positif terhadap perkembangan sel embrionik melalui tiga cara: 1) *feeder layer* memproduksi berbagai bahan mitogenik untuk embrio, produk matriks ekstraseluler *feeder layer* menunjang pertumbuhan dan perkembangan sel embrionik, dan *feeder layer* dapat meminimalisir pengaruh dari berbagai substansi toksik yang dihasilkan selama kultur *in vitro*. Hal tersebut ditunjang oleh Joo *et al.*, (2001) yang melaporkan bahwa kontak langsung antara *feeder cell* dengan *stem cells*, memberikan pengaruh positif terhadap kemampuan tumbuh kembang dari sel-sel yang bersangkutan. Senada dengan itu, Roudebush *et al.*, (1995) melaporkan bahwa penggunaan sistem ko-kultur seperti sel kumulus memiliki beberapa keuntungan yaitu: dapat menghilangkan berbagai substansi yang merugikan dari medium kultur, memiliki aktivitas antioksidan, menghasilkan berbagai agen embriotropik spesifik, dan non spesifik seperti *growth factor*.

Sel kumulus mengekspresikan TGF- β tipe 1 dan 2 mRNA (Mulheron *et al.*, 1992), dan *activin A* (Lau *et al.*, 1999). Konsentrasi *activin A* dalam medium yang mengandung kumulus berkisar antara $539 \pm 107,2$ pg/ml hingga $875,5 \pm 101$ pg/ml (Lau *et al.*, 1999). Peranan *activin* dalam mempertahankan pluripotensi *stem cells* adalah melalui interaksi dengan reseptor *activin* tipe II (ActRII/IIB), menyebabkan fosforilasi dan aktivasi reseptor *activin* tipe I (ALK4 atau ActRIB). ALK4 memfosforilasi *Smad2* dan *Smad3*, membentuk kompleks dengan *Co-Smad* (*Smad4*). Kompleks tersebut terakumulasi dalam inti dan terikat pada *promoter region* dari gen target, dan meregulasi ekspresi gen tersebut untuk mempertahankan proliferasi dan pluripotensi *stem cells* (Feng dan Derynck, 2005). Menurut Xiao *et al.*, (2006), *activin A* dengan konsentrasi 10 ng/ml cukup untuk mempertahankan pluripotensi *stem cells* embrionik yang dikultur pada matrigel.

Activin/Nodal signaling mempertahankan pluripotensi *stem cells* embrionik manusia (Xiao *et al.*, 2006). Dalam penelitian tersebut, telah dibuktikan bahwa *stem cells* embrionik manusia dapat berkembang menjadi trofoblas jika *activin/Nodal signaling* dihambat. Pada morula manusia, sel-sel yang menerima sinyal *activin/Nodal* membentuk *inner cell mass*, sementara sel lain yang tidak menerima cukup sinyal *activin/Nodal* berkembang menjadi trofoblas. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *activin/Nodal signaling* berperan dalam meregulasi kejadian diferensiasi pertama pada perkembangan embrio manusia (Wu *et al.*, 2008).

Sel kumulus juga mengandung 4395 protein, 286 di antaranya termasuk protein membran, dan 185 termasuk protein inti (Memili *et al.*, 2007). Mereka juga mengidentifikasi 241 *receptor-ligand pathway*, 18 di antaranya adalah *growth factor* yang dilibatkan dalam proliferasi dan diferensiasi sel. Sel kumulus juga mengekspresikan beberapa *growth factor* seperti *Endothelial growth factor-D*, FGF, EGF, IGF, dan TGF (Memili *et al.*, 2007). Kumulus juga mengandung *laminin receptor* yang berfungsi untuk memediasi perlekatan, migrasi, dan organisasi sel, 249 *transcription factor* di antaranya adalah: 4 *signal transducer and activator of transcription* (STAT) *proteins* (Memili *et al.*, 2007), *Wnt2* dan β -catenin (Wang *et al.*, 2009) yang berperan dalam

mempertahankan proliferasi dan pluripotensi *stem cells* embrionik (Miyabayashi *et al.*, 2007). Secara umum, hasil penelitian ini sedikit berbeda dengan beberapa penelitian sebelumnya. Hasil penelitian Hashemi-Tabar *et al.*, (2005) menunjukkan bahwa dari 10 blastosis yang dikultur pada MEF, dihasilkan empat koloni primer (40%), dan tiga di antaranya (30%) dapat menghasilkan *cell line* (koloni sel yang dapat bertahan hingga pasase 5). Selain itu, *doubling time stem cells* menciit pada penelitian ini lebih pendek daripada *stem cells* embrionik manusia yang berkisar antara 30 hingga 40 jam (Chen *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2008), dan *stem cells* embrionik kelinci yaitu 24 jam (Wang *et al.*, 2007).

SIMPULAN

Feeder layer kumulus efektif untuk menunjang pertumbuhan *stem cells* embrionik menciit.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan melakukan uji immunohistokimia terhadap koloni *stem cells* yang dihasilkan sehingga diperoleh gambaran yang lebih lengkap tentang stautus pluripotensi dari *stem cells* tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini merupakan bagian dari disertasi yang disusun dalam rangka penyelesaian studi Doktor di Institut Pertanian Bogor, tahun 2009. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen Dikti yang telah membiayai penelitian ini, dan juga kepada kepala dan seluruh staf Laboratorium Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan kegiatan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen L, Daley GQ. 2008. Molecular basis of pluripotency. *Human Molecular Genetics* 17:23–27.
- Cillo F, Brevini TAL, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. 2007. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 134: 645–650.
- Feng XH, Derynck R. 2005. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:659–693.
- Hashemi-Tabar M, Javadnia F, Orazizadeh M, Baazm M. 2005. Isolation and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 3: 42-46.
- James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. 2005. TGF β /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132:1273-1282.
- Joo BS, Kim MK, Na YJ, Moon HS, Lee KS, Kim HD. 2001. The mechanism of action co-culture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious component. *Fertil Steril* 75(1):193-199.
- Kane MT, Carney EW, Ellington JE. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology* 38:297–313.
- Kitiyanant Y, Saikhun J, Guocheng J, Pavasuthipaisit K. 2000. Establishment and long-term maintenance of bovine embryonic stem cell lines using mouse and bovine mixed feeder cells and their survival after cryopreservation. *Science Asia* 26:81-86.
- Lai DM, Cheng WW, Liu TJ, Jiang LZ, Huang Q, Liu T. 2009. Use of human amnion epithelial cells as a feeder layer to support undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells. *Cloning and Stem Cells* 11:331-340
- Lau CP, Ledger WL, Groome NP, Barlow DH, Muttukrishna S. 1999. Dimeric inhibins and activin A in human follicular fluid and oocyte-cumulus culture medium. *Hum Reprod* 14:2525-2530.
- Levenstein ME, Ludwig TE, Xua R-H, Llanasa RA, VanDenHeuvel-Kramera K, Manninga D, Thomson JA. 2006. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24:568-574.
- Li M, Ma W, Hou Y, Sun X-F, Sun Q-Y Wang W-H. 2004. Improved isolation and culture of embryonic stem cells from chinese miniature pig. *J Reprod Dev* 50:237-244.
- Liu T, Cheng WW, Liu T, Guo L, Huang Q, Jiang L, Du X, Xu F, Liu Z, Lai D. 2010. Human amniotic epithelial cell feeder layers maintain mouse embryonic stem cell pluripotency via epigenetic regulation of the c-Myc promoter. *Acta Biochim Biophys Sin* 42:109-115.

- Matahine T, Supriatna I, Sajuthi D, Boediono A. 2008. Produksi *embryonic stem cells* dari *inner cell mass* blastosis yang diisolasi dengan metode enzimatik dan *immunosurgery*. *Jurnal Veteriner* 9:13-19.
- Matahine T, Boediono A, Supriatna I, Sajuthi D. 2010. Growth potential of mouse stem cells produced from embryos at cleavage, morula and blastocyst stages. Proceedings The First Congress of SEAVSA. Bogor, Indonesia 20-22 Oct 2010. Pp 77-78.
- Memili E, Peddinti D, Shack LA, Nanduri B, McCarthy F, Sagirkaya H, Burgess SC. 2007. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction* 133: 1107-1120.
- Miyabayashi T, Teo JL, Yamamoto M, McMillan M, Nguyen C, Kahn M. 2007. Wnt/ β -catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci* 104:5668-5673.
- Mulheron GW, Bossert NL, Lapp JA, Walmer DK, Schomberg DW. 1992. Human granulosa-luteal and cumulus cells express transforming growth factors-beta type 1 and type 2 mRNA. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 74:458-460.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. 2006. Preparing feeder cell layers from STO or mouse embryo fibroblast (MEF) cells: treatment with mitomycin C. *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot4399
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. 2006. Preparing feeder cell layers from STO or mouse embryo fibroblast (MEF) cells: treatment with γ -Irradiation. *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot4400
- Ogawa K, Saito A, Matsui H, Suzuki H, Ohtsuka S, Shimosato D, Morishita Y, Watabe T, Niwa H, Miyazono K. 2007. Activin-nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 120:55-65.
- Park YB, Kim YY, Oh SK, Chung SG, Ku SY, Kim SH, Choi YM, Moon SY. . 2008. Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture. *Exp Mol Med* 40: 98-108.
- Roudebush W, Levine AS, Lodge JS, Tsai CC, Butler WJ. 1995. Human follicular fluid and mouse cumulus cells act synergistically to enhance preimplantation mouse Balb/cJ embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 12:733 (Abstr).
- Salomonis N, Schlieve CR, Pereira L, Wahlquist C, Colas A, Zambon AC, Vranizan K, Spindler MJ, Pico AR, Cline MS, Clark TA, Williams A, Blume JE, Samal E, Mercola M, Merrill BJ, Conklin BR. 2010. Alternative splicing regulates mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *PNAS* 107 (23):10514-10519.
- Vanderhyden BC, Macdonald EA, Nagyova E, Dhawan A. 2003. Evaluation of members of the TGF β superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. *Reproduction Supplement* 61: 55-70.
- Wang S, Tang X, Niu Y, Chen H, Li B, Li T, Zhang X, Hu Z, Zhou Q, Ji W. 2007. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:481-489.
- Wang H-X, Tekpetey FR, Kidder GM. 2009. Identification of WNT/ β -catenin signaling pathway components in human cumulus cells. *Mol Hum Reprod* 15:11-17.
- Wu Z, Zhang W, Chen G, Cheng L, Liao j, Jia N, Gao Y, Dai H, Yuan J, Cheng L, Xiao L. 2008. Combinatorial signals of activin/nodal and bone Morphogenic protein regulate the early lineage Segregation of human embryonic stem cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 283: 24991-25002.
- Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. 2006. Activin maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24:1476-86.