

The Comparison of Active and Total Transforming Growth Factor- β 2 Concentration on Fresh and Cryopreservation Amnion Membrane

Dicky Hermawan, Rowena G. Hoesin, Gatut Suhendro

Department of Ophthalmology

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

ABSTRACT

The aim of this study is to find the difference of TGF- β 2 level in fresh amnion membrane and preserved amnion membrane using cryopreservation method. This study used one group pretest-posttest design and statistical analysis was performed using Wilcoxon Signed-Rank test if the samples had no normal distribution with level of significance of $\alpha = 0.05$. Eleven samples of amnion membrane were used to measure active TGF- β 2 level before and after preservation using cryopreservation method, and 13 samples of amnion membrane were used to measure total TGF- β 2 level before and after preservation using cryopreservation method. TGF- β 2 level in fresh amnion membrane was higher than that in amnion membrane preserved using cryopreservation method. There is no significant reduction of TGF- β 2 level in amnion membrane preserved using cryopreservation method.

Key words: TGF- β 2, fresh amniotic membrane, cryopreservation

Correspondence: Dicky Hermawan, c/q: Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Mata, Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo 6–8 Surabaya 60286.
E-Mail: dickyh4_4_74@yahoo.com

PENDAHULUAN

Membran amnion sudah digunakan secara sporadis untuk berbagai macam aplikasi klinis sejak tahun 1910. Di bidang oftalmologi, meningkatnya penggunaan transplantasi membran amnion dimulai sejak tahun 1995. Pada Instalasi Rawat Inap Mata di RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dari data bagian rekam medik, selama tahun 2007 tercatat 13 kasus dilakukan transplantasi membran amnion. Hal ini harus disertai dengan kewaspadaan akan adanya risiko penularan penyakit antara donor dan resipien. Berdasarkan pedoman yang dikeluarkan oleh *The North London Tissue Bank* pada tahun 1997 dan *amniotic membrane transplantation users group* pada tahun 1999, menyebutkan bahwa perlu dilakukan pemeriksaan serologi ulang terhadap donor 6 bulan setelah melahirkan, sebelum membran amnion tersebut digunakan untuk aplikasi klinis. Penerapan pedoman di atas akan memerlukan teknik pengawetan membran amnion yang tepat, sehingga membran amnion tersebut dapat bertahan sampai 6 bulan kemudian sebelum ditransplantasikan kepada resipien.¹

Membran amnion mengandung berbagai macam sitokin, salah satunya adalah faktor pertumbuhan yang berperan sebagai stimulator epitelisasi dan juga berperan pada proliferasi dan diferensiasi seluler. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) yang merupakan salah satu faktor pertumbuhan di dalam membran amnion berperan penting dalam mengatur proses pertumbuhan, diferensiasi, formasi matriks ekstraseluler dan sebagai imunosupresan. TGF- β lebih banyak berada pada lapisan *basement membrane* dan matriks stroma dari membran amnion. Peranan TGF- β 2 lebih menonjol dalam menghambat proliferasi yang dipromotori oleh *Keratinocyte Growth Factor* (KGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), dan *Epidermal Growth Factor* (EGF), sehingga TGF- β 2 dapat menjaga agar pertumbuhan dari jaringan epitel, parut, dan pembuluh darah tidak berlebihan.^{2,3}

Pemeliharaan integritas dari *basement membrane* dan matriks stroma dari membran amnion membuat metode penyimpanan/pengawetan yang digunakan berperan penting untuk mempertahankan struktur dan bahan yang

terkandung dalam membran amnion, termasuk *TGF-β2* yang dikandungnya. Berbagai metode telah digunakan untuk mengawetkan membran amnion termasuk di antaranya metode pengawetan segar (atau lebih tepat disebut metode pengawetan hipotermis), *cryopreservation* (pengawetan beku) dan *freeze-dried*.⁴

Pandangan praktisi saat ini, pada membran amnion yang diawetkan dengan metode *cryopreservation* akan kehilangan beberapa jaringannya disertai dengan penurunan fungsi/manfaatnya. Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan bahwa jaringan epitel tidak didapatkan baik pada membran amnion yang segar atau yang diawetkan dengan metode *cryopreservation*. Beberapa peneliti yang lain berpendapat hasil transplantasi membran amnion segar atau yang diawetkan dengan metode *cryopreservation* di bidang oftalmologi secara klinis tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.^{3,4}

Metode pengawetan dan penyimpanan membran amnion yang memungkinkan untuk mempertahankan integritas struktur dan bahan yang terkandung di dalamnya selama 6 bulan atau lebih, sangat dibutuhkan, untuk memberikan waktu agar pemeriksaan serologi pada donor dapat dilakukan 6 bulan kemudian setelah donor melahirkan.^{4,5}

Metode pengawetan *cryopreservation* pada membran amnion yang disimpan dalam 50-85% gliserol (sebagai medium *cryoprotectant*) dapat diandalkan dan efektif untuk menjaga integritas struktur dan bahan yang terkandung di dalamnya lebih dari satu tahun.^{6,7,8,9,10} *Basement membrane* dari membran amnion merupakan salah satu membran paling tebal yang ada pada jaringan manusia. Lapisan ini tahan terhadap teknik *cryopreservation*. Integritas struktur *basement membrane* amnion yang transparan dan elastis membuatnya sebagai jaringan yang dipakai secara luas untuk rekonstruksi permukaan bola mata. Berperan dalam migrasi, adhesi dan diferensiasi sel epitel, serta mendukung pertumbuhan dari sel induk epitel dengan memperpanjang usia kehidupan dan merawat *clonogenicity* sel tersebut.^{3,11}

Cryopreservation adalah suatu proses pengawetan dengan suhu sangat rendah (-80°C – -196°C) yang dapat digunakan untuk sel dan jaringan. Pada suhu yang sangat rendah, aktivitas biologi yang dapat menyebabkan kematian sel dapat dihentikan. Keberhasilan metode pengawetan *cryopreservation* dipengaruhi oleh pemilihan bahan *cryoprotectant*. Gliserol merupakan salah satu *cryoprotectant* yang telah digunakan sejak lama, dan berfungsi melindungi sel dari *freezing injury*.¹²

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *one group pretest-posttest design*. Uji *t* 2 sampel berpasangan digunakan untuk melihat adanya perbedaan antara 2 pengamatan sebelum dan sesudah perlakuan berupa metode *cryopreservation* pada suhu -80°C dalam gliserol 50% selama 1 bulan

terhadap membran amnion, bila sampel yang diperoleh berdistribusi normal. Uji *Wilcoxon signed-ranks test* digunakan bila sampel tidak berdistribusi normal. Unit eksperimen dalam penelitian ini adalah membran amnion yang ada di Pusat Biomaterial/Bank Jaringan, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dengan kriteria inklusi membran amnion yang diproses tanpa preservasi (membran amnion segar) dan kriteria eksklusi membran amnion segar yang lebih dari 24 jam. Tempat penelitian di Pusat Biomaterial Bank Jaringan dan Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga - RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Waktu penelitian mulai bulan Agustus 2008 sampai dengan bulan Desember 2008.

Penelitian ini menggunakan 13 membran amnion untuk melihat konsentrasi *TGF-β2* aktif dan total (jumlah replikasi minimal 11 membran amnion). Setiap 1 membran amnion dari satu donor akan dibagi menjadi 2 bagian, 1 bagian untuk membran amnion segar dan 1 bagian untuk diawetkan dengan metode *cryopreservation*. Membran amnion segar adalah membran amnion yang hanya dicuci dengan larutan salin dan antibiotika, selanjutnya direndam dalam *BEM* sebagai media transpor, disimpan dalam suhu 4°C dan dilakukan ekstraksi dalam waktu kurang dari 24 jam. Membran amnion dengan metode *cryopreservation* adalah membran amnion yang dicuci dengan salin dan antibiotika, selanjutnya direndam dalam gliserol 50% dan disimpan pada suhu -80°C selama 1 bulan. Sebelum diekstraksi membran amnion dihangatkan pada suhu 4°C , kemudian pada suhu kamar untuk proses pencairan, dan kemudian ditambahkan *BEM* sebagai media transpor. *TGF-β2* adalah suatu faktor pertumbuhan yang berperan dalam mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Kadar *TGF-β2* diukur dengan metode *ELISA* menggunakan *Human TGF-β2 ELISA Kit* buatan *Ray Biotech*, satuannya dinyatakan dalam pg/g jaringan. *TGF-β2* aktif adalah *TGF-β2* bebas (tidak berikatan dengan *LAP*) yang ada pada membran amnion. *TGF-β2* total adalah *TGF-β2* aktif ditambah dengan *TGF-β2* inaktif (yang berikatan dengan *LAP*) yang ada pada membran amnion. Pengukuran kadar *TGF-β2* total dilakukan dengan terlebih dahulu mengaktivasi *TGF-β2* inaktif sesuai dengan prosedur yang ada pada *Human TGF-β2 ELISA Kit* buatan *Ray Biotech*. Variabel bebas penelitian ini adalah kondisi membran amnion (segar dan *cryopreservation*) dan variabel tergantungan adalah konsentrasi *TGF-β2* aktif dan total.

HASIL

Pada gambar 1 dapat dilihat kadar *TGF-β2* pada membran amnion segar dan dengan *cryopreservation* (aktif dan total). Kadar *TGF-β2* aktif membran amnion segar didapatkan rerata 274 pg/g dengan *SD* = 264,9 pg/g. Kadar terendah 0 pg/g dan kadar tertinggi 734,6 pg/g. Kadar *TGF-β2* total membran amnion segar didapatkan rerata 600,8 pg/g dengan *SD* = 1124,1 pg/g. Kadar terendah 11,1

Tabel 1. Hasil uji t 2 sampel berpasangan

Kondisi Membran Amnion	Jumlah sampel	Kadar TGF - β 2 aktif membran amnion				Uji statistik
		Rerata	SD	Minimal	maksimal	
Segar	11	274	264,9	0	734,6	<i>Paired samples test (T test), one tail</i> p = 0,432
<i>Cryopreservation</i>	11	265,2	280,1	19	769,2	

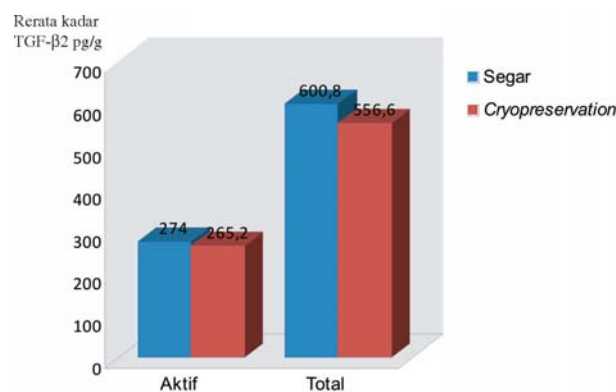
Keterangan: kedua kelompok berdistribusi normal. Uji *Kolmogorov-Smirnov* pada kelompok membran amnion segar, p = 0,866 (p > 0,05) dan kelompok membran amnion yang diawetkan dengan *cryopreservation* p = 0,436 (p > 0,05).

Tabel 2. Hasil uji *Wilcoxon signed-ranks test*

Kondisi Membran Amnion	Jumlah sampel	Kadar TGF - β 2 total membran amnion				Uji statistik
		Rerata	SD	Minimal	maksimal	
Segar	13	600,8	1124,1	11,1	3564,3	<i>Wilcoxon signed ranks test one tail</i> Z = -0,524 p = 0,300
<i>Cryopreservation</i>	13	556,6	1158,8	4,6	4235,6	

Keterangan: Uji *Kolmogorov-Smirnov* pada kelompok membran amnion segar, didapatkan distribusi tidak normal dengan p = 0,041 (p < 0,05) dan kelompok membran amnion yang diawetkan dengan *cryopreservation*, didapatkan distribusi normal dengan p = 0,147 (p > 0,05).

pg/g dan kadar tertinggi 3564,3 pg/g. Kadar TGF - β 2 aktif membran amnion yang diawetkan dengan *cryopreservation* didapatkan rerata 265,2 pg/g dengan SD = 280,1 pg/g, kadar terendah 19 pg/g dan kadar tertinggi 769,2 pg/g. Kadar TGF - β 2 total membran amnion yang diawetkan dengan *cryopreservation* didapatkan rerata 556,6 pg/g dengan SD = 1158,8 pg/g, kadar terendah 4,6 pg/g dan kadar tertinggi 4235,6 pg/g.

**Gambar 1.** Kadar TGF - β 2 membran amnion segar dan *cryopreservation* (aktif dan total)

Kadar TGF - β 2 aktif pada membran amnion segar dan yang diawetkan dengan *cryopreservation*, dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* mempunyai distribusi normal, sehingga dilakukan uji perbedaan kadar dengan uji t 2 sampel berpasangan.

Hasil uji t 2 sampel berpasangan menunjukkan bahwa kadar TGF - β 2 aktif pada membran amnion segar dan yang diawetkan dengan *cryopreservation*, mempunyai perbedaan yang tidak bermakna dengan p = 0,432 (p > 0,05).

Kadar TGF - β 2 total pada membran amnion segar dan yang diawetkan dengan metode *cryopreservation*, didapatkan distribusi yang tidak normal (uji *Kolmogorov-Smirnov*), sehingga dilakukan uji perbedaan kadar dengan uji *Wilcoxon signed-ranks test*.

Hasil uji *Wilcoxon signed-ranks test* menunjukkan bahwa kadar TGF - β 2 total pada membran amnion segar dan yang diawetkan dengan *cryopreservation* mempunyai perbedaan yang tidak bermakna dengan p = 0,300 (p > 0,05).

PEMBAHASAN

Sebaik apapun hasil suatu penelitian, tetapi jika reliabilitas dari metode yang digunakan tidak memadai atau penggunaannya tidak relevan, maka dari segi ilmiah hasil penelitian yang tampaknya baik tersebut tidak mempunyai nilai yang berarti. Berpijak pada landasan tersebut, maka sebelum membahas hasil penelitian ini, akan dibahas reliabilitas dan relevansi dari metode yang digunakan untuk mencapai tujuan penelitian ini.

Pemeriksaan kadar TGF - β 2 dalam penelitian ini memerlukan metode yang tepat untuk mendapatkan bahan yang dapat diukur dengan metode *ELISA*. Bahan yang didapat selanjutnya diukur kadar TGF - β 2-nya dengan menggunakan *Human TGF- β 2 ELISA kit*, maka dalam membahas atau menilai suatu metode pemeriksaan kadar TGF - β 2 ada beberapa unsur dari metode tersebut yang perlu dibahas. Berdasarkan hal tersebut, dibahas dua pokok bahasan, yaitu metode penelitian yang digunakan (meliputi reliabilitas metode ekstraksi, relevansi dari *growth factor* yang diuji, reliabilitas uji *ELISA* yang dipakai dalam

penelitian, dan relevansi sampel yang diuji dalam penelitian ini) dan hasil penelitian.

Reliabilitas metode ekstraksi membran amnion pada penelitian ini sesuai dengan metode ekstraksi yang dilakukan oleh Gunawan dkk. yang merupakan modifikasi metode ekstraksi yang dikerjakan oleh Zhang et al., Baharvand et al., dan Munadziroh.¹³ Membran amnion yang digunakan dikeringkan pada kertas pengering, kemudian ditimbang beratnya dan diukur volumenya. Ekstraksi dilakukan dengan terlebih dahulu memotong dan menggerus membran amnion dengan gunting dan mortar sebagai alat penghancur. Membran amnion yang sudah hancur ditambahkan *PBS* dan *EDTA* 2% yang berfungsi mencegah terjadinya penggumpalan, kemudian proses penghancuran dilanjutkan dengan alat *ultrasonic disintegrator*. Peptida yang terkandung di dalam membran amnion diperoleh dengan melakukan ultrasentrifugasi membran amnion yang telah dihancurkan di atas dan diambil supernatannya. Peptida yang terlarut di dalam supernatan tersebut diendapkan dengan bantuan *PEG*. Endapan yang didapatkan sebagai bahan ekstraksi dari membran amnion dilarutkan kembali dengan *PBS* sesuai dengan volume awal atau volume dengan kepekatan yang diinginkan. Ekstrak bahan amnion tersebut siap untuk dilakukan proses asai sitokin.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka reliabilitas dari ekstraksi peptida dari membran amnion yang dilakukan pada penelitian ini tidak perlu diragukan lagi.

Growth factor yang diuji dalam penelitian cukup relevan, mengingat pada penelitian yang pernah dikerjakan pada kornea kelinci, *TGF-β2* (salah satu sitokin di dalam membran amnion) mempunyai aktivitas yang cukup menonjol dalam menghambat proliferasi yang dipromotori oleh *KGF*, *HGF*, dan *EGF*, sehingga mempunyai peranan untuk menjaga pertumbuhan epitel, jaringan parut dan pembuluh darah supaya tidak berlebihan.²

Peran penting *TGF-β2* untuk proses penyembuhan dan rekonstruksi defek yang ada pada konjungtiva dan kornea menjadi dasar pemilihan faktor pertumbuhan yang kadarnya diukur dalam penelitian ini.

Penelitian ini menggunakan *Human TGF-β2 ELISA kit* untuk melakukan asai sitokin *TGF-β2*, dengan metode *double antibody sandwich streptavidine biotin test*. Metode ini merupakan teknik asai sitokin yang reliable dengan sensitivitas yang dapat diandalkan karena menggunakan dua antibodi serta streptavidine-biotin dalam pelabelan enzim yang berfungsi sebagai faktor amplifikasi (penguat reaksi) dan spesifisitas yang dapat diandalkan karena merupakan uji *ELISA* dengan antibodi monoklonal.

Pada penelitian ini menggunakan membran amnion dari Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo, sebagai sampel untuk dilakukan pengukuran kadar *TGF-β2* yang terkandung di dalamnya. Hal ini sesuai dengan kondisi di Departemen Ilmu Kesehatan Mata RSUD Dr. Soetomo, yang mengalami peningkatan dalam penggunaan membran amnion untuk penatalaksanaan defek yang ada pada konjungtiva dan kornea, di mana membran amnion

tersebut diambil dari Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo.

Berdasarkan hal di atas, hasil yang didapatkan dalam penelitian ini dapat merepresentasikan kadar *TGF-β2* pada membran amnion yang sering digunakan di Departemen Ilmu Kesehatan Mata RSUD Dr. Soetomo.

Pada penelitian ini, didapatkan kadar *TGF-β2* membran amnion segar aktif dan total. Rerata kadar *TGF-β2* membran amnion segar yang aktif adalah $274 \pm 264,9$ pg/g, dan total adalah $600,8 \pm 1.124,1$ pg/g. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian yang dikerjakan oleh Gomes (2005) dengan rerata kadar *TGF-β2* membran amnion segar yang aktif sebesar 351 ± 125 pg/ml dan total sebesar 897 ± 550 pg/ml, hal ini dapat disebabkan karena kemungkinan proses ekstraksi dan *ELISA* yang digunakan berbeda. Rerata kadar *TGF-β2* membran amnion segar yang aktif terlihat lebih rendah dari kadar *TGF-β2* membran amnion segar yang total, hal ini terjadi karena teraktivasi *TGF-β2 – LAP* oleh suasana asam (sesuai prosedur dari *Human TGF-β2 ELISA Kit* buatan *Ray Biotech*) menjadi *TGF-β2* aktif yang dapat diidentifikasi oleh *Human TGF-β2 ELISA Kit*. *TGF-β2 – LAP* dapat teraktivasi oleh stres seluler dan adanya perubahan kondisi fisiologis. Beberapa agen yang diketahui dapat mengaktivasi *TGF-β2 – LAP* adalah lingkungan mikro yang bersifat asam, plasmin, plasmin-like proteases dan $\alpha\beta6$ integrin. Rerata kadar aktif *TGF-β2* membran amnion yang diawetkan dengan metode *cryopreservation* adalah $265,2 \pm 280,1$ pg/g, dan total adalah $556,6 \pm 1158,8$ pg/g. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian yang dikerjakan oleh Gomes (2005) dengan rerata kadar *TGF-β2* aktif membran amnion yang diawetkan dengan metode *cryopreservation* sebesar 539 ± 248 pg/ml dan total sebesar 1177 ± 587 pg/ml.¹⁴ Perbedaan ini kemungkinan juga oleh proses ekstraksi dan *ELISA* yang dipergunakan berbeda.

Rerata konsentrasi *TGF-β2* antara membran amnion segar (aktif = $274 \pm 264,9$ pg/g; total = $600,8 \pm 1.124,1$ pg/g) lebih tinggi daripada membran amnion yang diawetkan dengan metode *cryopreservation* (aktif = $265,2 \pm 280,1$ pg/g; total = $556,6 \pm 1158,8$ pg/g). Hal ini disebabkan oleh terjadinya *freezing injury* pada membran amnion yang menyebabkan kerusakan sel melalui aksi mekanik secara langsung dengan terbentuknya kristal es yang disertai adanya perubahan konsentrasi cairan di dalam sel. Perubahan tersebut dapat mengganggu proses difusi dan osmosis dari sel yang berakhir dengan kerusakan sel. Perubahan suhu yang terjadi pada proses *cryopreservation* dan *thawing* (pencairan) juga dapat menyebabkan denaturasi protein, dalam hal ini menyebabkan kerusakan dari protein sitokin *TGF-β2*.

Pada penelitian ini, perbedaan kadar *TGF-β2* antara membran amnion segar dan yang diawetkan dengan metode *cryopreservation* secara statistik tidak bermakna. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya *TGF-β2 – LAP* pada lapisan *sponge* (sebagai *reservoir TGF-β*) dan matriks ekstraseluler membran amnion yang cukup banyak dan siap teraktivasi oleh kondisi tidak normal (proses *cryopreservation*) yang merupakan stres lingkungan bagi

membran amnion akibat proses perubahan suhu yang dialaminya. Kondisi tidak normal ini merubah *TGF- β 2 – LAP* menjadi *TGF- β 2* yang dapat diukur dengan metode *ELISA*. Hopkinson dalam penelitiannya menyampaikan bahwa *TGF- β* di dalam membran amnion didapatkan pada lapisan *sponge* (sebagai *reservoir TGF- β*), intraseluler dari sel epitel membran amnion, dan pada matriks ekstraseluler.¹⁵

Pada penelitian ini, kadar *TGF- β 2* total pada membran amnion segar dan yang diawetkan dengan *cryopreservation* (membran amnion segar = $600,8 \pm 1.124,1$ pg/g; dengan *cryopreservation* = $556,6 \pm 1158,8$ pg/g) lebih besar daripada kadar *TGF- β 2* aktif (membran amnion segar = $274 \pm 264,9$ pg/g; dengan *cryopreservation* = $265,2 \pm 280,1$ pg/g). Hal ini mungkin menjelaskan adanya cadangan *TGF- β 2 – LAP* dalam jumlah yang cukup banyak untuk dapat diaktivasi oleh kondisi tidak normal yang dihadapi oleh membran amnion, walaupun ada *TGF- β 2* dan *TGF- β 2 – LAP* (sebagai protein) yang mengalami kerusakan akibat dari proses *cryopreservation*, masih didapatkan cadangan *TGF- β 2 – LAP* yang cukup.

Kelemahan penelitian ini adalah terbatasnya waktu, dana, fasilitas penelitian, kemungkinan tidak terjaganya rantai dingin dari *Human TGF- β 2 ELISA Kit* saat pengiriman dari tempat produksi sampai digunakan untuk asai sitokin, dan tidak terjaganya peningkatan suhu saat melakukan penggerusan membran amnion dengan mortar pada saat proses ekstraksi. Hal ini mungkin yang menyebabkan simpangan baku (*SD*) hasil penelitian ini hampir 2 kali nilai reratanya (hasil yang diperoleh mempunyai variasi yang besar). Berdasarkan kelemahan penelitian ini, disarankan Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan dilakukan penelitian lebih lanjut dengan tujuan memperluas jumlah sampel membran amnion untuk mendapatkan kadar *TGF- β 2* yang lebih tepat dan melakukan penghitungan kadar *TGF- β 2* pada membran amnion dengan *cryopreservation* yang diawetkan dalam waktu yang lebih lama, menjaga rantai dingin dari *Human TGF- β 2 ELISA Kit* saat pengiriman dari tempat produksi sampai digunakan untuk asai sitokin, dan kerusakan sitokin/protein dalam proses ekstraksi dari membran amnion dihindari seoptimal mungkin dengan cara menyimpan terlebih dahulu mortar yang sudah disterilkan ke dalam lemari pendingin, saat penggerusan ditempatkan es di sekitar mortar dan waktu penggerusan dibatasi dengan cara melakukan selingan dengan proses pemotongan amnion dengan gunting yang lebih tidak memberikan efek peningkatan suhu.

KESIMPULAN

Tidak ada perbedaan bermakna kadar *TGF- β 2* (aktif maupun total) antara membran amnion segar dengan membran amnion yang diawetkan dengan metode *cryopreservation*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Royal College, 2008. Amniotic membrane transplantation in ophthalmology. Royal College of Ophthalmologists Guidelines. <http://www.mrcophth.com>. Accessed at March 16, 2008.
2. Imanishi J., Kamiyama K., Iguchi I., Kita M., Sotozono C., Kinoshita S. 2000. Growth factors: Importance in Wound Healing and Maintenance of Transparency of the Cornea. *Progress in retinal and eye research* 19; 113–129.
3. Virender S., Burman S., Tejwani S. Mahesh S.P., Murthy R.. 2007. Amniotic membrane transplantation: A review of current indications in the management of ophthalmic disorders. *Current Ophthalmology* 55; 251–260.
4. Addis PJ, Hunt CJ, Dart JK., 2001. Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* 85: 905–7.
5. Addis P.J., Hunt C., Hartley S., 2001. Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br. J. Ophthalmol* 85; 228–230.
6. Burgos H, Sergeant R.J., 1983. Lyophilised amniotic membranes used in reconstruction of the ear. *J R Soc Med* 76: 433.
7. Muralidharan S, Gu J, Laub GW, Cichon R, Daloisio C, McGrath LB., 1991. A new biological membrane for pericardial closure. *J Biomed Mater Res* 25: 1201–9.
8. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M., 1999. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns* 25: 625–35.
9. Martinez Pardo ME, Reyes Frias ML, Ramos Duron LE, Gutierrez Salgado E, Gomez JC, Marin MA, et al., 1999. Clinical application of amniotic membranes on a patient with epidermolysis bullosa. *Ann Transplant* 4: 68–73.
10. Kruse FE, Jousen AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J, et al., 2000. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 68–75.
11. Grueterich M, Tseng SC. 2002. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex-vivo. *Arch Ophthalmol*; 120: 783–90.
12. Tselutin K., Seigneurin F., Blesbois E., 1998. Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. *Poultry Science*; 78: 585–90.
13. Gunawan E., Suhendro G., Handojo I., 2008. Laporan Penelitian: Perbedaan Kadar *Epidermal Growth Factor (EGF)* Pada Selaput Amnion Tanpa Preservasi dan Dengan *Cryopreservation*. Departemen Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo; 26-7, 45.
14. Gomes J.A.P., 2001. Amniotic Membrane Growth Factors May Explain Healing. *Ophthalmology times*; 26; 7: 56.
15. Hopkinson A., McIntosh R.S., Tigbe P.J., James D.K., Dua H.S., 2006. Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction: Donor Variation and the Effect of Handling on *TGF- β* content. *Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS)*, 47; 10: 4316–22.