

INDONESIAN JOURNAL OF

# Clinical Pathology and Medical Laboratory

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 15	No. 1	Hal. 1-42	Surabaya November 2008	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	-----------	---------------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

*Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists*

Terakreditasi No: 43/DIKTI/Kep/2008, Tanggal 8 Juli 2008

INDONESIAN JOURNAL OF  
**CLINICAL PATHOLOGY AND  
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

---

**DAFTAR ISI**

**PENELITIAN**

- Gambaran Fungsi Hati dan Ginjal pada Penderita Malaria  
*(Liver and Kidney Functions of Malaria Patients)*  
**Darmawaty, Fitriani M, Ruland DN Pakasi, Hardjoeno** ..... **1-4**
- Anemia dan Defisiensi Besi pada Siswa SLTP Negeri I Curug, Tangerang  
*(Anemia and Iron Deficiency Among Female Adolescents from Junior High School (SLTP) Negeri I Curug, Tangerang)*  
**Fify Henrika, T. Silangit, Riadi Wirawan** ..... **5-11**
- Aktivitas SGOT, SGPT di Penderita Luka Bakar Sedang dan Berat  
*(SGOT, SGPT Activities an Medium and Severe Burn Injuries Patients)*  
**Sri Nurul Hidayah, Mutmainnah, H. Ibrahim Abd. Samad** ..... **12-15**
- Deteksi Molekuler *Mycobacterium Tuberculosis* di Dahak Cara Polymerase Chain Reaction  
*(Molecular Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Sputum with Polymerase Chain Reaction)*  
**BB. Notopuro, J. Nugraha, H. Notopuro** ..... **16-21**
- Pengaruh Pengawet Beku (*Cryopreservation*) terhadap Kadar *Epidermal Growth Factor* (EGF) pada Selaput Amnion  
*(The Effect of Cryopreservation to Epidermal Growth Factor (EGF) Level in Amnion Membrane)*  
**Ety Retno S, Gunawan Effendi, Gatut Suhendro, I. Handoyo** ..... **22-26**

**TELAAH PUSTAKA**

- Resistensi Vancomycin terhadap Enterococci  
*(The Problem of Vancomycin-Resistant Enterococci)*  
**Nurhayana Sennang AN** ..... **27-33**

**LAPORAN KASUS**

- Diagnosis Filariasis Berdasar Hapusan Darah Tepi  
*(Diagnosis of Filariasis Based on Thick Smear)*  
**H. I. Malewa, Prihatini** ..... **34-37**

**MANAJEMEN LABORATORIUM**

- Kegunaan Sistem Pengotomatan (Otomasi) Laboratorium/LAS (*Laboratory Automation Systems*)  
*(Usefulness LAS (Laboratory Automation Systems))*  
**Prihatini** ..... **38-42**

**INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU**

# PENGARUH PENGAWET BEKU (CRYOPRESERVATION) TERHADAP KADAR EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) PADA SELAPUT AMNION

*(The effect of Cryopreservation to Epidermal Growth Factor (EGF) Level in Amnion Membrane)*

Ety Retno S\*, Gunawan Effendi\*\*, Gatut Suhendro\*\*, I. Handoyo\*

---

## ABSTRACT

To measure the difference of EGF concentration in between fresh amniotic membranes and with cryopreservation in 16 amniotic membranes. Each amniotic membrane was divided into two parts. The first part was extracted in fresh forms and the second part underwent cryopreservation with glycerol 50% and was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  during 1 month before extraction. Both parts of the membrane were extracted using ultrasonic disintegrator and concentration of EGF was measured from the obtained extract using ELISA method. The average concentration of EGF in the fresh amniotic membrane was  $122.76 \pm 11.59$  pg/g while the average concentration of EGF in the amniotic membrane underwent cryopreservation was  $99.34 \pm 9.49$  pg/g. Average degradation of EGF concentration due to cryopreservation is  $18.49\% \pm 10.20\%$ . EGF concentration in fresh amniotic membrane is significantly higher than the EGF concentration in amniotic membrane underwent cryopreservation ( $p = 0.000$ ). Degradation of EGF concentration due to cryopreservation at 95% confidence interval is 12.33% to 24.66%.

**Key words:** epidermal growth factor - amniotic membrane - cryopreservation- ultrasonic disintegrator - ELISA

---

## PENDAHULUAN

Selaput amnion merupakan lapisan paling dalam dari plasenta, terdiri dari tiga lapisan: lapisan epitel, selaput basal yang tebal yang mengandung kolagen tipe IV, V, VII, fibronektin dan laminin, dan stroma yang tidak mengandung pembuluh darah. Selain itu selaput amnion juga mengandung berbagai macam faktor pertumbuhan, seperti *epidermal growth factor* (EGF), *keratinocyte growth factor* (KGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), dan *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ).<sup>1-7</sup>

Selaput amnion manusia telah banyak digunakan di bidang kedokteran, antara lain untuk menutup luka bakar, ulkus (menahun) kronis, luka terbuka atau pembalut pada beberapa kasus bedah plastik. Penggunaan selaput amnion di bidang kedokteran mata, antara lain: ulkus kornea, *bullous keratopathy*, penyusunan kembali (rekonstruksi) permukaan konjungtiva, *persistent epithelial defect*, dan operasi pterigium. Hal ini karena selaput amnion mampu untuk memudahkan adesi dan perpindahan (migrasi) sel epitelial basal, mencegah apoptosis, memperbaiki fenotip epitel, merangsang pembentukan epitel, mengurangi peradangan, mengurangi proses

angiogenesis dan parut (sikatrik) dan mempunyai efek antimikroba.<sup>1-11</sup>

Penggunaan selaput amnion pertama kali dikenalkan oleh Davis pada tahun 1910 dan Sabella pada tahun 1913 pada kasus pencangkokan kulit. Di bidang mata, pertama kali dikenalkan pada tahun 1940 oleh de Rötth, selaput fetus (korion dan amnion) digunakan untuk memperbaiki kerusakan (defek) konjungtiva pada penderita *simblefaron*. Pada tahun 1946, Sorsby dan Symmons melakukan pencangkokan selaput amnion yang telah diawetkan (preservasi) di kasus trauma kimia. Pada tahun 1990 Battle dan Palermo memperkenalkan kembali penggunaan selaput amnion di bidang mata, yang kemudian disusul oleh Kim dan Tseng pada tahun 1995.<sup>1-12</sup> Secara umum penggunaan selaput amnion berhubungan dengan faktor pertumbuhan di dalamnya. Faktor pertumbuhan tersebut mempunyai peran penting dalam proses penyembuhan luka pada permukaan okular, termasuk EGF.<sup>2</sup>

Selaput amnion diperoleh dari plasenta berasal dari proses persalinan seksio sesar penderita yang serologinya negatif untuk hepatitis B dan C, sifilis dan HIV. Selaput amnion dapat digunakan dengan pengawetan (preservasi) atau tanpa preservasi. Salah satu metode preservasi selaput amnion cara pengawet

---

\* Departemen Patologi Klinik FK-Unair-RSU Dr. Soetomo, Jl. Prof. Dr. Moestopo 6-8 Surabaya

\*\* Departemen Ilmu Kesehatan Mata FK-Unair-RSU Dr. Soetomo, Jl. Prof. Dr. Moestopo 6-8 Surabaya

beku (*cryopreservation*), yaitu selaput amnion dicuci dengan antibiotika dan disimpan dalam larutan gliserol atau *dimethyl sulfoxide* (DMSO), pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ .<sup>5,6,9,12</sup> Proses *cryopreservation* ini dapat menurunkan sel yang aktif, termasuk beberapa faktor pertumbuhan. Metode ini masih menyisakan sel yang dapat hidup terus (*viable*) sekitar 50%. Hal ini menyebabkan berkurangnya pengaruh selaput amnion terhadap proses penyembuhan luka.<sup>1,2,13-15</sup>

*Cryopreservation* didefinisikan sebagai pemeliharaan bahan biologi pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  atau di bawahnya.<sup>16-18</sup> Efek biologi dari pendinginan ini diakibatkan oleh pembekuan cairan sel. Teori *freezing injury* menggambarkan bahwa kerusakan sel dapat diakibatkan oleh terbentuknya kristal es dalam sel yang akan menyebabkan aksi mekanik secara langsung, atau akibat dari perubahan kepekatan (konsentrasi) dan penyusun (komposisi) dari cairan sel sehingga dapat menyebabkan gangguan pada proses difusi dan osmosis dari sel-sel. Dalam proses *cryopreservation* ini diperlukan bahan *cryoprotectant* untuk mencegah terjadinya pembekuan luka (*freeze injury*).<sup>15-21</sup>

*Cryoprotection* dilakukan dengan menggunakan larutan *cryoprotectant* yang akan meningkatkan konsentrasi jumlah (total) dari semua larutan dalam sistem, menurunkan jumlah terbentuknya kristal es. Bahan *cryoprotectant* harus dapat masuk ke dalam sel dan mempunyai sifat kemeracunan (toksisitas) yang rendah. Beberapa bahan tersebut adalah gliserol, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), *ethanediol*, dan *propanediol*.<sup>17-19,22</sup>

Berdasarkan uraian di atas, maka identifikasi masalah yang dihadapi adalah seberapa jauh pengaruh dari perubahan sel yang aktif sebagai akibat dari proses *cryopreservation* dalam hubungannya dengan kepentingan di bidang kedokteran. Khusus di bidang kesehatan mata di beberapa faktor yang memengaruhi penyembuhan luka. Berpijak pada landasan itu, maka diperlukan suatu rangkaian penelitian yang berkesinambungan untuk menyelidiki hubungan proses *cryopreservation* dengan faktor pertumbuhan pada selaput amnion. Penelitian ini merupakan salah satu rangkaian tersebut, yang akan menyelidiki kadar *epidermal growth factor* (EGF) akibat proses *cryopreservation* yang nantinya dapat lebih bermanfaat dalam penggunaannya.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kadar EGF dengan metode ELISA pada selaput amnion tanpa preservasi dan selaput amnion dengan *cryopreservation*.

## METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian cobaan (eksperimental) dengan rancangan *one group pretest –*

*posttest design*. Unit eksperimen penelitian ini adalah selaput amnion yang ada di Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dengan kriteria penerimaan yaitu, selaput amnion yang diproses tanpa preservasi dan dengan *cryopreservation* sesuai tata cara (prosedur) pada Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan patokan (kriteria) penolakan yaitu, selaput amnion tanpa preservasi yang lebih dari 24 jam. Dalam penelitian ini diambil replikasi sebesar 16.

Selaput amnion diambil dengan menggunakan peralatan (instrumen) dan teknik yang aseptik. Plasenta dibersihkan dari bekuan darah dengan salin yang berisi streptomisin  $50\ \mu\text{g/mL}$ , penisilin  $50\ \mu\text{g/mL}$ , neomisin  $100\ \mu\text{g/mL}$  dan ampoterisin B  $2,5\ \mu\text{g/mL}$ . Selaput amnion bagian dalam dipisahkan secara tumpul dari korion. Untuk mempersiapkan selaput amnion tanpa preservasi maka selaput amnion yang sudah dibersihkan selanjutnya direndam dalam *Basal Eagle Media* (BEM) sebagai *media transport*, disimpan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dan dilakukan pemisahan (ekstraksi) dalam waktu 24 jam. Untuk *cryopreservation*, selaput amnion yang sudah dibersihkan selanjutnya direndam gliserol 50%, kemudian dibekukan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  selama 1 bulan. Sebelum diekstraksi selaput dihangatkan pada suhu kamar untuk proses *thawing* (pencairan) kemudian ditambahkan BEM sebagai *media transport*. Selanjutnya masing-masing selaput amnion dilakukan proses ekstraksi untuk mendapatkan peptida. Kadar EGF dari ekstrak selaput amnion pada penelitian ini diuji (*assay*) dengan kit ELISA yang khusus (spesifik) untuk EGF manusia (*Ray Biotech Inc*).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan pada 16 selaput amnion yang telah memenuhi kriteria penerimaan. Tiga subyek penelitian tidak diikutsertakan dalam penelitian karena pada saat proses ekstraksi selaput amnion tanpa preservasi mengalami pengurangan volume akibat dari tumpahnya larutan ekstrak (lihat Tabel 1).

Kadar EGF pada kelompok selaput amnion tanpa preservasi didapatkan rerata =  $122,76\ \text{pg/g}$ ; SD =  $11,59\ \text{pg/g}$ . Pada kelompok selaput amnion dengan *cryopreservation* didapatkan rerata =  $99,34\ \text{pg/g}$ ; SD =  $9,49\ \text{pg/g}$ .

Berdasarkan hasil uji normalitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*, maka kedua kelompok perlakuan mempunyai sebaran (distribusi) yang normal ( $p > 0,05$ ), sehingga akan dilakukan uji perbedaan dengan Uji t 2 sampel berpasangan (lihat Tabel 2).

**Tabel 1.** Kadar EGF Selaput Amnion

Replikasi	Kadar EGF (pg/g)		Penurunan Kadar EGF	
	Tanpa Preservasi	Cryopreservation	pg/g	%
1	111,41	102,71	8,70	7,81
2	111,61	100,21	11,40	10,22
3	113,72	101,23	12,49	10,98
4	112,84	108,23	4,61	4,09
5	112,42	96,28	16,14	14,36
6	124,24	115,26	8,98	7,23
7	129,64	92,68	36,96	28,51
8	137,69	113,29	24,39	17,72
9	128,32	102,29	26,03	20,28
10	133,13	89,88	43,24	32,48
11	108,95	81,42	27,53	25,27
12	128,07	92,10	35,97	28,09
13	143,80	95,85	47,95	33,35
Rerata	122,76	99,34	23,42	18,49
SD	11,59	9,49	14,31	10,20
CI (95%)				
batas bawah				12,33
batas atas				24,66
Maks	143,80	115,26	47,95	33,35
Min	108,95	81,42	4,61	4,09

**Tabel 2.** Hasil uji t 2 sampel berpasangan

Perlakuan	Rerata (pg/g)	SD	Min	Max	Pair t Test
Tanpa Preservasi	122,76	11,59	108,95	143,80	t = 5,901
Cryopreservation	99,34	9,49	81,42	115,26	p = 0,000*

Ket: \* signifikasi pada  $\alpha = 0,05$

Hasil uji t 2 sampel berpasangan menunjukkan bahwa kadar EGF selaput amnion tanpa preservasi dan dengan *cryopreservation* mempunyai perbedaan yang bermakna ( $p = 0,000$ ). Kadar EGF selaput amnion tanpa preservasi lebih tinggi secara berarti (signifikan) ( $122,76 \pm 11,59$  pg/g) dibandingkan selaput amnion dengan *cryopreservation* ( $99,34 \pm 9,49$  pg/g).

Pada tabel 1 dapat dilihat persentase penurunan kadar EGF akibat dari proses *cryopreservation*. Rerata penurunannya adalah 18,49%; SD = 10,20%. Penurunan kadar tertinggi adalah 33,35% dan penurunan kadar terendah adalah 4,09%. Penilaian (estimasi) persentase penurunan kadar EGF akibat dari proses *cryopreservation* dengan *confidence interval* (CI) 95% adalah antara 12,33% sampai 24,66%.

Penelitian ini dilakukan pada 13 selaput amnion. Rerata kadar EGF pada selaput amnion tanpa preservasi adalah  $122,76 \pm 11,59$  pg/g. Kadar EGF tertinggi adalah 143,80 pg/g dan terendah adalah 108,95 pg/g. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Koizumi et al. (2000) yang mana diperoleh kadar EGF sebesar  $1,0 \pm 0,6$  pg/mg dan pada penelitian yang dilakukan oleh Gomes (2005), diperoleh kadar EGF sebesar  $12 \pm 3$  pg/ml. Hasil

yang berbeda ini mungkin disebabkan perbedaan dalam proses ekstraksi dan ELISA.<sup>23,24</sup>

Rerata kadar EGF selaput amnion dengan *cryopreservation* adalah  $99,34 \pm 9,49$  pg/g. Kadar EGF tertinggi adalah 115,26 pg/g dan terendah adalah 81,42 pg/g. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Gomes (2005) yang diperoleh kadar EGF sebesar  $7 \pm 8$  pg/ml. Hasil yang berbeda ini dapat disebabkan adanya perbedaan dalam perlakuan terhadap sampel penelitian maupun dalam proses ekstraksi dan ELISA. Walaupun demikian terdapat kesamaan terhadap kecenderungan penurunan kadar EGF pada selaput amnion dengan *cryopreservation*.<sup>24</sup>

Kadar EGF selaput amnion tanpa preservasi lebih tinggi secara signifikan ( $122,76 \pm 11,59$  pg/g) dibandingkan kadar EGF selaput amnion dengan *cryopreservation* ( $99,34 \pm 9,49$  pg/g) ( $p = 0,000$ ).

Kadar EGF yang lebih rendah pada selaput amnion dengan *cryopreservation* ini disebabkan oleh terjadinya *freezing injury* pada selaput amnion tersebut. Kerusakan sel akibat *freezing injury* terjadi melalui aksi mekanik secara langsung akibat dari terbentuknya kristal es dalam sel, atau akibat dari perubahan kepekatan (konsentrasi) dan susunan

(komposisi) dari cairan sel, sehingga menyebabkan gangguan pada proses difusi dan osmosis dari sel tersebut. Akibat lain akan terjadi stres protein terhadap perubahan suhu, hal ini akan menyebabkan terjadinya denaturasi protein akibat suhu dingin, termasuk EGF. *Cryoprotectant* seperti gliserol, dapat mengurangi terbentuknya kristal es dan membuat keseimbangan osmosis cairan di dalam dan di luar sel akibat pendinginan.<sup>18–21,25</sup>

Penurunan kadar EGF pada penelitian ini merupakan selisih antara kadar EGF selaput amnion tanpa preservasi dan kadar EGF selaput amnion dengan *cryopreservation*. Rerata penurunannya adalah 18,49% ± 10,20%. Penurunan kadar tertinggi adalah 33,35% dan penurunan kadar terendah adalah 4,09%. Penilaian (Estimasi) persentase penurunan kadar EGF akibat proses *cryopreservation* dengan *confidence interval* (CI) 95% adalah antara 12,33% sampai 24,66%. Berpijak pada hasil perhitungan di atas maka pada 95% *confidence interval* terdapat penurunan kadar EGF akibat dari proses *cryopreservation* sebesar 12,33% sampai 24,66%.

Kadar EGF selaput amnion tanpa preservasi yang lebih tinggi daripada kadar EGF selaput amnion dengan *cryopreservation*, seperti yang ditunjukkan dalam penelitian ini dapat menjadi bahan pertimbangan terhadap pemakaian selaput amnion untuk penatalaksanaan beberapa penyakit di bidang Ilmu Kesehatan Mata, walaupun akan lebih sempurna jika dilakukan dengan penelitian secara klinis.

## SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil telitian tentang perbedaan kadar EGF antara selaput amnion tanpa preservasi dan selaput amnion dengan *cryopreservation*, dapat ditarik simpulan bahwa: rerata kadar EGF pada selaput amnion tanpa pengawetan (preservasi) adalah 122,76 ± 11,59 pg/g, rerata kadar EGF selaput amnion dengan *cryopreservation* adalah 99,34 ± 9,49 pg/g, terdapat perbedaan kadar EGF antara selaput amnion tanpa preservasi dengan selaput amnion dengan *cryopreservation*, dan menunjukkan bahwa kadar EGF selaput amnion tanpa preservasi lebih tinggi daripada kadar EGF selaput amnion dengan *cryopreservation*, rerata penurunan kadar EGF setelah proses *cryopreservation* adalah 18,49% ± 10,20%.

Berdasarkan hasil telitian ini disarankan melakukan penelitian untuk: mengetahui secara pasti waktu kadar EGF pada proses *cryopreservation* mulai menurun secara bermakna, mengetahui tepat guna ke-(efektif)-an dari penggunaan selaput amnion tanpa preservasi dan selaput amnion dengan *cryopreservation*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J ophthalmol* 1999; 83: 748–52.
2. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan S. The Amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004; 49: 51–77.
3. Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR, Sadeq N, Romero TR, Samson CM, Nguyen QD, Harper SL, Primack JD, Azar DT, Gruterich M, Dohlman CH, Baltaizis S, Foster S. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 659–63.
4. Sippel KC, Ma JJK, Foster CS. Amniotic membrane surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 269–281.
5. Gray TB, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation. In *corneal transplantation*. New Delhi: Jaypee; 2002. p. 252–261.
6. Souza CEB, Engel D, Lima ALH, Freitas D, Gomes JAP, Souza LB. Evaluation of microbiological contamination of amniotic membrane and amniotic fluid. *Arq Bras Oftalmol* 2004; 67(5): 709–12.
7. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005. 24: 643–53.
8. Mejia LF, Acosta C, Santamaria JP. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 2000; 19(3): 288–91.
9. Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Bioscience Reports* 2001; 21: 481–9.
10. Tseng SCG, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. In (Edward JH, Mark JM, eds) *Ocular Surface Disease: Medical and Surgical Management*. New York: Springer-Verlag; 2002. p. 226–31.
11. John T, Allen S, John AG. Staphylococcus epidermidis adherence to human amniotic membrane and to human, rabbit, and cat conjunctiva. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1211–8.
12. Prabhasawat P, Kosrirkvongs P, Booranapong W, Vajaradul Y. Application of preserved human amniotic membrane for corneal surface reconstruction. *Cell and Tissue Banking* 2000; 1: 213–22.
13. Gündüz K, Uçakhan ÖÖ, Kanpolat A, Gunalp I. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction after excision of extensive ocular surface neoplasia. *Eye* 2006; 20: 351–7.
14. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amnion membrane. *Cell Tissue Banking* 2007; 8: 1–8.
15. Rama P, Giannini R, Bruni A, Gatto C, Tiso R, Ponzin D. Further evaluation of amniotic membrane banking for transplantation in ocular surface diseases. *Cell and Tissue Banking* 2001; 2: 155–63.
16. Baust JG. Concepts in biopreservation. In *advances in biopreservation*. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 1–6.
17. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In *cryopreservation and freeze-drying protocols* 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey: Humana Press Inc; 2007. p. 39–55.
18. St rong DM. Cryopreservation of cells and tissues. In a companion volume to the IAEA curriculum on radiation and tissue banking. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 2000. p. 103–13.
19. Meryman HT. Surgical reconstruction by allograft: Cryopreservation of tissues and organs. In *advances in tissue banking vol. 2*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 1998. p. 149–56.
20. Pegg DE. Principles of Cryopreservation. In *advances in tissue banking vol. 1*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 1997. p. 215–24.

21. Taylor MJ. **Biology of cell survival in the cold: The basis for biopreservation of tissues and organs.** In *advances in biopreservation*. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 40–4.
22. Panakova E, Koller J. **Utilisation of foetal membranes in the treatment of burns and other skin defects.** In *advances in tissue banking vol. 1*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 1997. p. 165–74.
23. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood NJ, Quantock, Kinoshita S. **Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane.** *Current Eye Research* 2000; 20: 173–7.
24. Gomes JAP, Romano A, Santos MS, Dua HS. **Amniotic membrane use in ophthalmology.** *Curr Opin Ophthalmology* 2005; 16: 233–40.
25. Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K, Tou L, Sinn B, Baumann J, Volcker HE. **Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238: 68–75.