

# IDENTIFIKASI EMISI *FLUORESCENCE* PADA EKSPERIMEN PENGAMATAN KALSIMUM ( $\text{Ca}^{2+}$ ) DALAM OOSIT *IMMATURE* KAMBING YANG DIBERI INDIKATOR DYE FLUO-3 DENGAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSKOPIC (CLSM)*

Rahmatia Putri<sup>1)</sup>, DJ Djoko Hs<sup>2)</sup>, Unggul P. Juswono<sup>2)</sup>, Hari Soepriandono<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Mahasiswa Jurusan Fisika, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

<sup>2)</sup> Dosen Jurusan Fisika, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

<sup>3)</sup> Mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

Email: Rahmatia\_putri66@yahoo.co.id

## ABSTRACT

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) merupakan suatu proses interaksi antara kedua fluorochromes dari donor ke akseptor pada jarak tertentu. Peristiwa Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) dapat diamati dengan menggunakan Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Fluoview FV 1000. Dalam penelitian ini dilakukan pengamatan pada oosit muda kambing dengan mengidentifikasi peristiwa FRET pada eksperimen pengamatan kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dalam oosit muda dengan indikator dye Fluo-3, serta untuk mengidentifikasi efek dari dirubahnya filter untuk menangkap panjang gelombang emisi hasil fluorescence pada eksperimen pengamatan kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dengan indikator dye Fluo-3, serta dari Fluo-3 ke bagian sel lain di dalam oosit muda. Oosit muda akan ditembak oleh laser Argon, dimana hasil penembakan laser tersebut akan mengeksitasi kalsium yang ada di dalam oosit, yang kemudian akan terjadi proses Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) dari kalsium ke Fluo-3, dan Fluo-3 ke bagian sel lain. Hasil dari fluorescence tersebut akan dideteksi oleh 3 detektor. Pada penelitian ini Spesimen dapat dianalisa dengan cara memotong bagian yang akan diteliti, bagian yang dipotong itu berkisar di antara zona pelucida di dalam oosit muda, dengan mengidentifikasi intensitas emisi pada jarak 20 nm – 40 nm. Hasil yang didapatkan adalah terjadi peristiwa FRET dari kalsium ke Fluo-3 yang menghasilkan perbendaran warna hijau yang akan ditangkap oleh detektor (channel 1), dan terjadi peristiwa FRET dari Fluo-3 ke bagian sel lain yang menghasilkan perpendaran warna kuning dan merah yang akan ditangkap oleh detektor (channel 2 dan channel 3).

**Kata kunci:** *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET), Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), indikator dye Fluo-3, detektor.

## PENDAHULUAN

Penelitian ini merupakan bagian dari riset yang menunjukkan adanya perubahan kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) di dalam oosit. Pada oosit muda hasil pewarnaan dengan Fluo-3 berdasarkan pencitraan Fluorescence intensitas kalsium tinggi terutama pada zona pelucida. Fluorescence sendiri merupakan suatu proses pemancaran radiasi cahaya oleh suatu materi setelah tereksitasi oleh berkas cahaya berenergi tinggi. Emisi cahaya terjadi karena proses absorpsi cahaya oleh atom yang mengakibatkan keadaan atom tereksitasi. Keadaan atom yang tereksitasi akan kembali keadaan semula dengan melepaskan energi yang berupa cahaya atau deeksitasi (Carroll, 1994).

Pada penelitian ini peristiwa *fluorescence* terjadi pada kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ke indikator dye Fluo-3, dan pada indikator dye Fluo-3 ke bagian sel lain di dalam oosit *immature*. Selain menghasilkan perpendaran

warna atau berfluorescence, keberadaan kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) akan menimbulkan efek fisika khusus berupa energi transfer secara non radiatif yang dapat diamati dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)* (Lambert, 2006).

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) adalah suatu proses interaksi antara kedua fluorochrome yang disertai dengan transfer energi langsung dari donor ke akseptor pada jarak tertentu. Selain mempunyai jarak tertentu peristiwa FRET juga dapat terjadi apabila panjang gelombang emisi yang dihasilkan oleh akseptor selalu lebih besar dan energinya selalu lebih kecil dari pada donor (Fellers, 2007).

Olympus Fluoview FV 1000 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) merupakan alat yang digunakan untuk melihat sampel yang bekerja dengan metode fluoresensi dan menggunakan teknik filtrasi spasial (Spatial Filtering Technique). Olympus Fluoview FV

1000 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) ini memiliki 4 channel, dengan resolusi yang besar (sampai 4096 x 4096 pixel). Hasil dari microscope akan di masukkan kedalam komputer yang khusus beroperasi dengan CLSM (Pawley, 2006). Menurut (Tortora, 2001), pengamatan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) untuk mengamati sampel berdasarkan adanya perpendaran warna atau fluoresence. Untuk sampel yang pada dasarnya tidak berpendar dapat ditambahkan zat pewarna yang dapat berpendar dan mampu berikatan dengan sampel yang diamati.

Pengamatan peristiwa *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) pada penelitian ini menggunakan metode observasi dengan alat *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) Olympus Fluoview FV 1000. Pengamatan dilakukan dengan cara menggunakan sumber eksitasi berupa laser Ar yang akan ditembakkan pada objek berupa oosit muda yang diberi indikator Fluo-3, yang kemudian akan menghasilkan suatu perpendaran warna dengan panjang gelombang tertentu. Emisi panjang gelombang hasil dari peristiwa fluorescence akan ditangkap dan diseleksi oleh filter yang kemudian akan dipresentasikan ke dalam pengaturan dye yang sesuai. Dengan memilih panjang gelombang emisi yang sesuai, berarti secara otomatis mengubah filter-filter yang ada didalam alat CLSM.

Mekanisme dasar FRET melibatkan *fluorophore* donor dalam elektronik tereksitasi yang dapat menstransfer energi eksitasi ke *fluorophore* akseptor terdekat secara non-radiasi melalui jarak interaksi dipol-dipol. Teori transfer energi berdasarkan konsep *fluorophore* sebagai dipol osilasi yang dapat mengalami pertukaran energi dengan kedua dipol yang memiliki frekuensi resonansi yang sama. Transfer energi resonansi dengan perilaku osilator digabungkan, seperti sepasang garpu tala yang bergetar pada frekuensi yang sama. Peristiwa transfer energi radiasi membutuhkan emisi dan penyerapan kembali foton yang tergantung pada dimensi fisik serta sifat optik spesimen. Tidak seperti mekanisme radiasi, resonansi transfer energi dapat menghasilkan sejumlah besar informasi struktural tentang

sepasang donor-akseptor. Transfer energi non-radiasi antar *fluorophore* tergantung pada jarak jauh dekatnya antara donor dan akseptor. Teori resonansi transfer energi pada awalnya dikembangkan oleh Theodor Foster, dan untuk menghormati kontribusunya teori ini dinamai menurut namanya "The Foster Teori".

## METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan oosit muda kambing yang telah diberi indikator dye Fluo-3 yang kemudian akan diamati oleh *Confocal Laser Scanning Mikroskopik* (CLSM). Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi:

### **Prosedur Persiapan Bahan Penelitian.**

Dalam eksperimen ini menggunakan oosit muda. Koleksi oosit diawali dengan pengumpulan ovarium. Selanjutnya oosit dikoleksi dengan cara aspirasi dan penyeleksian oosit kambing yang belum terbuahi. Setelah tahap aspirasi selesai akan dilakukan tahap pencucian dengan menggunakan larutan PBS kemudian ovarium ditaruh pada tabung reaksi yang telah berada di *waterbath*. Kemudian seleksi oosit dilakukan di bawah *mikroskop interved*. Oosit yang dipilih yaitu oosit dengan kualitas yang baik dengan ditunjukkan kekompakan sel *corona radita* dan *cumulus oophorus*

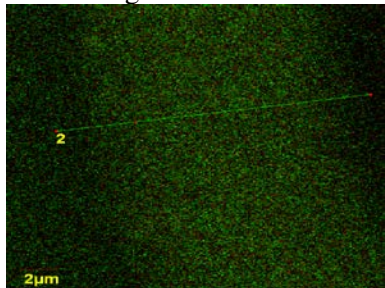
**Pengaturan alat CLSM.** Sebelum mengamati sel oosit dalam mikroskope Confocal Laser, diperlukan pengaturan alat dan program, dalam penelitian ini digunakan laser Argon. Proses penting yang perlu dilakukan adalah mengatur pemfokusan untuk menghasilkan bayangan dengan perbesaran kuat. Kemudian pemilihan panjang gelombang emisi yang disesuaikan dengan penelitian yang diinginkan, dalam penelitian ini menggunakan banyak panjang gelombang emisi yang telah dipilih berdasarkan kombinasi yang sesuai.

**Prosedur Analisa Data FRET.** Setelah hasil persiapan oosit muda dan persiapan pengaturan alat CLSM telah selesai, maka sel oosit muda yang sudah diberi indikator berupa Fluo-3 siap untuk diamati. Oosit muda akan ditembak oleh laser Ar dimana hasil penembakan laser tersebut akan mengeksitasi kalsium yang ada di dalam oosit, yang kemudian akan terjadi proses *Fluorescence*

*Resonance Energy Transfer* (FRET) dari kalsium ke Fluo-3, dan Fluo-3 ke bagian sel lain. Hasil dari fluorescence tersebut akan dideteksi oleh 3 detektor. Pada penelitian ini spesimen dapat dianalisa dengan cara menandai bagian yang akan diteliti, bagian yang ditandai itu berkisar di antara zona pelucida. Peristiwa FRET ditandai dengan mengidentifikasi intensitas emisi-emisi yang kemungkinan terjadi FRET yang teridentifikasi pada jarak 20 nm-40 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati peristiwa *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) pada kalsium ( $Ca^{2+}$ ) di dalam oosit muda dengan Fluo-3 sebagai indikator dye. Selain itu penelitian ini juga untuk mengamati peristiwa *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) dari kalsium ke bagian sel lainnya dengan dirubahnya pengaturan dye yang sudah ditentukan sebelumnya. Spesimen dapat dianalisa dengan cara menandai bagian yang akan diteliti yaitu pada bagian zona pelucida. Untuk mendapatkan data yang lebih akurat maka dilakukan perbesaran objektif 600x dan perbesaran digital 40x.

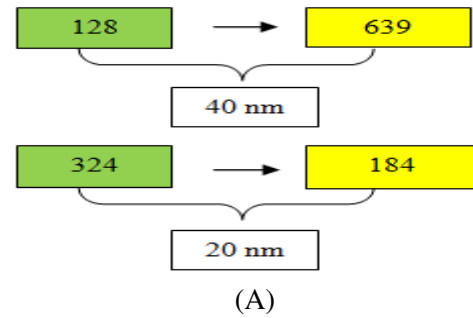


(A)

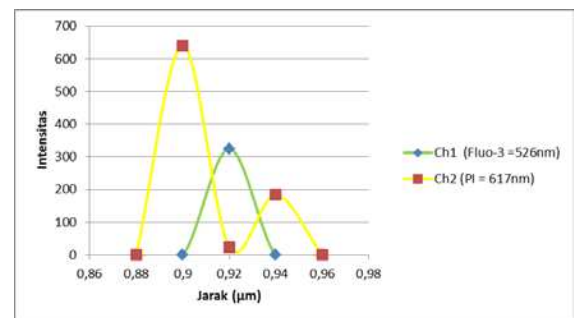
**Gambar 1.** spesimen yang dipotong pada zona pelucida dengan perbrsaran objekstif 60x dan perbesaran digital 40x.

Dari hasil pemotongan spesimen yang akan diteliti, kemudian dapat diubah menjadi file excel dengan cara memilih analisa pada jendela program olympus kemudian memilih grafik 3D yang akan menampilkan intensitas dalam bentuk grafik 3D. Data yang diperoleh dalam bentuk grafik 3D memiliki tingkat kesulitan yang tinggi untuk dianalisa karena menampilkan intensitas yang sangat banyak dan berhimpit, maka dari itu dilakukan analisa data FRET dengan cara yang lebih mudah yaitu

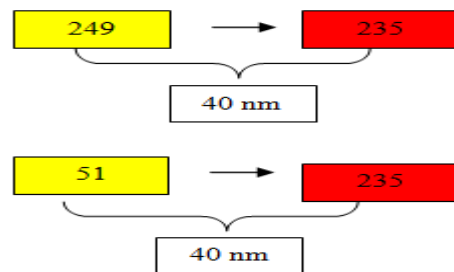
dengan mengubah data hasil grafik 3D ke file excel seperti Gambar 2A. Dengan cara mengarahkan kursor pada gambar grafik 3D, kemudian klik kanan dan pilih save as dengan file ekstensi xls atau excel. Dari data file excel akan diperoleh data intensitas banyak dan dapat dengan mudah untuk diidentifikasi.



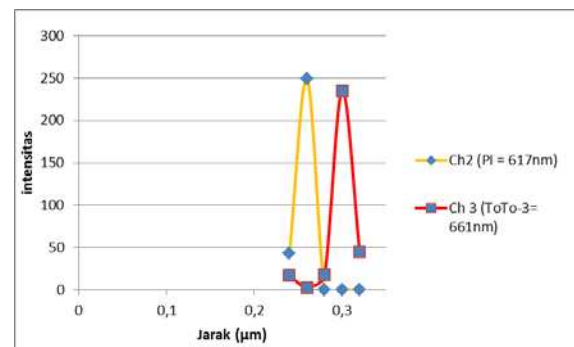
(A)



(B)



(A)



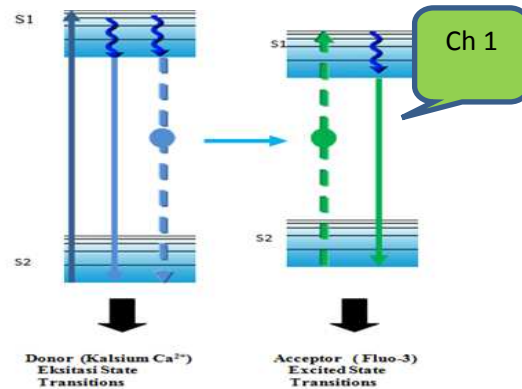
(B)

**Gambar 2.** (A) Analisa Data dalam Bentuk Intensitas. (B) Analisa Data dalam Bentuk Grafik.

Setelah diubah dalam format excel, maka akan mendapatkan data dengan banyak intensitas. Selanjutnya intensitas- intensitas tersebut diseleksi dengan mengidentifikasi emisi-emisi kemungkinan terjadi FRET yang teridentifikasi pada pada range 20 nm sampai 40nm. Intensitas emisi yang telah diseleksi kemudian dibuat grafik excel yang menunjukkan peristiwa transfer energi dari warna hijau pada channel 1, ke warna kuning pada cheneel 2 atau transfer energi dari warna kuning ke warna merah pada channel 3 pada jarak 20-40 nm. Transfer energi dari warna hijau ke warna kuning maupun dari warna kuning ke merah seperti gambar diatas. Transfer energi terjadi dari energi tinggi ke energi yang lebih rendah.

**Identifikasi FRET dari kalsium ( $Ca^{2+}$ ) ke Fluo-3.** Oosit muda yang telah diberi probe berupa Fluo-3 akan diamati dengan Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM), dan terlihat adanya perbendaran warna dengan panjang gelombang berbeda-beda yang kemudian akan ditangkap oleh filter yang dipresentasikan ke dalam dye dan masuk ke channel. Perpendaran warna-warna ini muncul dikarenakan adanya interaksi ( $Ca^{2+}$ ) dengan Fluo-3 (akseptor), maupun Fluo-3 dengan bagian sel lainnya. Ketika suatu ( $Ca^{2+}$ ) sebagai donor ditembak oleh suatu laser yang berenergi tinggi dengan panjang gelombang 488 nm dan prosentase maksimum 80%, energi dari laser akan diserap secara resonance oleh ( $Ca^{2+}$ ) pada keadaan  $S_0$  sehingga elektron dalam ( $Ca^{2+}$ ) akan tereksitasi ke tingkat yang lebih tinggi  $S_1$ , kemudian elektron di dalam ( $Ca^{2+}$ ) akan berada dalam keadaan tidak stabil dan melakukan *vibrational relaxation*. Karena elektron berpindah ke lintasan yang energinya lebih tinggi, pada saat itulah sejumlah energi yang telah diserap terlepas kembali keadaan semula  $S_0$  atau elektron tersebut mengalami deeksitasi. Pada saat deeksitasi energi yang semula diserap akan dilepaskan secara radiatif maupun secara non radiatif. Energi yang dilepaskan secara non radiatif akan ditransferkan kepada Fluo-3 yang terletak pada jarak 20-40 nm. Energi yang ditransfer secara non radiatif kepada Fluo-3 mengakibatkan elektron pada Fluo-3 tereksitasi ke tingkatan energi yang lebih tinggi. Karena elektron berpindah ke tingkatan yang lebih tinggi, pada saat itulah energi yang telah diserap oleh elektron akan terlepas kembali keadaan

semula atau terdeeksitasi. Kemudian Fluo-3 yang berperan sebagai akseptor akan memancarkan spektrum cahaya berwarna hijau yang akan ditangkap oleh channel 1.



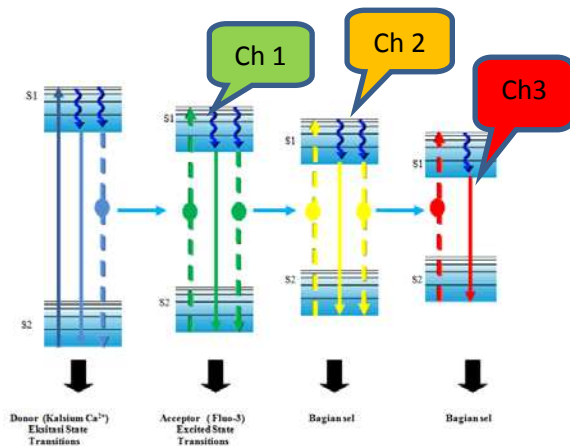
**Gambar 3.** Diagram Jablonski yang menunjukkan peristiwa FRET dari donor ke akseptor.

**Identifikasi Emisi FRET dari kalsium ( $Ca^{2+}$ ) → Fluo-3 dan dari Fluo-3 → bagian sel.** Ketika suatu oosit muda dikenai suatu sinar laser dengan energi yang besar, maka elektron yang ada kalsium di dalam oosit (donor) akan tereksitasi kemudian disaat deeksitasi (elektron kembali keadaan dasar) ( $Ca^{2+}$ ) tersebut akan memancarkan energi yang lebih kecil. Energi yang terpancar inilah yang akan ditangkap oleh Fluo-3 (akseptor) yang berada pada jarak 20-40 nm. Energi yang ditangkap oleh Fluo-3 ini juga akan dipergunakan untuk mengeksitasi elektron yang ada didalamnya, kemudian ketika Fluo-3 mengalami deeksitasi, elektron akan melepaskan energi secara radiatif dan non radiatif. Hasil pelepasan energi secara radiatif akan menghasilkan pendaran warna hijau dengan range panjang gelombang tertentu yang akan dideteksi oleh channel 1. Sedangkan hasil pelepasan energi secara non radiatif akan ditransfer ke bagian sel lain pada jarak 20-40 nm

Energi yang dilepas berupa non radiatif akan ditangkap oleh bagian sel, energi inilah yang dipergunakan untuk mengeksitasi elektron yang ada di dalamnya, kemudian bagian sel akan mengalami deeksitasi yaitu kembali kekeadaan dasar. Pada saat deeksitasi bagian sel tersebut akan melepaskan energi secara radiatif berupa perpendaran warna kuning dengan panjang gelombang emisi yang lebih besar dari sebelumnya yang akan ditangkap oleh detektor

channel 2 dan memiliki energi yang lebih kecil daripada energi sebelumnya. Channel 2 khusus menangkap spektrum warna kuning dengan range panjang gelombang tertentu dari hasil fluorescence. Sedangkan pelepasan energi secara non radiatif akan di transfer ke bagian sel lain yang masih dalam satu bagian dalam zona peluisida.

Energi yang ditangkap oleh bagian sel lain inilah yang akan digunakan untuk mengeksitasi elektron, kemudian akan mengalami deeksitasi yang akan menghasilkan pancaran spectrum cahaya berwarna merah secara radiatif. Pancaran spektrum cahaya berupa warna merah yang memiliki range panjang gelombang emisi tertentu akan ditangkap oleh detektor channel 3.



**Gambar 4.** Diagram Jablonski yang menunjukkan peristiwa FRET dari Kalsium ke Fluo-3, dan Fluo-3 ke bagian sel.

**Identifikasi hasil transfer energi dari kalsium ( $Ca^{2+}$ ) → Fluo-3 → bagian sel lain.** Hasil Fluorescence akan ditangkap oleh masing-masing detektor channel yang sesuai. Channel 1 akan menangkap panjang gelombang emisi antara 515 nm sampai dengan 570 nm dengan warna hijau. Untuk Channel 2 akan menangkap panjang gelombang emisi antara 570 nm sampai dengan 630 nm dengan warna kuning. Sedangkan channel 3 akan menangkap panjang gelombang emisi antara 630 nm sampai dengan 700 nm dengan warna merah. Seperti yang tertera pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Data hasil penelitian.

No	Settingan dye	FRET (kali)		Total (kali)
		Hijau → Kuning	Kuning → Merah	
1	Calsium Green 2 ( $\lambda = 536$ nm)	35	11	45
	Q dot 585 ( $\lambda = 585$ nm)			
	Q dot 705 ( $\lambda = 705$ nm)			
2	Calsium Green 5N ( $\lambda = 532$ nm)	35	13	48
	Calsium Orange 5 N ( $\lambda = 582$ nm)			
	Cy 5 ( $\lambda = 666$ nm)			
3	Fluo-3 ( $\lambda = 526$ nm)	22	11	33
	PI ( $\lambda = 617$ nm)			
	TOTO-3 ( $\lambda = 661$ nm)			

Pemilihan pengaturan dye diatas berhubungan dengan penggunaan filter. Filter secara otomatis akan menangkap dan menyaring panjang gelombang emisi yang sesuai dengan warna yang ada pada filter. Pada filter sendiri terdapat banyak warna dari ungu-biru-hijau-kuning-merah. Pengaturan konfigurasi filter akan berhubungan dengan pemilihan pengaturan dye disekitar itu. Karena dalam penelitian ini menggunakan indikator dye berupa Fluo-3 dengan panjang gelombang emisi puncak 526 nm, maka secara otomatis filter akan menangkap lebih banyak warna hijau di sekitaran panjang gelombang emisi puncak 526 nm tersebut, yang kemudian akan dipresentasikan dalam nama-nama pengaturan dyes yang sesuai dengan panjang gelombang emisi puncak yang dikeluarkan oleh Fluo-3. Maka pengaturan dyes yang memiliki panjang gelombang emisi dikisaran panjang gelombang emisi puncak Fluo-3 (526 nm) dapat menangkap warna hijau tersebut. Dengan memilih pengaturan dye yang dapat bekerja antara kisaran warna hijau, maka secara otomatis kita mengatur filter.

Data penelitian diatas dapat dilihat pengaturan dye Calsium Green 5-N dengan dan pengaturan dye Calsium Orange 5-N dapat menangkap transfer energi dari warna hijau ke kuning paling banyak yaitu 35 kali. Sedangkan transfer energi dari warna kuning ke merah yang ditangkap oleh pengaturan dye Calsium Orange 5-N dan pengaturan dye Cy5 dengan dapat menangkap transfer energi sebanyak 13 kali. Disusul dengan transfer energi dari warna hijau yang ditangkap oleh pengaturan dye Calsium Green-2, ke warna kuning yang ditangkap oleh pengaturan dye Q dot 585 nm sebanyak 35 kali. Dan transfer energi dari warna kuning ke merah, dimana warna merah akan

ditangkap oleh pengaturan dye Q dot 705 nm, maka akan terjadi transfer energi sebanyak 11 kali. Selanjutnya transfer energi dari hijau ke kuning yang terbanyak dengan 22 kali adalah dengan pengaturan dye Fluo-3 untuk warna hijau, dan pengaturan dye PI. Untuk transfer energi dari kuning ke merah, dimana warna merah akan ditangkap oleh pengaturan dye TOTO-3, maka akan terjadi transfer energi sebanyak 11 kali. Dari hasil tersebut membuktikan bahwa transfer energi dari hijau ke kuning terbanyak berada pada daerah sekitar dilihat pada data hasil penelitian Calcium Green 5-N dan Calcium Green 2 memiliki transfer energi lebih banyak daripada Fluo-3 hal itu disebabkan karena intensitas Calcium Green-5N dan Calcium Green-2 lebih tinggi dari pada Fluo-3. Karena intensitas Calcium Green 5-N dan Calcium Green-2 yang lebih tinggi, maka secara otomatis range spektrum warna juga akan lebih lebar dan hal itu dapat dibuktikan pada tabel fluorescence dyes. Selain itu intensitas yang lebih tinggi akan membuat hasil pencitraan yang teramati oleh CLSM pada pencitraan Calcium Green 5-N dan Calcium Green-2 terlihat lebih bagus dengan sebaran yang banyak daripada Fluo-3.

## KESIMPULAN

Terjadi peristiwa Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) pada kalsium sebagai donor ke Fluo-3 sebagai akseptor, dan terjadi peristiwa FRET dari Fluo-3 ke bagian sel di dalam oosit muda pada jarak 20 - 40 nm. Hasil dari fluorescence akan ditangkap oleh filter yang akan dipresentasikan oleh pengaturan dye. Calcium Green 5-N dan Calcium Orange merupakan pengaturan dye konfigurasi filter satu dan dua yang menangkap transfer energi dari hijau ke kuning paling banyak. Channel 1 akan mendeteksi panjang gelombang emisi antara range 515 nm- 570 nm dengan spectrum warna hijau, sedangkan channel 2 akan mendeteksi panjang gelombang emisi antara range 570 nm- 630 nm dengan spectrum warna kuning, dan untuk channel 3 akan mendeteksi panjang gelombang emisi antara range 630 nm - 700 nm dengan spectrum warna merah.

panjang gelombang emisi puncak sekitar 526 nm- 636 nm untuk pengaturan dye yang menangkap warna hijau. Sementara untuk pengaturan dye yang menangkap warna kuning dengan panjang gelombang emisi 582 nm - 618 nm. Dan untuk pengaturan dye yang menangkap warna merah dengan panjang gelombang emisi 655 nm- 681 nm. Hal tersebut dikarenakan nama-nama pengaturan yang berapa pada daerah panjang gelombang emisi puncak yang dihasilkan oleh indikator dye Fluo-3. Dapat

## DAFTAR PUSTAKA

- Carrol, J., k. swann, d. whittingham dan m. whtaker. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular  $[Ca^{2+}]$  oscillations during the growth and meiotic maturation oocyte. *Great Britain The Company of Biologist*. 120: 3507-3517.
- Fellers, T. J. d. M. W. D. 2007. Applications in Confocal Microscopy, Cameleons: Calcium Ion Probes. *Olympus Fluoview Resource Center*.
- Lambert, D. 2006. Kalsium Signaling Protokol. Human Press.
- Pawley, J. B., Ed. 2006. Handbook of Biological Confocal Microscopy (3rd ed). Springer Berlin.
- Tortora, G. J. 2001. Microbiology. An Introduction. Addison Wesley Longman Inc. USA