

## The Difference of Epidermal Growth Factor Concentration Between Fresh and Freeze-Dried Amniotic Membranes

Ihsan, Prijanto

Department of Ophthalmology

School of Medicine, Airlangga University/Dr. Soetomo General Hospital  
Surabaya

### ABSTRACT

*This research has been conducted to measure the difference of Epidermal Growth Factor (EGF) concentration between fresh and freeze-dried amniotic membranes. Experimental one group pretest - post test design was employed with 13 amniotic membranes. Each amniotic membrane was divided into two parts. The first part was without preservation (fresh) and the second part was with preservation (freeze-dried). Both parts of amniotic membrane were extracted using ultrasonic disintegrator then the concentration of EGF was measured using ELISA method. The result showed the average concentration of EGF in fresh amniotic membrane was  $122,756 \pm 11,591$  pg/g while in freeze-dried amniotic membrane was  $100,436 \pm 9,690$  pg/g. Average degradation of EGF concentration was  $22,320 \pm 15,353$  pg/g with estimated percentage degradation between 11,04–23,96%. It can be concluded that EGF concentration in fresh amniotic membrane is significantly higher than EGF concentration in freeze-dried amniotic membrane.*

**Key words:** EGF, fresh amniotic membrane, freeze-dried amniotic membrane, ELISA

Correspondence: Ihsan, c/q: Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Mata, Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo 6-8 Surabaya 60286.  
E-Mail: murnaihsan@yahoo.co.id

### PENDAHULUAN

Membran amnion merupakan lapisan terdalam dari plasenta yang telah banyak digunakan sebagai biomaterial dalam berbagai aplikasi klinis. Hal ini disebabkan karena membran amnion secara spesifik mempunyai beberapa sifat yang menguntungkan antara lain bersifat antiadesif, bakteriostatik, antiangiogenesis, antiinflamasi, antisikatrik, *tensile strength* yang sangat tinggi, melindungi luka, mengurangi nyeri dan mempunyai efek reepitelisasi. Ketersediaan membran amnion yang hampir tak terbatas serta proses mendapatkannya yang mudah dan murah untuk keperluan terapi, menjadikannya semakin potensial sebagai biomaterial.<sup>1,2,3</sup>

Membran amnion segar mempunyai keterbatasan secara klinis, biologis dan logistik yaitu tidak tahan lama, tidak efisien dan membutuhkan waktu dalam pengujian serologis (pemeriksaan perlu diulang 6 bulan kemudian untuk kemungkinan adanya *window period*). Efek

penyembuhan pada membran amnion segar diduga lebih besar dibandingkan membran amnion yang dipreservasi karena proses preservasi yang dilakukan terhadap membran amnion dapat menurunkan sel-sel aktif termasuk *growth factor*.<sup>1,4,5,6,7,8,9,10,11</sup>

Membran amnion kering beku saat ini sudah banyak diproduksi secara komersial, termasuk di Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo. Produksi membran amnion di Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo lebih difokuskan dalam bentuk kering beku. Produksi membran amnion kering beku pada tahun 2006 sebanyak 3919 unit dan pada tahun 2007 produksinya meningkat mencapai 5838 unit. Utomo (2002) melaporkan pada penggunaan membran amnion kering beku pasca bedah pterigium didapatkan komplikasi yang minimal dan tidak didapatkan kegagalan maupun kekambuhan setelah satu bulan. Belum didapatkan laporan tentang penggunaan membran amnion kering beku untuk penanganan kasus lain yang memerlukan penggunaan membran amnion di

Departemen Ilmu Kesehatan Mata RSUD Dr. Soetomo. Hal ini diduga disebabkan masih adanya kontroversi mengenai kualitas membran amnion tersebut.<sup>12</sup>

Sabua penelitian menunjukkan bahwa membran amnion kering beku yang disterilisasi dengan sinar  $\gamma$  masih dapat merangsang reepitelisasi bahkan masih dapat mempertahankan karakteristik fisik, biologis dan morfologi membran amnion beku segar. Membran amnion kering beku dapat disimpan dan stabil dalam berbagai kondisi penyimpanan tanpa kehilangan fungsi klinisnya dan kandungan EGF-nya masih baik sehingga ada indikasi kegunaannya sebagai biomaterial dalam rekonstruksi permukaan okuli. Membran amnion segar maupun yang dipreservasi menunjukkan fungsi yang sama ketika ditran splantasikan.<sup>1,4,7,13,14,15,16</sup>

Berdasarkan uraian di atas, dibutuhkan suatu penelitian untuk mengetahui sejauh mana perubahan kualitas membran amnion setelah dipreservasi secara kering beku. *Growth factor* yang diukur adalah kadar EGF karena EGF merupakan salah satu *growth factor* yang sangat berperan dalam proses epitelisasi.<sup>6</sup>

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental *one group pretest - post test design* terhadap 13 sampel dari 16 membran amnion. Penelitian dilakukan di Pusat Biomaterial/Bank Jaringan dan Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Proses sterilisasi dilakukan di Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) Jakarta. Unit eksperimen penelitian adalah membran amnion yang didapat dari Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo dalam waktu kurang dari 24 jam. Dilakukan replikasi/pengulangan sebesar 15 unit eksperimen. Setiap masukan unit eksperimen akan dilakukan pemeriksaan ELISA secara duplo.

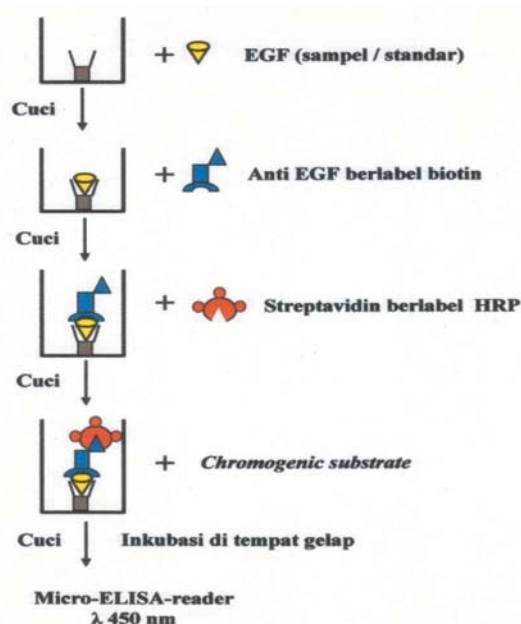
Membran amnion segar yaitu membran amnion yang telah dicuci dengan larutan normal salin dan antibiotik, kemudian disimpan pada suhu 4° C selama 24 jam. Membran amnion kering beku yaitu membran amnion yang telah dicuci dengan larutan normal salin dan antibiotik, kemudian disimpan pada suhu -80° C selama 24–36 jam. Selanjutnya dilakukan proses *freeze-drying* (*lyophilisation*) selama 8 jam dan terakhir disterilisasi dengan sinar  $\gamma$  pada dosis 25 kGy. EGF (*epidermal growth factor*) adalah salah satu *growth factor* yang berperan dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel. Kadar EGF membran amnion diukur menggunakan metode ELISA dalam satuan pg/g jaringan.

Membran amnion dibersihkan dari bekuan darah dan dicuci dengan larutan normal salin yang mengandung antibiotik sebanyak empat kali. Membran amnion bagian dalam dipisahkan dari korion secara tumpul. Membran amnion kemudian dibagi dua dan ditimbang berat basahnya serta diukur volumenya dengan alat timbangan yang sama. Kemudian satu bagian dimasukkan ke tabung berisi

larutan 400 ml normal salin yang telah diberi antibiotik dan disimpan pada suhu 4° C selama 24 jam. Satu bagian lagi untuk diolah dalam bentuk kering.

Membran amnion yang sudah ditimbang berat basahnya dan diukur volumenya dihindarkan pada tray steril lalu dimasukkan ke dalam *deep freezer* pada suhu -80° C selama 24 jam. Selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin *freeze dryer* selama 8 jam. Setelah proses *freeze-drying* selesai amnion dipindahkan ke *laminar air flow* untuk dilakukan pengepakan. Membran amnion yang dihasilkan selanjutnya disterilisasi dengan cara radiasi sinar  $\gamma$  pada dosis 25 Kgy.<sup>17</sup>

Membran amnion segar dikirim ke Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo dalam tabung steril yang mengandung BEM dengan *dry-ice*. Dilakukan proses *thawing* (pencairan) terlebih dahulu, kemudian membran amnion tersebut dikeringkan di kertas pengering, ditimbang beratnya dan diukur volumenya. Membran amnion kemudian dipotong kecil-kecil, lalu digerus dengan mortar sampai hancur. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse dan ditambahkan PBS pH 7,2 dengan EDTA ke dalamnya dengan volume yang sama. Larutan membran amnion tersebut dihancurkan lagi dengan *ultrasonic disintegrator* 30.000–80.000 Hertz selama 3 menit sebanyak 2–3 kali dengan interval 2 menit. Membran amnion diharapkan akan benar-benar hancur dan hal ini dibuktikan dengan pemeriksaan di bawah mikroskop. Kemudian dilanjutkan dengan ultrasentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan diambil dan ditambahkan PEG (*polyethylene glycol*) 6000 8% lalu disimpan pada suhu 4° C selama 24 jam. Kemudian dilakukan ultrasentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4° C. Endapan yang dihasilkan dilarutkan kembali ke



Gambar 1. Prinsip dasar ELISA *double antibody sandwich streptavidin biotin test*.<sup>20</sup>

dalam PBS hingga mencapai volume awal. Hasil ekstraksi ini kemudian dilakukan asai EGF.<sup>18,19</sup> Pemeriksaan asai EGF dilakukan dengan metode *double antibody sandwich streptavidin biotin test* (Gambar 1).

Pemeriksaan kadar EGF membran amnion menggunakan RayBio® *Human EGF ELISA Kit* dalam satuan pg/g jaringan yang mempunyai koefisien variasi intra-assay <10% dan inter assay <12%. Pada penelitian ini pemeriksaan terhadap sampel dilakukan secara duplo.

Persiapan reagen, sampel dan standar, dibiarkan pada suhu kamar sebelum digunakan. Standar dan sampel sebanyak 100 µl ditambahkan pada sumuran yang sudah dilapisi antibodi monoklonal terhadap EGF manusia, kemudian sumuran ditutup dan diinkubasi selama 2,5 jam pada suhu ruangan atau diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4° C. Sumuran dicuci 4 kali dengan larutan bufer pencuci, masing-masing 200 µl. Selanjutnya 100 µl antihuman EGF berlabel biotin ditambahkan pada sumuran dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Sumuran dicuci 4 kali dengan larutan bufer pencuci, masing-masing 200 µl. Ditambahkan 100 µl larutan *streptavidin* berlabel HRP pada sumuran dan diinkubasi pada suhu kamar selama 45 menit. Sumuran dicuci 5 kali dengan larutan bufer pencuci, masing-masing 200 µl. Kemudian 100 µl substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%) berkromogen TMB (*tetramethyl benzidine*) ditambahkan pada sumuran dan diinkubasi pada suhu kamar (gelap) selama 30 menit. Ditambahkan 50 µl 2M *sulfuric acid* pada sumuran. *Absorbance* dibaca dengan *micro ELISA reader* pada λ 450 nm. Penghitungan hasil dihitung rerata absorbensi untuk setiap standar, kontrol dan sampel, serta dikurangi rerata absorbensi standar nol. Rencanakan

kurva standar dengan menggunakan software pada *micro-ELISA-reader* dengan konsentrasi standar pada sumbu X dan absorbensi pada sumbu Y. Kadar EGF dibaca dengan menggunakan *micro-ELISA-reader* (Stat Fax 303 ).

Analisis data dilakukan menggunakan SPSS 11.0 dengan uji t 2 sampel berpasangan.

## HASIL

Hasil pengukuran kadar EGF membran amnion segar dan membran amnion kering beku dapat dilihat pada Tabel 1 Kadar EGF tertinggi pada membran amnion segar adalah 143,801 pg/g dan terendah adalah 108,954 pg/g dengan rerata 122,756 pg/g dan SD = 11,591 pg/g. Kadar EGF tertinggi pada membran amnion kering beku adalah 109,869 pg/g dan terendah adalah 71,625 pg/g dengan rerata 100,436 pg/g dan SD = 9,690 pg/g. Penurunan kadar EGF pada membran amnion kering beku dibanding membran amnion segar juga dapat dilihat pada tabel tersebut. Rerata persentase penurunannya adalah 17,50% dengan rentang penurunan antara 8,20–46,20%.

Estimasi persentase penurunan kadar EGF dengan confidence interval (CI) 95% adalah antara 11,04% sampai 23,96%. Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov diketahui bahwa kedua kelompok perlakuan menunjukkan tingkat signifikansi di atas 5% (P>0,05) yakni 0,423 untuk kelompok membran amnion segar dan 0,119 untuk kelompok membran amnion kering beku. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kedua kelompok tersebut berdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji t 2 sampel berpasangan

**Tabel 1.** Kadar EGF Membran Amnion

| Replikasi   | Kadar EGF<br>membran amnion (pg/g) |             | Penurunan Kadar EGF |       |
|-------------|------------------------------------|-------------|---------------------|-------|
|             | segar                              | kering beku | pg/g                | %     |
| 1           | 111,409                            | 102,278     | 9,131               | 8,20  |
| 2           | 111,609                            | 100,880     | 10,729              | 9,61  |
| 3           | 113,721                            | 102,667     | 11,054              | 9,72  |
| 4           | 112,845                            | 100,863     | 11,982              | 10,62 |
| 5           | 112,419                            | 101,011     | 11,408              | 10,15 |
| 6           | 124,238                            | 109,736     | 14,502              | 11,67 |
| 7           | 129,638                            | 102,016     | 27,622              | 21,31 |
| 8           | 137,685                            | 109,869     | 27,816              | 20,20 |
| 9           | 128,319                            | 103,908     | 24,411              | 19,02 |
| 10          | 133,125                            | 71,625      | 61,500              | 46,20 |
| 11          | 108,954                            | 93,407      | 15,547              | 14,27 |
| 12          | 128,070                            | 107,378     | 20,692              | 16,16 |
| 13          | 143,801                            | 100,032     | 43,769              | 30,44 |
| Rerata      | 122,756                            | 100,436     | 22,320              | 17,50 |
| SD          | 11,591                             | 9,690       | 15,353              | 10,69 |
| CI (95%)    |                                    |             |                     |       |
| batas bawah | 115,752                            | 94,580      | 13,042              | 11,04 |
| batas atas  | 129,761                            | 106,292     | 31,598              | 23,96 |
| Maks        | 143,801                            | 109,869     | 61,500              | 46,20 |
| Min         | 108,954                            | 71,625      | 9,131               | 8,20  |

didapatkan kadar EGF membran amnion segar dan membran amnion kering beku mempunyai perbedaan yang sangat signifikan ( $p = 0,000$ ). Rerata kadar EGF membran amnion segar yang diperoleh  $122,756 \pm 11,591$  pg/g, secara signifikan lebih tinggi dibandingkan rerata kadar EGF membran amnion kering beku.

## PEMBAHASAN

Aplikasi klinis membran amnion di bidang mata telah banyak dilaporkan, hal ini tidak terlepas dari komponen matrik ekstraseluler yang dimilikinya serta kandungan berbagai macam *growth factor* di dalamnya. *Growth factor* yang terdapat dalam membran amnion memberikan keuntungan klinis dengan mekanisme aksinya yaitu mampu merangsang epitelisasi, menghambat proses inflamasi, menghambat pembentukan jaringan parut, menghambat terjadinya angiogenesis dan juga sebagai agen antimikroba. Sifat-sifat unik tersebut menjadikan membran amnion sebagai biomaterial yang bermanfaat.

Sifat-sifat penting yang dimiliki membran amnion secara klinis tidak terlepas dari kandungan *growth factor* yang terdapat pada membran amnion. Koizumi et al., 2000 menemukan 8 *growth factor* dan 2 reseptor *growth factor* pada membran amnion. Tiga dari 10 jenis *growth factor* yang memainkan peranan penting dalam reepitelisasi yaitu EGF, KGF dan HGF. EGF menunjukkan suatu pengaruh perangsangan yang potensial dalam proliferasi dan diferensiasi sel epidermal. EGF juga menstimulasi proses proliferasi sel-sel epitel, hal tersebut menunjukkan bahwa EGF memainkan peranan penting dalam respon terhadap penyembuhan luka. EGF membutuhkan suatu reseptor untuk mengekspresikan peranannya (EGFR). Pada daerah kornea, EGF dan reseptornya ditemukan pada semua tipe sel utama. Hal tersebut menunjukkan bahwa EGF dapat mempengaruhi sel pada kornea.<sup>6</sup>

*Growth factor* merupakan sejenis protein. Sebagian besar molekul protein merupakan molekul yang mudah rusak bila tidak berada dalam kondisi fisiologisnya. Keadaan ini menjadikan proses preparasi sampel merupakan salah satu tahap yang sangat penting dalam menentukan keberhasilan suatu analisis.

Membran amnion yang merupakan sampel penelitian ini adalah suatu jaringan padat, untuk itu harus dihancurkan sedemikian rupa dengan menggunakan mortal dan *ultrasonic disintegrator*. Hasil yang diperoleh berupa homogenat yaitu larutan keruh yang terdiri dari debris sel, organel sel dan makromolekul penyusun sel di antaranya protein. Selanjutnya dilakukan ultrasentrifugasi yang nantinya akan mengendapkan debris sel dan organel sel di dasar tabung. Hal ini dapat dibuktikan dengan pemeriksaan endapan tersebut di bawah mikroskop. Makromolekul yang ukurannya jauh lebih kecil akan terlarut di dalam larutan buffer dan setelah disentrifus disebut supernatan. Supernatan inilah yang akan dipakai untuk analisa selanjutnya. Larutan PEG 6000, 8% ditambahkan ke dalam supernatan tadi

selama 24 jam sebagai *precipitating agent*. Molekul-molekul peptida akan cenderung berinteraksi dengan sesamanya sehingga akan dihasilkan endapan peptida. Endapan ini untuk kemudian dilakukan pemeriksaan uji ELISA. Metode ekstraksi membran amnion ini merupakan metode yang dilakukan oleh Effendi (2008).<sup>19</sup>

Uji ELISA dilakukan dengan metode *double antibody sandwich streptavidine biotin test*. Keuntungan metode ini adalah menggunakan dua antibodi berlabel biotin dan *streptavidin* berlabel HRP sebagai pelacaknya. Cara ini merupakan cara yang paling sensitif, sehingga sensitifitasnya dapat dipercaya. Metode ini menggunakan antibodi monoklonal terhadap EGF manusia, sehingga lebih spesifik.

Kadar EGF pada membran amnion segar dan kering beku pada penelitian ini lebih rendah bila dibandingkan dengan hasil yang dilakukan oleh peneliti lain. Hal ini dapat disebabkan berbedanya proses ekstraksi dan uji ELISA yang digunakan, namun demikian penting diketahui bahwa hasil penelitian ini membuktikan masih adanya kadar EGF pada membran amnion kering beku.

Penurunan kadar EGF pada penelitian ini dapat terjadi akibat beberapa tahapan proses yang terlibat selama pembuatan membran amnion kering beku. Beberapa kerusakan jaringan yang mungkin terjadi adalah pada saat pembekuan sampel, proses *freeze drying* dan radiasi.

Pembekuan membran amnion bertujuan untuk persiapan proses *freeze drying* dan untuk menurunkan sifat antigen jaringan. Pembekuan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  ini dapat menyebabkan *freezing injury* berupa terbentuknya kristal-kristal es kecil atau perubahan konsentrasi dan komposisi dari cairan dalam sel. Hal ini menyebabkan terganggunya proses difusi dan osmosis sel sehingga terjadi kerusakan sel. Selain itu, pembekuan juga menyebabkan stres protein yang mengakibatkan denaturasi protein. Semakin lama proses pembekuan berlangsung akan semakin bertambah kristal es yang terbentuk, sehingga merusakkan sel menjadi lebih berat dan lebih luas. Pada penelitian ini pembekuan membran amnion ini berlangsung 24–36 jam.<sup>17,20,21,22</sup>

Tahap selanjutnya adalah proses *freeze drying* yaitu pengeringan jaringan secara langsung dari fase es tanpa melalui fase cair dengan tujuan mencegah autolisis jaringan. Keuntungan dari pengeringan ini adalah membran amnion yang dihasilkan dapat disimpan pada suhu ruangan dan memudahkan proses sterilisasi. Adam, 2007 menyatakan bahwa perubahan suhu pada saat pengeringan beku diduga dapat menyebabkan kerusakan sampel. Rodriguez-Ares, dengan menggunakan mikroskop elektron tidak menemukan kerusakan pada membran amnion setelah dilakukan pengeringan beku.

Pengepakan dilakukan setelah proses *freeze drying* selesai. Pengepakan ini sebaiknya dilakukan dalam *laminar air flow* secepat mungkin secara vakum untuk mencegah oksidasi. Membran amnion kering beku yang disimpan dalam keadaan lembab akan mengalami biodegradasi. Pada penelitian ini proses *freeze drying* dilakukan pada pagi hari selama 8 jam dan pengepakan segera dilakukan

pada hari yang sama untuk mengurangi pengaruh oksidasi yang mungkin terjadi.<sup>14,17</sup>

Tahap terakhir dari pengolahan membran amnion kering beku adalah sterilisasi dengan radiasi. Interaksi radiasi dengan bahan terjadi melalui dua cara yaitu secara langsung akibat radiasi ionisasi itu sendiri dan cara tidak langsung melalui terbentuknya radikal bebas. Kolagen merupakan protein yang sangat sensitif terhadap radiasi yang berakibat penurunan kekuatan mekanik jaringan, menaikkan kelarutan dan resorpsi. Untuk mencegah efek radikal oksigen akibat radiasi, proses radiasi dilakukan pada suhu rendah, bebas air dan bebas oksigen (vakum). Membran amnion kering beku sebelum disterilisasi sudah dalam kondisi kering dan vakum di dalam kemasan plastik khusus, sehingga sterilisasinya dilakukan pada suhu kamar. Dosis radiasi yang diberikan pada sampel ini adalah 25 kGy yaitu dosis yang dianggap aman. Interaksi radiasi dengan sampel dapat saja terjadi, namun pada dosis tersebut tidak akan menyebabkan perubahan yang nyata pada sampel.<sup>8,23</sup>

Berdasarkan uraian di atas penurunan kadar EGF pada membran amnion kering beku terjadi akibat *freezing injury* saat pembekuan, *freeze drying*, saat pengepakan dan radiasi. Besarnya pengaruh faktor tersebut yang menyebabkan penurunan kadar EGF memerlukan penelitian lebih lanjut.

Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan Ahn et al (2006). Pada penelitiannya didapatkan kadar EGF membran amnion segar, *deep frozen* dan membran amnion kering beku berada pada nilai yang sama. Hal ini mungkin disebabkan karena proses preservasi membran amnion kering beku yang dilakukan berbeda.

Kelemahan pada penelitian ini adalah *pertama* pengukuran kadar EGF dilakukan sebelum dan sesudah proses pengolahan membran amnion, sedangkan proses pengolahan itu sendiri terdiri dari beberapa tahap. Hal ini menyebabkan tidak dapat diketahui saat terjadinya penurunan dan tahap yang paling mempengaruhi penurunan kadar EGF. *Kedua*, walaupun hasil penelitian didapatkan adanya kadar EGF pada membran amnion kering beku, namun masih belum dapat diketahui efektivitasnya dalam klinik. *Ketiga*, keterbatasan dana dan fasilitas untuk melakukan penelitian.

## KESIMPULAN

Kadar EGF membran amnion segar lebih tinggi dibandingkan kadar EGF membran amnion kering beku. Penurunan kadar EGF membran amnion kering beku adalah sebesar 11% hingga 24%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, et al. The Influence of Various Storage Conditions on Cell Viability in Amnion Membrane. *Cell Tissue Banking*. 2007; 8:1–8.
- Parolini, O., F. Alviano., G. P. Bagnara., et al. **Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells.** *STEMCELLS*. 2008; 26:300–311.
- Niknejad H, Habibollah P, Masoumeh J et al. **Properties of the Amniotic Membrane for Potential use in Tissue Engineering.** *European cell and materials*. 2008; Vol 15 :88–99.
- Agrawal, V. Amniotic membrane transplantation: an advance in ocular surface disease management. *Journal of the Bombay Ophthalmologist Association* 2000; 10 (3): 157–158.
- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. **Growth Factor: Importance in Wound Healing and Maintenance of Transparency of the Cornea.** *Progress in Retinal and Eye Research* 2000; 9:113–129.
- Koizumi N, Inatomi T, Sotozono Cet al. **Growth Factor mRNA and Protein in Preserved Human Amniotic Membrane.** *Current Eye Research* 2000; 20:173–177.
- Adds PJ, Charles JH, Jhon KGD. Amniotic Membrane grafts, fresh or frozen? A Clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:905–907.
- Hilmy N. Sterilisasi Radiasi Produk Biomaterial, In The 1<sup>st</sup> Indonesian Tissue Bank Scientific Meeting and Workshop on Biomaterial Application. Surabaya 200; pp 13–18.
- Dua HS, Gomes JAP, King AJ, et al. The amniotic membrane in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004; 49:51–77.
- Shiyu, Z., C. Jiaqi dan F. Jinfa. The effect of amniotic membrane on polymorphonuclear cells. *Chinese medical journal* 2003; 116 (5): 788–790.
- Gündüz K, Uçakhan ÖÖ, Kanpolat A, et al. **Nonpreserved Human Amniotic Membrane Transplantation for Conjunctival Reconstruction after Excision of Extensive Ocular Surface Neoplasia.** *Eye* 2006; 20:351–357.
- Pusat Biomaterial/Bank Jaringan Dr. Soetomo, 2007; Departemen Ilmu Kesehatan Mata RSUD Dr. Soetomo, 2008.
- Utomo AB. Evaluasi Hasil Transplantasi Membran Amnion Paska Bedah Pterigium, Laporan Penelitian. Departemen Ilmu Kesehatan Mata FK UNAIR/RSU Dr. Soetomo. Surabaya. 2002.
- Nakamura T, Makoto Y, Helen R. Sterilized, freeze dried aniotic membrane: a useful substrat for ocular surface reconstruction. *Invest ophthalmol* 2004; 45: 93–99.
- Ahn, KM., Lee, JH., Lee, UL., et al. **Development of biocompatible dressing material made of collagen and amniotic membrane and wound healing experiment in rat.** *J. Kor. Oral Maxillofac. Surg.* 2006; 32:189–199.
- Yan-hong, C, C. Hong-guang. **Amniotic membrane transplantation for porous sphere orbital implants exposure.** *Journal of Zhejiang University Science B*. 2007; 8(9): 616–619.
- Ferdiansyah. **Standard Produksi Biomaterial.** In The 1<sup>st</sup> Indonesian Tissue Bank Scientific Meeting and Workshop on Biomaterial Application. Surabaya 2001; pp 19–24.
- Phillips GO. **Multi-Media Distance Learning Package on Tissue Banking.** Module 5 : Processing. 1999; Pp 24–62.
- Effendi R. Perbedaan kadar epidermal growth factor (EGF) pada selaput amnion tanpa dan dengan cryopreservation. Laporan Penelitian. Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya 2008.
- Handojo, I. **Imunoasai dari Sitokin.** Handout Kuliah Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya 2005.
- Willemer HM. **Principle of freeze drying.** In *Advances in Tissue Banking Vol 1*, World scientific publishing, Singapore 1997; Pp 227–241.
- Pegg DE. **Principles of Cryopreservation.** In *Cryopreservaton and Freeze Drying Protocols* 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey : Humana Press Inc. 2007; pp 30–55.
- Dzeidzic-Goclawska A dan Stachowicz W. **Sterilisation of tissue allografts.** In *Advances in Tissue Banking Vol 1*, World scientific publishing, Singapore 1997; Pp 261–321.