PERBANDINGAN ANTARA PEMBERIAN ASAM FOLAT, EKSTRAK GINKGO BILOBA, DAN METHYL COBALAMIN TERHADAP INDEKS APOPTOSIS DAN EKSPRESI CASPASE 3 PADA INTOKSIKASI METANOL SEL GANGLION RETINA

THE COMPARISON BETWEEN FOLIC ACID, EXTRACT GINKGO BILOBA, AND METHYL COBALAMIN TO APOPTOTIC INDEX AND CASPASE 3 EXPRESSION ON RETINAL GANGLION CELL INDUCED BY METHANOL INTOXICATION

Seskoati Prayitnaningsih*, Sumarno**

* Laboratorium Ilmu Penyakit Mata Fakultas Kedokteran Unibraw / RSU dr. Saiful Anwar Malang

** Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unibraw Malang

ABSTRACT

Permanent visual damage caused by methanol intoxication has been associated with prolonged exposures to blood formate concentrations. Formate accumulation disrupt mitochondrial energy production, which subsequently lead to caspase 9, 3 activation and finally causes apoptosis. Folic acid (FA) has been used as adjunctive therapy to enhance the rate of formate metabolism. Extract Ginkgo biloba (EGb) the most popular herbal therapy possess is antioxidant and antiapoptotic capacity. On the other hand, Methyl cobalamin, a kind of endogenous co enzyme B 12 can promote nucleic acid and protein synthesis. To compare the effect of FA, (EGb), and Methyl Cobalamin (MC) to Apoptotic Index (AI) and Caspase 3 expression of retinal ganglion cell induced by methanol intoxication (MI). Experimental study was conducted in Pharmacology and Biomedic laboratory of Brawijaya University for two weeks. Fifteen rats were included, and divided into five groups: (a) control, (b) Methanol Intoxication only, (c) Folic Acid 1 mg day per os, (d) Extract Ginkgo biloba 50 mg/kg per os, and (e) Methyl Cobalamin 500 microgram/kg intraperitoneally for three days. MI were done by giving methanol 4 g/kg in the first day, and 2 g/kg for two days after. Apoptotic Index and Caspase 3 expression were assessed by immunohistochemistry. The ANOVA test was used for statistical comparison. In AI evaluation, we found that IM group has a difference compared with AF ($p=0.030$), EGb ($p=0.080$), and MC group ($p=0.208$). On the other hand, there were a decreasing of caspase 3 expression in FA ($p=0.005$), EGb ($p=0.008$), and MC group ($p=0.151$) compared with MI group. Folic Acid give the greatest decrease on apoptotic index and caspase 3 expression. Extract ginkgo biloba can also decrease the apoptotic index and significant in caspase 3 expression. Methyl Cobalamin has no effect for both variables.

Keywords: Folic Acid, Extract ginkgo biloba, Methyl Cobalamin, Apoptotic index, Methyl Cobalamin

PENDAHULUAN

Metanol diketahui sebagai *human visual neurotoxin*. Bentuk awal keracunan metanol adalah depresi susunan saraf pusat yang transien, diikuti periode laten yang asimtomatik selama 12 – 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan terbentuknya asam format, asidosis metabolik yang tak terkompensasi, demyelinisasi nervus optikus, gangguan penglihatan, koma, dan kematian (1,2,3,4,5)

Asam format adalah metabolit toksik penyebab terjadinya asidosis metabolik dan toksisitas visual. Kerusakan visual permanen berhubungan dengan paparan yang lama (biasanya lebih dari 24 jam) dengan konsentrasi asam format di darah lebih dari 7 mM (1,2,3,4,5).

Apoptosis adalah proses selektif untuk meregulasi kematian sel, yang secara garis besar terjadi melalui dua jalur utama yaitu jalur ekstrinsik (*death receptor pathway*)

dan intrinsik (*mitochondrial/ stress pathway*) (6). Pada jalur intrinsik, keterlibatan mitokondria meliputi pelepasan aktivator caspase (seperti Sitokrom C), perubahan transport elektron, hilangnya potensial transmembran mitokondrial, terganggunya oksidasi – reduksi seluler dan terlibatnya substansi pro - apoptosis dan antiapoptosis misalnya Bcl – 2 (6,7,8).

Pada pemeriksaan histopatologi sel ganglion retina (SGR) yang diintoksikasi metanol didapatkan pembengkakan mitokondria dan pecahnya segmen dalam sel-sel fotoreseptor. Hal ini yang menyebabkan terlepasnya Sitokrom C dan aktivasi caspase 2 dan 9, serta caspase 3, dan selanjutnya caspase memberikan kontribusinya pada kematian sel melalui proses degradasi dari enzim-enzim yang memperbaiki DNA dan elemen-elemen struktural dari sel (5,6,7,8,9,10).

Prinsip penatalaksanaan intoksikasi metanol adalah menurunkan konsentrasi asam format. Pemberian etanol sebagai substrat kompetitor asam format harus segera diberikan, tetapi kenyataannya pemberian etanol tidak rutin

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXI, No.2, Agustus 2005
Korespondensi: Seskoati Prayitnaningsih; Lab. Ilmu Penyakit
Mata FK Unibraw / RSU dr. Saiful Anwar Malang

diberikan. Pemilihan terapi yang lain adalah pemberian Asam Folat (AF), yang akan meningkatkan metabolisme asam format sehingga kadar asam format di dalam darah turun. Dewasa ini Ekstrak Ginkgo biloba (EGb) dipakai secara luas, beberapa penelitian menyebutkan fungsinya sebagai antioksidan dan anti apoptosis. Sedangkan Methyl-Cobalamin (MC) meningkatkan asam nukleat dan sintesis protein, juga meningkatkan transport dan regenerasi aksonal, myelinisasi, serta memperbaiki transmisi sinaptik yang lambat, dan memperbaiki neurotransmitter ke nilai normal (11,12,13,14,15).

Studi sebelumnya oleh Marina T. Seme *et al* (2001) pada tikus yang diintoksikasi metanol menemukan perubahan metabolit energi retina, berupa peningkatan konsentrasi Glutation (GSH), dan perubahan histologi SGR yang terjadi berupa pembengkakan mitokondria (5). Shahriari (2005) melihat efek pemberian AF dan MC terhadap gelombang b ERG pada retina kelinci yang diintoksikasi methanol (16). Sedangkan Tezel Gulgun *et al* (2004) meneliti tentang apoptosis dan aktivitas caspase 3 pada SGR yang mendapatkan paparan TNF- α dan hipoksia selama 48 jam (6).

Berdasarkan penjelasan di atas tampak bahwa belum pernah dilakukan penelitian perbandingan indeks apoptosis (IA) dan ekspresi caspase 3 antara SGR yang diintoksikasi methanol, dan yang mendapat terapi AF, EGb, dan MC. Belum pernah juga dilakukan studi terhadap efek EGb pada intoksikasi metanol SGR.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan IA dan ekspresi Caspase 3 antara kelompok intoksikasi metanol dengan pemberian AF, EGb, dan MC pada SGR yang diinduksi dengan intoksikasi methanol, diduga pemberian Asam Folat, Ekstrak Ginkgo biloba, dan Methyl Cobalamin menurunkan ekspresi caspase 3 dan Indeks Apoptosis.

METODE

Penelitian ini adalah suatu studi pendahuluan yang bersifat eksperimental murni. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 14 hari, Maret 2005.

Subyek penelitian yang digunakan adalah tikus *Ratus Novergicus Strain Wistar*, jantan, umur $\pm$ 8 - 12 bulan, berat 250 – 350 gram, sehat. Tikus akan dieksklusi bila mati selama masa eksperimen. Seluruh hewan coba

mendapatkan makan dan minum *ad libitum*, dan dipertahankan dalam penerangan serta lingkungan dengan temperatur dan kelembaban yang terkontrol.

Dalam studi pendahuluan ini digunakan 3 hewan coba untuk setiap kelompok perlakuan. Yaitu sebagai hewan coba (1) kontrol, (2) intoksikasi methanol (IM) saja, (3) IM dan AF 1 mg peroral selama 3 hari, (4) IM dan EGb (50 mg/ kg) peroral selama 3 hari (5) IM dan MC 500 microgram / kg intraperitoneal (15,16,17).

Untuk terjadinya disfungsi penglihatan, maka konsentrasi asam format dipertahankan 7 – 10 mM. Hal ini dicapai dengan memberikan metanol 25% wt / vol dalam saline, dengan dosis 4 gram / kg intraperitoneal, diikuti dengan 2 gram/kg dosis tambahan pada jam ke-24 dan 48 (5). Kemudian pada kelompok 3,4,5, dilanjutkan dengan pemberian AF, EGb peroral melalui sonde dan MC intraperitoneal selama 3 hari, 24 jam kemudian tikus dibunuh dan dilakukan enukleasi.

Setelah dilakukan enukleasi, bola mata dimasukkan dalam larutan formalin 10% untuk kemudian dilakukan pembuatan blok paraffin. Setelah dilakukan pemotongan 4 mikron dilakukan pulasan imunohistokimia.

Pengecatan imunohistokimia diskoring secara semi kuantitatif per "high power field" 1000 x (100 x obyektif, 10 x okuler). Pemeriksaan apoptosis dengan menggunakan ApopTag® In Situ Apoptosis Detection Kit dari Invitrogen. Pengecatan Caspase 3 menggunakan *Link 2nd antibody polimer labelled SAHRP (Dako – USA)*.

Sel Apoptosis adalah sel yang ditandai adanya pengerutan sel, kondensasi dan fragmentasi nukleus menjadi badan kromatin multipel, dimana masing-masing dikelilingi oleh amplop nuklear, adanya *membrane blebbing* dengan fagositosis fragmen oleh sel-sel di sekelilingnya sehingga tampak nukleus yang gelap (18).

Indeks Apoptosis (IA) adalah jumlah sel apoptosis dalam 1000x pembesaran pada 10 lapang pandang. Sedang Ekspresi Caspase 3 adalah jumlah sel yang memberikan hasil pengecatan sitoplasma positif (18).

Variabel bebas adalah pemberian Metanol, Asam folat, EGb, dan Methyl Cobalamin. Sedangkan Variabel tergantungnya adalah IA dan ekspresi caspase 3

Analisis statistik menggunakan program software SPSS versi 11.5. Perbandingan dari 5 kelompok yang berbeda menggunakan tes ANOVA, dengan nilai $p < 0.05$ dianggap bermakna.

HASIL PENELITIAN**Perbandingan Indeks Apoptosis pada kelima kelompok perlakuan****Tabel 1. Perbandingan Indeks Apoptosis pada kelima kelompok perlakuan**

Perlakuan	Kontrol X 1 $\pm$ SD	IM X 2 $\pm$ SD	AF X 3 $\pm$ SD	Egb X 4 $\pm$ SD	MC X 5 $\pm$ SD
Indeks Apoptosis	1,6667 $\pm$ 0,5776	10,000 $\pm$ 2,0000	4,3333 $\pm$ 1,5275	5,3333 $\pm$ 1,5275	13,6667 $\pm$ 3,0551
<i>p</i> value terhadap grup IM	0.002	-	0.030	0.080	0.208

Gambar 1 . Box plot dari Perbandingan Indeks Apoptosis antara kelima kelompok perlakuan.

Tampak peningkatan indeks apoptosis yang bermakna pada kelompok yang diintoksikasi methanol saja, dan penurunan yang bermakna pada kelompok yang mendapatkan Asam folat dan Extract ginkgo biloba. Pemberian Methyl cobalamin tampaknya tidak dapat menurunkan indeks apoptosis.

Pada studi ini didapatkan bahwa kelimabelas tikus yang memenuhi kriteria inklusi, tidak ada yang mati selama masa eksperimen. Tabel 1 menunjukkan IA terendah adalah pada kelompok kontrol (1,67), dan tampak peningkatan pada kelompok IM (10), dan peningkatan IA tertinggi pada kelompok MC (13,67)

Dari Tabel 1 ini juga didapatkan bahwa kelompok kontrol mempunyai perbedaan bermakna dengan kelompok

IM ($p=0,002$) dan kelompok MC ($p=0,000$), namun sebaliknya tidak didapatkan perbedaan bermakna dengan kelompok AF ($p=0,472$) dan EGb ($p=0,208$). Kelompok IM juga mempunyai perbedaan bermakna dengan kelompok AF ($p=0,030$). Sedangkan kelompok MC tidak memberikan perbedaan bermakna hanya dengan kelompok IM ($p = 0,20$).

Perbandingan Ekspresi Caspase 3**Tabel 2. Perbandingan Ekspresi Caspase 3 Pada Kelima Kelompok Perlakuan**

Perlakuan	Kontrol X 1 $\pm$ SD N = 3	IM X 2 $\pm$ SD N = 3	AF X 3 $\pm$ SD N = 3	Egb X 4 $\pm$ SD N = 3	MC X 5 $\pm$ SD N = 3
Ekspresi Caspase 3	8,333 $\pm$ 1,1547	22,667 $\pm$ 3,7859	10,000 $\pm$ 3,000	11,000 $\pm$ 2,6458	16,000 $\pm$ 4,3589
<i>p</i> value terhadap grup IM	0.002	-	0.005	0.008	0.151

Gambar 2. Box plot dari Perbandingan Ekspresi Caspase 3 Antara Kelima Kelompok Perlakuan.

Tampak penurunan ekspresi Caspase 3 yang bermakna pada kelompok Asam folat, Ekstrak Ginkgo Biloba, dan penurunan yang tidak bermakna pada kelompok Methylcobalamin dibandingkan kelompok yang tidak mendapat terapi setelah intoksikasi methanol.

Tabel 2 menunjukkan bahwa peningkatan bermakna ekspresi caspase 3 dibanding kelompok kontrol hanya pada kelompok IM ($p=0,002$). Sedangkan penurunan bermakna terhadap kelompok IM didapatkan pada kelompok AF ($p=0,005$) dan kelompok EGb ($p=0,008$), sebaliknya pada kelompok MC tidak didapatkan penurunan yang bermakna ($p=0,151$).

DISKUSI

Tabel 1 menunjukkan IA terendah pada kelompok kontrol (1,67), dan tampak peningkatan pada kelompok IM (10), dan IA tertinggi pada kelompok MC (13,67).

Peningkatan IA pada kelompok IM terjadi karena di dalam tubuh, metanol dioksidasi menjadi formaldehid oleh alkohol dehidrogenase dan segera dipecah menjadi asam format. Sel muller retina dan oligodendroglia nervus optikus sangat peka terhadap asam format (2,3,4,16).

Asam format menyebabkan toksisitas hipoksia melalui inhibisi Sitokrom-oksidadase. Pada pemeriksaan histopatologi didapatkan edema retina, vakuolisasi fotoreseptor dan epitel pigmen retina, pembengkakan dan rusaknya mitokondria pada segmen dalam fotoreseptor, nervus optikus, dan epitel pigmen retina (16).

Terbukanya membran luar mitokondria menyebabkan pelepasan aktivator caspase (seperti Sitokrom C), perubahan transport elektron, hilangnya potensial transmembran mitokondrial, terganggunya oksidasi – reduksi seluler dan terlibatnya pro dan antiapoptosis Bcl – 2. Sitokrom C, suatu protein kunci pada transport elektron dilepaskan dari mitokondria sebagai respon dari signal-signal apoptosis (jalur intrinsik) (18).

Studi ini juga mendapatkan bahwa intoksikasi metanol dapat meningkatkan apoptosis secara bermakna dibanding kelompok kontrol ($p = 0,002$). Sedangkan pemberian AF maupun EGb memberikan penurunan IA

hingga tidak didapatkan perbedaan bermakna dibanding kelompok kontrol, bahkan kelompok AF memberikan perbedaan bermakna dengan kelompok IM. Sayangnya pada kelompok MC tidak didapatkan perbedaan bermakna dengan kelompok IM. Dari ketiga kelompok terapi tersebut, dilihat dari efek menurunkan apoptosis secara berurutan adalah: AF, EGb, kemudian MC.

Pemberian asam folat dapat menurunkan apoptosis, karena saat diabsorpsi, folat ditransportasi secara cepat menuju jaringan sebagai $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}$. Ketika protein – protein tertentu mengikat derivat folat, mereka mempunyai afinitas yang lebih besar untuk non methylated analog. Juga didapatkan peningkatan kapasitas ikatan terdeteksi pada kasus defisiensi folat, uremia, kanker dan alkoholisme, tetapi bagaimana ikatan ini mengganggu transport dan suplai jaringan masih membutuhkan penelitian lebih lanjut (12,13).

Folat adalah metabolit aktif dari asam folat, diberikan untuk meningkatkan metabolisme format, mengkompensasi defisiensi Hepatic tetrahydrofolat (H_4 folat) dan mengurangi efek samping methanol (12,13,16). Bila metabolisme asam format dapat ditingkatkan, berarti penumpukan asam format dapat dikurangi, sehingga kerusakan mitokondria yang berakibat terjadinya aktivasi caspase 3 dapat dihambat dan pada akhirnya apoptosis lebih rendah. Hal ini yang menerangkan tentang didapatkannya penurunan apoptosis terbanyak, karena peranannya pada mata rantai yang paling atas yaitu sebelum kerusakan mitokondria.

Disebutkan EGb memiliki kapasitas sebagai anti apoptosis, melalui peranannya sebagai pengikat berbagai radikal bebas, pelindung neuron dari hipoksia dan kerusakan akibat glutamate, serta dapat menghambat kerusakan fungsional maupun morfologi retina setelah lepasnya lipid peroksidase (15). Peranannya di rantai

apoptosis yang atas, yaitu sebelum terlepasnya Sitokrom C, menerangkan kemampuannya dalam penurunan apoptosis.

Methyl-Cobalamin adalah suatu koenzim B12 endogen, yang ditransportasi secara baik pada organella sel saraf dan meningkatkan asam nukleat dan sintesis protein. Selain itu juga meningkatkan transport dan regenerasi aksonal, myelinisasi, serta memperbaiki transmisi sinaptik yang lambat, dan memperbaiki neurotransmitter ke nilai normal (13). Tingginya apoptosis pada kelompok MC, karena baru berperan pada mata rantai terakhir sebelum terjadinya apoptosis, yaitu meningkatkan asam nukleat dan sintesis protein (12,16,17).

Hasil ini berbeda dengan penelitian Shahriari (2005), yang mendapatkan penurunan amplitude gelombang b pada ERG kelinci, akibat efek sinergi dari AF dan MC. Penelitian ini memang tidak menilai hal tersebut.

Didapatkan hasil yang sesuai dengan perbandingan IA, yaitu didapatkan ekspresi caspase3 yang lebih banyak pada kelompok IM dan MC dibanding kelompok kontrol. Begitu juga didapatkan hasil yang sama dengan kelompok kontrol pada kelompok AF maupun EGb.

Caspase-caspase adalah suatu protease sistein yang terlibat dalam apoptosis. Kerusakan mitokondria akibat penumpukan asam format, mengaktivasi caspase 2 dan 9, yang diikuti aktivasi caspase 3 suatu *downstream caspase* baik pada jalur ekstrinsik maupun intrinsik. Dan selanjutnya caspase memberikan kontribusinya pada kematian sel melalui proses degradasi dari enzim-enzim yang memperbaiki DNA dan elemen-elemen struktural (6,7).

Chaudary P et al (1999) menemukan adanya keterlibatan caspases pada kematian SGR oleh aksotomi nervus optikus dan N-methyl-D-aspartate (8). Mc Kinnon et al (2002) menemukan keterlibatan caspase 3, 8 pada peningkatan tekanan intraokuler (9). Sedangkan Kurokawa et al (1999) menemukan keterlibatan caspase 1,2,3, dan 8 oleh induksi iskemia retina (10).

Peranan EGb dalam menurunkan ekspresi caspase 3 adalah melalui fungsinya sebagai pengikat radikal bebas, melindungi ultrastruktur membran, modulasi beberapa system enzim dan pompa ion (15). Beberapa penelitian menyebutkan fungsinya sebagai antioksidan dengan cara melindungi aktivitas respirasi mitokondria, ultrastruktur membran, serta mengurangi kerusakan produksi energi mitokondria. Sedangkan Asam folat dengan meningkatkan metabolisme asam format, sehingga kerusakan mitokondria dapat dicegah (12, 13,14,15)

KESIMPULAN

Didapatkan peningkatan ekspresi caspase 3 dan IA pada SGR yang diintoksikasi methanol. Pemberian Asam Folat menurunkan ekspresi caspase 3 dan IA terbanyak dan bermakna. Pemberian EGb ternyata dapat juga menurunkan IA, dan penurunan yang bermakna pada ekspresi caspase 3. Sedangkan Methylcobalamin tidak dapat menurunkan IA dan hanya memberikan penurunan yang tidak bermakna pada ekspresi Caspase 3.

Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang lama dan dosis pemakaian Asam folat, EGb, dan Methyl Cobalamin dan *site of action* pada tahapan apoptosis.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. American Academy of Ophthalmology. *Toxic Optic Neuropathies Neuro-Ophthalmology. Basic and Clinical Science Course Section 5*. San Francisco; 2003 – 2004; 166 – 168
2. Lessell Simmons. *Toxic and Deficiency Optic Neuropathies, in clinical Neuro – ophthalmology – Walsh and Hoyt's*. Edited by Miller and Newman. Williams and Wilkins Company; 1998; 663 – 675
3. T Liu Grant, Nicholas JV, Steven L Galetta. *Specific Toxic Optic Neuropathies Neuro ophthalmology Diagnosis and Management*. W.B. Philadelphia: Saunders Company; 2001; 169
4. S. Glaser Joel. *Nutritional and Toxic Optic Neuropathies Neuro – ophthalmology*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1998; 153 – 158
5. T. Seme Marina, Summerfelt Phyllis, Neitz Jay, T. Eels Janis, Michele M. Henry. *Differential Recovery of Retinal Function after Mitochondrial Inhibition by Methanol Intoxication*. Investigative Ophthalmology and Visual Science 2001; 42 : 834 – 841
6. Tezel Gulgun, Yang Xiangjun. *Caspase – Independent Componen of Retinal Ganglion Cell Death, In vitro; Investigative Ophthalmology and Visual Science*, November 2004; 45: 4049 – 4059
7. Vrabec Jushua P, Lieven Chistophers, Levin Leonard A. *Cell – Type – Specific Opening of The Retinal Ganglion Cell Mitochondrial Permeability Transition Pore*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2003; 44 : 2774 – 2782
8. Chaudhary P, Ahmed F, Quebada P, Sharma SC. *Caspase Inhibitors Block The Retinal Ganglion Cell Death Following Optic Nerve Tran Section*. Brain Res Mol Brain Res; 1999; 67: 36 – 45
9. Mc. Kinnon SS, Lehman DM. Kerrigan – Baumrind LA, et al. *Caspase Activation and Amyloid Precursor Protein Cleavage in Rat Ocular Hypertension*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002; 43 : 1077 – 1087
10. Korukawa T, Katai N, Shibuki H, et al. *BDNF Diminishes caspase – 2 But Not C – Jun Immunoreactivity of Neurons in Retinal Ganglion Cell Layer After Transient Ischemia*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999; 40 : 3006 – 3011

11. Hardman Joel G, Limbird Lee L. *Toxicology in the Pharmacological basis of therapeutics section XVI, the McGraw – Hill Companies*. 10th edition, 2001; 1886 – 1887
12. Marcus Robert, Coulstun Ann M. *Haematopoietic Agents; in the Pharmacological Basis of Therapeutics, Chapter 63, the McGraw – Hill Companies*. 10th edition, Section XI; 2001; 1510 – 1514
13. Janssen D, J Remacle, et al. *Protection of Mitochondrial Respiration Activity by Bilobalide*. *Biochemical Pharmacology*, Jul 58 (1) : 109 – 119
14. Sluse, FEGH Du, et al. *Protective Effects of Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) On Functional Impairments of Mitochondria Induced By Anoxia – Reoxygenation in Situ and In Vitro*. *Ginkgo Biloba Extract Egb 7* : 139 – 148
15. Mills Simon, Kerry B. *Principles and Practise of Phytotherapy- Modern Herbal Medicine*. London: Churchil Livingstone; 2000; 404 – 415.
16. HA Shahriari MD, A Hosseini Rad MD. *Preventive Effects of Vitamin B12 and Folic Acid in Methanol-Induced Retinopathy in Animal Model*, Zahedan, Iran: Zahedan University of Medical Sciences, 2005.
17. Watanabe T, Kaji R, Oka N, Bara W, Kimura J. *Ultra hi*
18. *gh dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy*. *J Neurol Sci*, 1994 Apr; 122(2): 140-143.
19. Sitorus Rita Sita. *Molecular and Epidemiological Aspects of Three Congenital Eye Disease in Indonesian Patients*. Ponsen & Looijen BV, Netherlands, 2004; 22 – 28.