

Media Medika Muda

Copyright©2017 by Medical Faculty of Diponegoro University

Volume 2, Nomor 2

ARTIKEL ASLI

Mei - Agustus 2017



INHIBISI FRAKSI BIOAKTIF MAHKOTA DEWA (*PHALERIA MACROCARPA*) TOPIKAL TERHADAP EKSPRESI VEGF KORNEA TIKUS WISTAR PASCA TRAUMA BASA

Mandasari Mandarana¹⁾, Trilaksana Nugroho²⁾, Sri Inakawati²⁾

INHIBITION OF BIOACTIVE FRACTIONS MAHKOTA DEWA (*PHALERIA MACROCARPA*) TOPICAL AGAINST VEGF EXPRESSION OF POST TRAUMATIC BASE ON WISTAR RAT'S CORNEA

ABSTRACT

Background: Cornea is a transparent eye tissue and avascular, the properties required in normal visual function, maintained by the balance of angiogenic and antiangiogenic factors. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) plays a role in angiogenesis, there is an increased expression of VEGF in corneal neovascularization. Previous research suggests that the bioactive fraction Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*), DLBS1425, have antiangiogenesis effect by inhibiting VEGF-C mRNA expression in breast cancer cells. This study investigates the effect of antiangiogenesis DLBS1425 in the eye, to judge from the expression of VEGF post-traumatic corneal Wistar rats. The objectives of this study was to prove DLBS1425 topical various concentrations had effect on the expression of VEGF in post-traumatized base Wistar rats cornea.

Methods: This research is true experimental post-test only design. Twenty-four Wistar rats received exposure to 1M NaOH with a diameter of 1 mm, were randomly divided into 4 groups. Group K was given drops Sodium Hyaluronate, group P1 by DLBS1425 drops concentration of 1×10^1 mg/ml, group P2 by DLBS1425 drops concentration of 1×10^0 mg/ml, P3 group was given DLBS1425 drops concentration of 1×10^{-1} mg/ml. The immunohistochemical expression of corneal VEGF was assessed after 7 days. Statistical analysis using the Kruskal Wallis test.

Results: The mean expression of VEGF in group K = 4.93, group P1 = 4.33, group P2 = 4.47, group P3 = 4.77. Expression of VEGF treatment group was lower than the control group ($p = 0.134$).

Conclusion: DLBS1425 topical has an effect on the expression of VEGF of Wistar rat cornea. Expression of VEGF in the treatment group was lower than the control group.

Key words: *Phaleria macrocarpa*, DLBS1425, VEGF, corneal neovascularization

ABSTRAK

Latar belakang: Kornea merupakan jaringan mata yang bersifat transparan dan avaskuler, sifat tersebut diperlukan dalam fungsi penglihatan normal, dipertahankan oleh keseimbangan faktor angiogenik dan antiangiogenik. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) berperan dalam angiogenesis, terdapat peningkatan ekspresi VEGF pada neovaskularisasi kornea. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa fraksi bioaktif Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*), DLBS1425, memiliki efek antiangiogenesis dengan cara menghambat ekspresi mRNA VEGF-C pada sel kanker payudara. Penelitian ini ingin mengetahui efek antiangiogenesis DLBS1425 di bidang mata, dinilai dari ekspresi VEGF kornea tikus Wistar pasca trauma. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan DLBS1425 topikal berbagai konsentrasi memiliki efek terhadap ekspresi VEGF kornea tikus Wistar pasca trauma basa.

Metode: Penelitian ini merupakan true experimental post-test only design. Dua puluh empat ekor tikus Wistar mendapat paparan NaOH 1M dengan diameter 1 mm, dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kelompok K diberi tetes Hyalub, kelompok P1 diberi tetes DLBS1425 konsentrasi 1×10^1 mg/ml, kelompok P2 diberi tetes DLBS1425 konsentrasi 1×10^0 mg/ml, kelompok P3 diberi tetes DLBS1425 konsentrasi 1×10^{-1} mg/ml. Setelah 7 hari, dinilai ekspresi VEGF kornea secara imunohistokimia. Analisis statistik menggunakan uji Kruskal Wallis.

Hasil: Rerata ekspresi VEGF pada kelompok K=4,93, kelompok P1=4,33, kelompok P2=4,47, kelompok P3=4,77. Ekspresi VEGF kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol ($p=0,134$).

¹⁾PPDS I Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

²⁾Staf Bagian/KSM Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS dr. Kariadi Semarang

Simpulan : DLBS1425 topikal konsentrasi 1×10^{-1} , 1×10^0 dan 1×10^1 memiliki efek terhadap ekspresi VEGF kornea tikus Wistar pasca trauma basa. Ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata kunci: *Phaleria macrocarpa*, DLBS1425, VEGF, neovaskularisasi kornea

PENDAHULUAN

Kornea merupakan jaringan mata yang bersifat transparan dan avaskuler yang diperlukan dalam fungsi penglihatan normal.^{1,2} Keseimbangan antara faktor angiogenik dan antiangiogenik mempertahankan kornea dalam keadaan avaskuler. Proses trauma, infeksi, inflamasi, hipoksia maupun degeneratif yang terjadi pada kornea mengakibatkan peningkatan regulasi faktor angiogenik dan penurunan regulasi faktor antiangiogenik, sehingga terjadi proses neovaskularisasi kornea.^{2,3} Proses penyembuhan luka dapat dibantu dengan adanya neovaskularisasi, akan tetapi neovaskularisasi juga dapat merugikan karena menyebabkan hilangnya sifat tranparansi kornea sehingga menyebabkan penurunan visus dan meningkatkan reaksi penolakan terhadap graft kornea sehingga memberikan prognosis buruk pada transplantasi kornea.^{4,5}

Trauma mata akibat bahan kimia merupakan masalah kegawatan mata yang sering terjadi. Prevalensi trauma mata akibat bahan kimia dilaporkan sebesar 11,5%, dengan insidensi dalam 5 tahun sebesar 8,7%.⁶ Frekuensi trauma basa lebih tinggi dibandingkan dengan trauma asam.⁷ Trauma basa pada mata sering menyebabkan kerusakan pada kornea dan segmen anterior, yang menyebabkan gangguan penglihatan yang permanen.⁸ Banyaknya kasus dengan visus pasca trauma kimia $\leq 3/60$ yang pernah dilaporkan cukup besar, berkisar antara 18-33,3%.^{9,10}

Keadaan patologis misalnya trauma dan inflamasi menyebabkan faktor pertumbuhan yang bersifat angiogenik jumlahnya melampaui inhibitor angiogenesis, sehingga mengarah kepada proses angiogenesis.^{2,11} Di antara berbagai macam faktor angiogenik, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) memiliki peran dalam angiogenesis baik yang fisiologis maupun patologis. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi VEGF selama proses neovaskularisasi.² Peningkatan kadar VEGF pada sel epitel yang berproliferasi sebanyak dua kali

lipat,¹² sedangkan pada penelitian lain yang mengukur kadar mRNA VEGF diketahui peningkatan kadar sebanyak lebih dari sepuluh kali lipat dibandingkan keadaan normal.¹³ Penelitian oleh Wolfgang dkk (2000) menyimpulkan bahwa didapatkan ekspresi VEGF secara bermakna pada kornea yang mengalami inflamasi dan vaskularisasi, selain itu VEGF memiliki peranan penting dalam proses neovaskularisasi kornea.⁵ Penelitian lainnya oleh Lisha dkk (2004) menunjukkan peningkatan ekspresi VEGF pada jaringan kornea 36 jam setelah trauma.¹⁴ Inhibisi terhadap VEGF memberikan peluang pendekatan farmakologis yang spesifik dalam hal antiangiogenesis untuk mengatasi neovaskularisasi dan merupakan hal yang menarik untuk diteliti lebih lanjut. Berdasarkan laporan sebelumnya yang menyatakan bahwa VEGF diperlukan dalam neovaskularisasi, maka VEGF dapat dijadikan sebagai target dalam menghambat kaskade angiogenesis.

Tanaman obat merupakan salah satu metode pengobatan alami yang banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia. Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan salah satu contoh tanaman obat asli Indonesia yang memiliki kandungan kimia alkaloid, terpenoid, saponin, resin, senyawa lignan (polifenol) dan flavanoid, yang berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, antiproliferasi, proapoptosis dan antiangiogenesis. Saat ini terdapat ekstrak semipolar *Phaleria macrocarpa* yang telah terstandarisasi yaitu *Dexa Laboratories of Biomolecular Sciences 1425* (DLBS1425) yang telah dipakai dalam beberapa penelitian sebelumnya. Penelitian oleh Tjandrawinata dkk (2010) terhadap sel kanker payudara menunjukkan bahwa DLBS1425 memiliki efek antiangiogenesis dengan cara menghambat ekspresi mRNA VEGF-C yang berakibat turunnya ekspresi VEGF.¹⁵ Penelitian dengan menggunakan DLBS1425 secara in vitro, pada dosis tertinggi yang diberikan dapat menyebabkan apoptosis sel kanker, namun tidak menyebabkan kematian pada sel yang normal.¹⁶ Oleh karena itu, DLBS1425 dapat dijadikan suatu terapi alternatif dalam mencegah neovaskularisasi

yang potensial dan aman dalam hal toksisitas terhadap jaringan sehat dan efek samping yang ditimbulkan.

Penelitian oleh Tjandrawinata dkk (2010) terhadap sel kanker payudara menunjukkan dengan peningkatan dosis DLBS1425 terdapat lebih banyak penurunan ekspresi VEGF-C.¹⁵ Penelitian yang dilakukan oleh Tandrasasmita dkk (2010) menyatakan kisaran dosis *in vitro* DLBS1425 yang dilaporkan sebagai antiproliferasi yaitu 5–100 µg/mL atau 5×10^{-3} mg/mL - 1×10^{-1} mg/mL,¹⁶ namun kisaran dosis *in vivo* sebagai antiangiogenesis di bidang mata belum pernah dilaporkan. Peneliti tertarik mengetahui efek antiangiogenesis, dalam hal ini dinilai dari ekspresi VEGF, pada pemberian DLBS1425 topikal pada mata. Oleh karena itu, peneliti menggunakan model angiogenesis kornea mata tikus Wistar yang diberi perlakuan trauma basa. Dengan menggunakan dosis terbesar yang pernah dilaporkan secara *in vitro* dan ditingkatkan dengan kelipatan 10, yaitu 1×10^{-1} mg/mL, 1×10^0 mg/mL dan 1×10^1 mg/mL, diharapkan dapat mengetahui efek DLBS1425 terhadap ekspresi VEGF dan mengetahui apakah didapatkan peningkatan efek yang bergantung tingkat dosis. Tingkatan dosis ini digunakan karena telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya tidak menimbulkan efek toksik pada permukaan bola mata.¹⁷

METODE

Penelitian ini merupakan *true experimental post-test only design* menggunakan hewan coba tikus wistar yang diberikan perlakuan DLBS 1425 topikal dengan berbagai konsentrasi pasca trauma basa pada kornea. Sampel penelitian ini adalah tikus Wistar jantan galur murni yang berusia 6–8 minggu atau mempunyai berat badan 150–200 gram yang dikembangbiakkan dan dipelihara di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang.

Tikus diaklimatisasi selama 7 hari kemudian diberikan perlakuan trauma basa dengan cara kornea mata kanan tikus yang sudah ditetes anestesi topikal, diberi perlakuan paparan NaOH 1M dengan menempelkan kertas saring yang berdiameter 1 mm pada sentral kornea selama 20 detik, lalu diberikan irigasi aquades steril sampai pH netral.

Kriteria inklusi: lesi pada kornea tikus Wistar dengan diameter 1–2 mm pasca pemaparan NaOH 1M.

Kriteria eksklusi:

- Tampak adanya kelainan anatomi pada kornea
- Terdapat tanda-tanda infeksi pada kornea
- Diameter lesi kornea pasca pemaparan NaOH 1 M melebihi 2 mm

Kriteria *drop out*: hewan coba mati sebelum berakhirnya masa pengamatan.

Setelah mendapat trauma, dilakukan randomisasi menjadi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 6 tikus. Kelompok kontrol (K) diberikan tetes mata *Hyalub*, kelompok perlakuan 1 (P1) diberikan tetes mata DLBS1425 topikal konsentrasi 1×10^1 mg/dl, kelompok perlakuan 2 (P2) diberikan DLBS1452 topikal konsentrasi 1×10^0 mg/dl dan kelompok perlakuan 3 (P3) diberikan DLBS1452 topikal konsentrasi 1×10^{-1} mg/dl. Seluruh kelompok diberikan tetes mata dengan frekuensi satu tetes pada mata kanan setiap 4 jam selama 7 hari.

Pada hari ke 8, tikus diterminasi dengan sedasi kloroform kemudian dilanjutkan dengan cervical dislocation. Mata kanan dienukleasi bulbi, kemudian kornea dieksisi dan dimasukkan ke dalam buffer formalin. Preparasi sampel kornea tikus dengan blok parafin dan pembuatan slide imunohistokimia di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang, pembacaan imunohistokimia di Laboratorium Diagnostik Waspada Semarang oleh dua orang ahli Patologi Anatomi menggunakan *Allred score*.¹⁸

Uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Distribusi data dikatakan memiliki sebaran yang normal apabila didapatkan $p > 0,05$, sedangkan sebaran data tidak normal apabila didapatkan $p < 0,05$. Uji homogenitas data menggunakan uji *Levene*, dikatakan bermakna jika nilai $p > 0,05$. Analisis data menggunakan uji *Kruskal Wallis*, dikatakan bermakna jika nilai $p < 0,05$.

HASIL

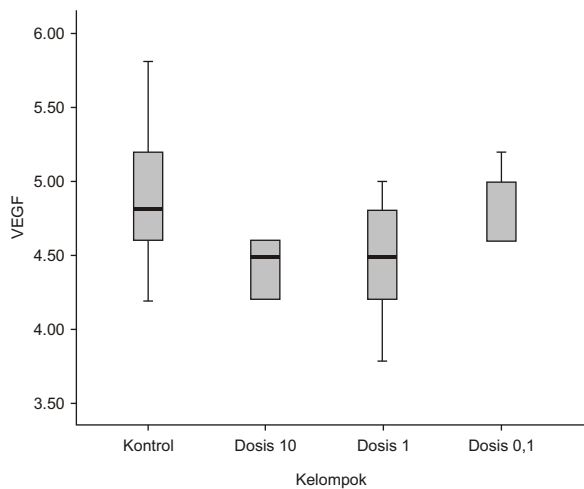
Deskripsi hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi VEGF kornea tikus Wistar pasca trauma basa disusun dalam bentuk tabel dan grafik, hasil pemeriksaan ditampilkan pada tabel 1 dan gambar 1, yang menunjukkan adanya perbedaan ekspresi

VEGF pada kelompok kontrol dan perlakuan. Rerata ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 2. menunjukkan uji normalitas pada kelompok K dan P2 didapatkan hasil sebaran data normal dengan nilai $p=0,830$ dan $0,964$, sedangkan uji normalitas pada kelompok P1 dan P3 didapatkan hasil yang tidak normal dengan nilai $p=0,033$ dan $0,007$. Uji homogenitas menunjukkan

Tabel 1. Ekspresi VEGF pada kelompok kontrol dan perlakuan

Spesimen	Kelompok			
	K	P1	P2	P3
1	4,6	4,6	4,2	4,6
2	4,6	3,6	4,4	5,2
3	5,8	4,6	4,6	4,6
4	4,2	4,4	5	4,6
5	5,2	4,6	4,8	4,6
6	5	4,2	3,8	5
Rerata	4,93	4,33	4,47	4,77



Gambar 1. Ekspresi VEGF pada kelompok kontrol dan perlakuan
Keterangan gambar: Kontrol = kelompok K, Dosis 10 = kelompok P1, Dosis 1 = kelompok P2, Dosis 0,1 = kelompok P3

Tabel 2. Deskriptif, Normalitas dan Homogenitas Ekspresi VEGF

Kel	Mean ± SD	Median (min – maks)	Normalitas p	Homoge-nitas Trans f
K	4,9 ± 0,56	4,8 (4,2 – 5,8)	0,830 ¹	0,906
P1	4,33 ± 0,39	4,5 (3,6 – 4,6)	0,033 ¹	0,024
P2	4,47 ± 0,43	4,5 (3,8 – 5)	0,964¹	0,908
P3	4,77 ± 0,27	4,6 (4,6 – 5,2)	0,007 ¹	0,006

¹Uji Shapiro - Wilk ²Uji Levene

sebaran data homogen dengan nilai $p=0,460$, maka analisis data dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*.

Tabel 3. Hasil Uji *Kruskal Wallis*

Kelompok	<i>Kruskal Wallis</i> (p)
K	
P1	
P2	0,134 ³
P3	

³Uji *Kruskal Wallis*

Tabel 3 menunjukkan ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,134$.

DISKUSI

Pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan memberikan hasil ekspresi VEGF kelompok perlakuan, yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, seperti yang terlihat pada tabel 1. Berdasarkan gambaran *box plot* pada gambar 1 menunjukkan bahwa ekspresi VEGF kornea memiliki kecenderungan menurun sesuai dengan peningkatan dosis. Hal ini sesuai dengan penelitian Tjandrawinata dkk (2010) terhadap sel kanker payudara yang menunjukkan bahwa DLBS1425 memiliki efek antiangiogenesis yang bergantung tingkat dosis dengan cara menghambat ekspresi mRNA VEGF-C yang berakibat turunnya ekspresi VEGF.¹⁵

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Tandrasasmita dkk (2010) telah melaporkan bahwa kisaran dosis *in vitro* DLBS1425 sebagai antiproliferasi yaitu 5×10^{-3} mg/mL - 1×10^{-1} mg/mL.¹⁶ Konsentrasi DLBS1425 topikal yang dipakai dalam penelitian ini, yaitu 1×10^1 , 1×10^0 dan 1×10^{-1} , diambil dari dosis tertinggi *in vitro* dan ditingkatkan 10 kali dan 100 kali. Namun pada penelitian ini dengan peningkatan dosis tersebut ekspresi VEGF antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan yang bermakna. Hal ini dimungkinkan karena pada penelitian *in vitro* pemberian obat langsung berefek pada sel, sedangkan pada penelitian *in vivo* terdapat faktor lain seperti absorpsi, penetrasi dan lama kontak. Oleh karena itu perlu diteliti lebih lanjut mengenai kemampuan absorpsi dan penetrasi

DLBS1425 topikal dalam bentuk sediaan tetes maupun sediaan topikal lainnya.

Penelitian oleh Tjandrawinata dkk (2011) dengan pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa* pada sel kanker MDA-MB-231 menunjukkan adanya efek antiangiogenik melalui penghambatan ekspresi mRNA dari VEGF-C.¹⁹ Demikian pula pada penelitian oleh Mustafida dkk (2014) menyatakan adanya penurunan jumlah pertumbuhan pembuluh darah baru pada membran korio alantois embrio ayam yang sesuai dengan peningkatan dosis ekstrak *Phaleria macrocarpa*.²⁰ Halim LJ (2011) menyatakan ekstrak *Phaleria macrocarpa* menurunkan ekspresi VEGF pada adenokarsinoma mamma mencit C3H.²¹ Sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya, pada penelitian ini juga didapatkan ekspresi VEGF yang semakin rendah sesuai peningkatan dosis (gambar 1) meskipun secara statistik tidak berbeda bermakna, oleh karena itu DLBS1425 memiliki potensi antiangiogenik yang perlu diteliti lebih lanjut dengan meningkatkan dosis. Penelitian sebelumnya oleh Bolia (2015) menyatakan konsentrasi DLBS1425 topikal yang dipakai dalam penelitian ini, yaitu 1×10^{-1} , 1×10^0 dan 1×10^1 , tidak menimbulkan efek toksik pada permukaan bola mata dinilai dari derajat proliferasi epitel dan hiperplasia epitel kelenjar meibom pada mata kelinci setelah pengamatan selama 30 hari.¹⁷ Penelitian selanjutnya dengan meningkatkan dosis DLBS1425 topikal perlu disertai dengan penelitian mengenai efek toksik terhadap permukaan bola mata pada dosis tersebut.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yaitu kesulitan dalam penandaan lokasi pasti lesi pada spesimen kornea karena tidak tersedia metoda khusus untuk penandaan area lesi, sehingga ada kemungkinan pemotongan spesimen dan preparasi sediaan imunohistokimia yang tidak tepat, yang berakibat hasil pembacaan ekspresi VEGF yang tidak tepat pula. Oleh karena itu, perlu dipikirkan metoda untuk marker area lesi agar pemotongan spesimen kornea dan preparasi sediaan imunohistokimia dapat mengenai area lesi dengan tepat.

SIMPULAN

DLBS1425 topikal konsentrasi 1×10^{-1} , 1×10^0 dan 1×10^1 memiliki efek terhadap ekspresi VEGF kornea

tikus Wistar pasca trauma basa. Ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun secara statistik tidak didapatkan perbedaan yang bermakna.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan peningkatan dosis DLBS1425 topikal disertai penelitian mengenai efek toksik terhadap permukaan bola mata pada dosis tersebut, durasi penelitian yang bertingkat sehingga dapat diketahui pola ekspresi VEGF, serta penelitian dengan menggunakan bentuk sediaan DLBS1425 topikal yang memberikan efek absorpsi, penetrasi dan lama kontak yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cantor LB, Rapuano CJ, Cioffi GA. External Disease and Cornea. Section 8. San Fransisco: American Academy of Ophthalmology; 2014. p. 6-10,339-44.
2. Wang Q, Yang J, Tang K, Luo L, Wang L, Tian L, *et al.* Pharmacological Characteristics and Efficacy of A Novel Anti-angiogenic Antibody FD006 in Corneal Neovascularization. BMC Biotechnology. 2014; 14: 17.
3. Safvati A, Hume E, Cole N, Willcox M. Mediators of Neovascularization and the Hypoxic Cornea. Current Eye Research. 2009; 34: 501-14.
4. Qazi Y, Maddula S, Ambati B. Mediators of Ocular Angiogenesis. Journal of Genetics. 2009; 88(4): 495-7.
5. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor dan Its Receptor in Inflamed Vascularized Human Corneas. Investigative Ophthalmology and Viscual Science. 2000; Vol 41, No. 9: 2514-20.
6. Wong TY, Klein BEK. The Prevalence and 5-year Incidence of Ocular Trauma: The Beaver Dam Eye Study. American Academy of Ophthalmology. 2000; 107: 2196-2202.
7. Schrage N, Burgher F, Blomet J, Bodson L, Gerard M, Hall A, *et al.* Chemical Ocular Burns: New Understanding and Treatments. London: Springer; 2011. p. 9, 68.
8. Ling S, Lin H, Liang L, Xu J, Xu C, Zhao W, *et al.* Development of New Lymphatic Vessels in Alkali-Burned Corneas. Acta Ophthalmol. 2009; 87: 31522.
9. Morgan, SJ. Chemical Burns of The Eye: Causes and Management. British Journal of Ophrhalmology. 1987; 71: 854-7.
10. Adepoju FG, Adeboye A, Adigun LA. Chemical Eye Injuries: Presentation and Management Difficulties. Annals of African Medicine. 2007; Vol. 6 No. 1: 7-11.
11. Spöler F, Först M, Kurz H, Frenz M, Schrage NF. Dynamic Analysis of Chemical Eye Burns Using High Resolution Optical Coherence Tomography. Journal of Biomedical Optics. 2007; Vol 12, No. 4: 1-6.
12. Sivak JM, Ostriker AC, Woolfenden A, Demirs J, Cepeda R, Long D, *et al.* Pharmacologic Uncoupling of Angiogenesis and Inflammation during Initiation of Pathological Corneal Neovascularization. Journal of Biological Chemistry. 2011; Vol. 286, No. 52: 44965-75.

13. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for Vascular Endothelial Growth Factor in Wound- and Inflammation-Related Corneal Neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1998; Vol 39, No. 1: 18-22.
14. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor VEGFR-2 in the Regulation of Corneal Neovascularization and Wound Healing. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2004; 82: 557-63.
15. Tjandrawinata RR, Arifin PF, Tandrasasmita OM, Rahmi D, Aripin A. DLBS1425, a Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl. Extract Confers Anti Proliferative and Proapoptosis Effects via Eicosanoid Pathway. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 2010; Vol 0: 1-15.
16. Tandrasasmita OM, Lee JS, Baek SH, Tjandrawinata RR. Induction of Cellular Apoptosis in Human Breast Cancer by DLBS 1425, a Phaleria macrocarpa Compound Extract, via Downregulation of PI3-Kinase/AKT Pathway. *Cancer Biology & Therapy*. 2010; 10(8):1-11.
17. Bolia. Efek Pemberian Berbagai Konsentrasi DLBS1425 Topikal terhadap Proliferasi Epitel dan Hiperplasia Epitel Kelenjar Meibom Kelinci. Semarang: Universitas Diponegoro; 2015.
18. Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG. A Robust Automated Measure of Average Antibody Staining in Immunohistochemistry Images. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2010; Volume 58(2): 95107.
19. Tjandrawinata R, Aripin A, Arifin PF, Rahmi D. Extract of Phaleria macrocarpa as An Antineoplastic, Anti-inflammatory and Antiangiogenic Agent. Patent Application Publication. 2010:1-6.
20. Mustafida RY, Munawir A, Dewi R. Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 2014; Volume 2(1):4-8.
21. Halim LJ. Pengaruh Pemberian Ekstrak Phaleria macrocarpa terhadap Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor Tumor dan Perkembangan Ukuran Massa Tumor pada Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H. Semarang: Universitas Diponegoro; 2011.