

Uji Iritasi Sediaan Gel Penyembuh Luka Ekstrak Etanol Daun Binahong Menggunakan *Slug Irritation Test*

(Irritation Test of Wound Healing Gel of Ethanolic Extract of Binahong Leaf Using Slug Irritation Test)

SRI HARTATI YULIANI¹, YUMI RAHMADANI², ENADE PERDANA ISTYASTONO¹

¹Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, Indonesia.

²PT Genaro Pharmaceuticals.

Diterima 9 November 2015, Disetujui 15 Agustus 2016

Abstrak: Penyembuhan luka adalah proses dinamik yang rumit dan belum sepenuhnya dimengerti. Proses penyembuhan luka terdiri dari 3 fase yaitu fase inflamasi, fase pembentukan jaringan dan fase remodeling. Lama fase inflamasi memegang peranan penting pada proses penyembuhan luka. Fase inflamasi yang panjang akan menyebabkan penundaan proses penyembuhan luka. Iritan dapat memperpanjang waktu pelepasan interleukin-1 and TNF- α . Hal tersebut akan menyebabkan matriks ekstraseluler yaitu suatu material penting dalam pembentukan jaringan baru terdegradasi. Sediaan penyembuh luka tidak boleh mengandung iritan, sehingga semua sediaan penyembuh luka harus diuji potensi iritasinya. Potensi iritasi gel penyembuh luka ekstrak etanol daun binahong telah diuji menggunakan *slug irritation test*. Validasi terhadap metode ini telah dilakukan dengan hasil sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 100% pada nilai batas produksi mukus 8,79%. Metode ini valid untuk menentukan potensi iritasi terhadap suatu produk. Produksi mukus sediaan gel penyembuh luka ekstrak etanol daun binahong adalah 4,55% sehingga dapat disimpulkan sediaan tersebut tidak menimbulkan iritasi pada kulit.

Kata kunci: gel penyembuh luka, ekstrak etanol daun binahong, *slug irritation test*.

Abstract: Wound healing is a complex of various dynamic processes which are not completely understood. There are 3 phases in the normal wound healing, i.e. inflammation phase, tissue formation phase and tissue remodeling phase. The duration of the inflammation phase takes an important part of the healing process. The prolonged inflammation will delay the healing process. Irritant can lead prolonged elevation of interleukin-1 and TNF- α . It causes the degradation of extracellular matrix that is an important material for tissue formation. Wound dressing should not contain irritant material. Therefore, all wound dressing have to be tested for skin irritation potency. Wound healing gel of ethanolic extract of binahong leaf has been tested for its irritant potency by slug irritation test. The validation of slug irritation test resulted both of sensitivity and specificity 100% at the cut-off mucus production of 8.79%. This method was valid to determine irritant potency of the product. Mucus production of the gel was 4.55%, therefore it can be concluded that the gel did not cause skin irritation.

Keywords: wound healing gel, ethanolic extract of binahong leaf, slug irritation test.

* Penulis korespondensi, Hp. 08995047771
e-mail: yuli_far@usd.ac.id

PENDAHULUAN

PROSES penyembuhan luka adalah proses dinamis yang kompleks dan belum sepenuhnya diketahui⁽¹⁾. Proses ini meliputi tiga fase yaitu fase inflamasi, fase formasi jaringan dan fase remodeling jaringan⁽²⁾ yang terjadi secara berurutan. Fase inflamasi dan formasi jaringan dapat dipercepat dengan pemberian obat⁽³⁾ sedangkan fase *remodelling* jaringan biasanya berlangsung dalam jangka yang panjang sampai dengan 2 tahun⁽¹⁾. Proses penyembuhan luka akan mengembalikan integritas kulit dengan akibat fibrosis dan jaringan parut⁽⁴⁾. Dewasa ini sudah banyak dikembangkan sediaan penyembuh luka dengan bahan aktif herbal diantaranya dalam bentuk salep, krim, losion dan gel, dan telah terbukti mempunyai aktivitas^(5,6,7,8). Sediaan penyembuh luka yang baru-baru ini dikembangkan adalah sediaan penyembuh luka ekstrak binahong^(9,10).

Sediaan penyembuh luka tidak boleh mengiritasi kulit. Iritasi merupakan fenomena inflamasi pada kulit yang disebabkan oleh senyawa asing. Inflamasi adalah fase pertama proses penyembuhan luka⁽²⁾. Lama inflamasi memegang peranan penting dalam proses penyembuhan luka. Terjadinya inflamasi yang berlebihan pada jaringan kulit yang luka akan menghambat proses perbaikan jaringan⁽¹¹⁾. Adanya iritan pada luka akan memperlama pengeluaran *pro-inflammatory cytokines* (interleukin-1 dan TNF- α). Sebagai akibat fase inflamasi akan diperpanjang sehingga meningkatkan level *matrix metalloproteases* (MMPs). MMPs merupakan famili protein yang mampu mendegradasi *extracellular matrices* (ECM). ECM merupakan bahan penting pada proses reepiteliasi jaringan⁽¹²⁾.

European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) mengkampanyekan metode alternatif untuk menguji keamanan sediaan farmasi terutama sediaan topikal dengan prinsip 3R (*reduce, refinement and replacement*)⁽¹³⁾. Penelitian ini menggunakan prinsip ketiga yaitu *replacement* dalam pelaksanaannya. Hewan uji dalam penelitian ini yaitu kelinci diganti oleh siput telanjang yang merupakan hewan invertebrata⁽¹⁴⁾ dengan terlebih dahulu melakukan validasi protokol uji.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Binahong. Simplisia daun binahong ditimbang sebanyak 50 g dan ditambah 500 mL etanol 96%, suhu penyarian dikendalikan 50 °C menggunakan *waterbath* dengan pengadukan konstan 200 rpm

selama 90 menit. Sari yang didapat dipisahkan dan dipekatkan sampai menjadi 25% volume semula.

Pembuatan Sediaan. Formula gel penyembuh luka ekstrak etanol binahong⁽⁹⁾:

R/	Carbopol 940	1,25
	Na-CMC	0,5
	Ca-alginat	0,5
	Trietanolamin	3 (sampai pH 7)
	Gliserol	12,5
	Asam Borat	0,5
	Kalium sorbat	0,2
	Ekstrak etanol binahong	5 mL
	Aquades qs ad	100

Na-CMC ditaburkan pada air dan diaduk menggunakan *mixer* dengan kecepatan putar 400 rpm selama 10 menit, kemudian Ca-alginat ditambahkan dan dengan kecepatan putar yang sama diaduk selama 10 menit. Terakhir tambahkan Carbopol 940 ke dalam campuran dan diaduk sampai homogen. Asam borat dan kalium sorbat yang telah dilarutkan dalam air ditambahkan ke dalam campuran di atas dan diaduk sampai homogen. Gliserol kemudian ditambahkan ke dalam campuran diaduk sampai homogen. Terakhir trietanolamin ditambahkan dan diaduk sampai homogen sampai pH 7. Campuran tersebut adalah basis gel. Basis ini kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada 115 °C selama 30 menit. Basis gel yang telah steril dipindahkan ke *laminair air flow*. Ekstrak etanol binahong ditambahkan kedalam basis pada kondisi aseptis. Kemudian gel penyembuh luka ekstrak etanol binahong dikemas ke dalam tube di bawah LAF.

Uji Sifat Fisik Gel. Uji Viskositas. Hidrogel dimasukkan ke dalam wadah dan dipasang pada *portable viscotester*. Viskositas diketahui dengan mengamati gerakan jarum penunjuk viskositas. Uji dilakukan 24 jam setelah pembuatan hidrogel.

Uji Daya Sebar. Hidrogel ditimbang seberat 2 g kemudian diletakkan di tengah kaca bulat berskala. Di atas gel diletakkan kaca bulat lain yang telah ditimbang dan diberi beban seberat 1 kg selama 3 menit. Tarik kaca bulat sebelah atas dengan beban seberat 80 g. Dicatat jarak dan waktu yang diperlukan untuk memisahkan kedua kaca tersebut. Daya sebar dihitung dengan rumus:

$$S = M \times L / T$$

S = daya sebar (cm g/detik)

L = jarak tempuh (cm)

M = berat kaca bulat bagian atas (gram)

T = waktu yang dibutuhkan untuk memisahkan kaca bulat bagian atas dan bawah (detik)

Uji Daya Lekat. Usus babi digunakan untuk merepresentasikan tekstur dari luka baru. Usus

babi yang telah dibilas dicuci dengan larutan fisiologis. Usus tersebut kemudian ditempatkan pada platform. Sebanyak 0,5 g gel ditambahkan di atasnya. Diletakkan pan di atasnya kemudian diberi beban 100 g selama 1 menit. Pada pan yang lain air ditambahkan sedikit demi sedikit sampai pan lepas dari permukaan usus. Beban yang digunakan untuk melepaskan pan menggambarkan bioadesi gel. Bioadesi dihitung berdasarkan rumus:

$$B = W/A$$

$$B = \text{bioadesi (g/cm}^2\text{)}$$

W= berat air yang diperlukan untuk melepas pan dari usus (g)

A= luas area pan (cm)

Slug Irritation Test (Uji Iritasi Menggunakan Siput Telanjang). Siput yang digunakan dalam penelitian ini adalah siput dengan berat ± 3 g dan tidak terdapat luka pada dinding badan siput. Siput ditempatkan pada sebuah petri yang telah diberi sampel sebanyak 1 gram dan dibiarkan selama 60 menit. Mukus yang dihasilkan siput dikumpulkan dan ditimbang. Sampel yang digunakan adalah aquades (kontrol negatif), basis gel (kontrol negatif), 1% SLS dalam basis (kontrol positif) dan gel penyembuh luka ekstrak binahong. Nilai *cut-off* dari produksi mukus ditentukan mengklasifikasikan sampel ke dalam iritan atau non iritan.

Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane.

Telur ayam leghorn yang telah dibuahi dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37 °C. Rongga udara telur dipastikan berada di sebelah atas. Telur dirotasi selama 10 hari. Pada hari kesepuluh telur diteropong, telur yang tidak dibuahi atau tidak mengandung embrio hidup dibuang. Rongga udara telur ditandai. Rongga telur yang telah ditandai, digunting cangkang terluarnya dengan menggunakan gunting steril. Untuk mempermudah proses ini cangkang dilunakkan dengan larutan NaCl 0,9% steril. Setelah cangkang terluar dibuang, membran terluar telur dibasahi dengan larutan NaCl 0,9% hangat dan dimasukkan kembali ke dalam inkubator selama 5-20 menit sehingga membran terluar dapat diambil dengan mudah. Setelah membran terluar diambil, dipilih telur yang tidak mengalami kerusakan CAM akibat proses tersebut. Sebanyak 300 mg sampel diletakkan pada CAM, diamkan 20 detik. Setelah 20 detik CAM segera dibersihkan dengan menggunakan NaCl 0,9% steril. Waktu pengamatan selama 300 detik dimulai segera setelah CAM bersih dari sampel. Sebagai kontrol iritan digunakan sodium lauril sulfat, kontrol negatif adalah air. Percobaan dilakukan terhadap kontrol iritan, kontrol positif dan sediaan penyembuh luka ekstrak etanol daun binahong.

Analisis Data. Uji Slug Irritation Test. Data yang didapat dari uji iritasi menggunakan siput ditentukan nilai *cut-off* untuk mengklasifikasikan bahan sebagai iritan dan non-iritan. Data tersebut dianalisis menggunakan paket *Classification and Regression Trees* (CART) pada aplikasi Statistika Komputasi R versi 3.0.2 (<https://www.r-project.org/>). Luaran dari CART adalah nilai *cut-off* yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas terbaik. Berdasarkan nilai *cut-off* ini sampel diklasifikasikan sebagai senyawa iritan dan non-iritan. Hasil klasifikasi dibandingkan dengan hasil menurut HET-CAM.

HET-CAM. Data yang didapat pada uji HET-CAM dihitung menggunakan rumus:

$$T = \frac{301 - H}{300} \times 5 + \frac{301 - L}{300} \times 7 + \frac{301 - C}{300} \times 9$$

Keterangan:

T = skor iritasi

H= waktu yang dibutuhkan untuk menimbulkan hemoragi (detik)

L= waktu yang dibutuhkan untuk menimbulkan lisis (detik)

C= waktu yang dibutuhkan untuk menimbulkan koagulasi (detik)

Hasil yang didapat dari perhitungan kemudian dicocokkan dengan nilai pada Tabel 1⁽¹⁵⁾.

Tabel 1. Kriteria iritasi HET-CAM⁽¹⁵⁾.

No.	Skor iritasi HET-CAM	Kategori iritasi
1.	$\leq 0,9$	Tidak mengiritasi
2.	1,0-4,9	Iritasi lemah
3.	5,0-8,9	Iritasi moderat
4.	9,0-21	Iritasi kuat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman binahong diketahui mengandung triterpenoid, saponin, flavonoid, kuinon, monoterpenoid, sesquiterpenoid^(16,17). Salah satu senyawa aktif golongan triterpenoid yaitu asam ursolat mempunyai aktivitas anti-inflamasi⁽¹⁸⁾, mengembalikan permeabilitas kulit⁽¹⁹⁾ dan antimikroba⁽²⁰⁾. Berdasarkan hal tersebut Yuliani membuktikan bahwa ekstrak etanol daun binahong mempunyai aktivitas sebagai penyembuh luka⁽²¹⁾.

Ekstrak etanol daun binahong kemudian dibuat dalam bentuk sediaan gel. Sediaan gel dipilih karena gel memberikan efek hidrasi kepada kulit yang luka sehingga akan mengurangi jaringan nekrosis melalui mekanisme apoptosis⁽²²⁾. Selain itu sediaan hidrogel juga membantu menghilangkan jaringan mati, terasa

dingin di permukaan luka, menurunkan rasa sakit, dan meningkatkan penerimaan konsumen⁽²³⁾. Basis gel diautoklaf terlebih dahulu dan ekstrak dicampur dibawah kondisi aseptis. Sterilisasi diperlukan karena salah satu persyaratan sediaan penyembuh luka adalah steril.

Tabel 2. Sifat fisik gel penyembuh luka ekstrak etanol binahong.

No.	Sifat Fisik	Nilai
1.	Viskositas (d.Pa.S)	190,54 ± 7,12 d.Pa.S
2.	Daya sebar (cm)	21,20 ± 1,55 cm.g/detik
3.	Daya lekat	19,97 ± 0,86 g/cm ²

Sediaan gel penyembuh luka ekstrak etanol binahong sangat nyaman digunakan pada luka, hal ini dibuktikan dengan sifat fisik seperti terlihat pada Tabel 2. Viskositas yang tidak terlalu besar dan daya sebar yang dimiliki gel penyembuh luka tersebut tidak menimbulkan rasa sakit saat diaplikasikan karena gel tersebut bersifat lembut. Gel akan melekat dengan baik pada kulit yang luka dalam waktu yang cukup untuk melepaskan obatnya.

Sediaan penyembuh luka tidak boleh bersifat iritan. Fase inflamasi merupakan fase pertama proses penyembuhan luka. Fase ini bertujuan untuk mencegah keluarnya darah dan membentuk perlindungan segera dari faktor luar dengan terbentuknya agregat oleh darah. Fase inflamasi diperlukan dalam proses penyembuhan luka tetapi tidak boleh berlebihan. Apabila fase inflamasi ini terjadi berlebihan maka akan merugikan karena akan menghambat proses reepiteliasi kulit. Iritan akan memperparah inflamasi yang terjadi pada proses penyembuhan luka sehingga sediaan penyembuh luka tidak boleh bersifat iritan.

Penelitian ini bertujuan mengetahui sifat iritan sediaan penyembuh luka ekstrak etanol binahong. Metode yang digunakan untuk menguji adalah *slug irritation test* (menggunakan siput telanjang). Siput telanjang dipilih sebagai hewan uji karena siput telanjang merupakan invertebrata. Penggunaan hewan uji (vertebrata) untuk keperluan uji toksisitas akut sediaan topikal sudah mulai dihindari. Para penyayang binatang mulai berkampanye tentang hak-hak hewan, hal tersebut memaksa peneliti untuk membuat metode alternatif untuk keperluan uji toksisitas akut. *Slug irritation test* yang digunakan merupakan metode alternatif toksisitas akut (iritasi) pada kulit.

Siput telanjang adalah invertebrata yang dinding tubuhnya sangat rentan terhadap serangan fisis dan mekanis. Dinding tubuh siput telanjang akan mengeluarkan mukus yang berfungsi: (i)

Lokomotion; (ii) Lubrikasi; (iii) Mencegah dehidrasi; (iv) Melindungi tubuh dari kerusakan⁽¹⁴⁾. Siput dengan berat ± 3 g digunakan dalam penelitian. Berat siput harus dikendalikan untuk memperkecil variasi parameter yang diukur. Data dari Tabel 2 memperlihatkan produksi mukus yang disebabkan oleh air, basis gel, 1% SLS dalam air dan 1% SLS dalam basis gel sebagai sampel uji. Produksi mukus siput dengan sampel air bernilai negatif. Hal tersebut disebabkan siput akan mengabsorpsi air yang digunakan sebagai sampel.

Data Tabel 3 digunakan untuk menentukan nilai batas antara senyawa iritan dan non-iritan. Nilai batas dihitung menggunakan metode *Classification and Regression Tree* (ACRT). Sensitivitas dan spesifisitas protokol dihitung dalam penentuan nilai batas ini. Sensitivitas adalah jumlah total iritan yang diklasifikasikan secara benar dibagi dengan jumlah total sampel. Spesifisitas adalah jumlah total non-iritan yang diklasifikasikan secara benar dibandingkan jumlah total sampel.

Protokol *slug irritation test* dapat digunakan untuk

Tabel 3. Produksi mukus siput telanjang (% berat siput).

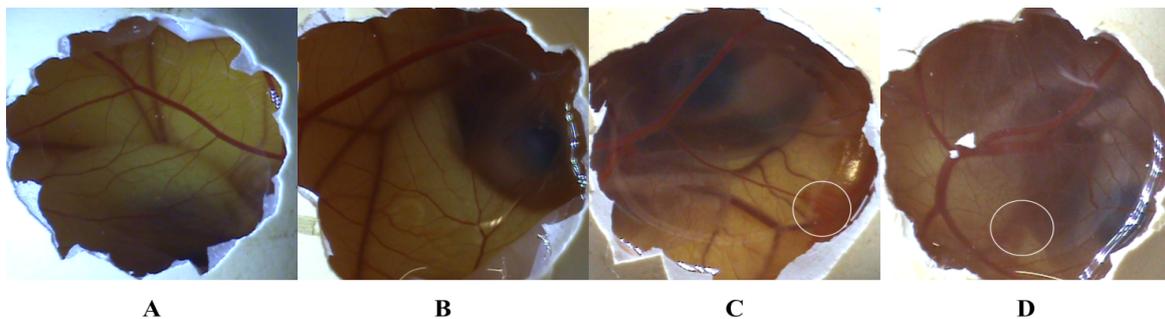
No.	AirB	asis gel	1% SLS dalam air	1% SLS dalam basis gel
1.	-9,11	7,94	16,28	22,72
2.	-10,39	6,29	19,13	9,74
3.	-15,99	0	19,03	16,33
4.	-15,07	0,33	16,11	9,64
5.	-19,12	1,96	21,34	16,54

memprediksi potensi iritasi senyawa apabila memiliki sensitifitas dan spesifisitas lebih dari sama dengan 60%. Nilai batas dalam penelitian ini dihitung menggunakan perangkat lunak Statistika Komputasi R. Nilai batas produksi mukus dengan sensitifitas dan spesifisitas terbaik adalah 8,79%. Sensitivitas dan spesifisitas untuk nilai batas 8,79% masing-masing adalah 100% dan 100%. Nilai batas ini berarti suatu senyawa dikatakan sebagai non-iritan apabila menyebabkan siput memproduksi mukus < 8,79% dari berat tubuhnya. Ketepatan dari nilai batas ini adalah 100%.

Nilai batas yang dihasilkan kemudian digunakan untuk mengklasifikasikan sampel ke dalam golongan iritan dan non-iritan berdasarkan jumlah mukus yang dihasilkan oleh siput. Nilai batas produksi mukus 8,79% dari berat siput menghasilkan klasifikasi yang diperlihatkan pada Tabel 4. Hasil ini kemudian dibandingkan dengan klasifikasi iritan sampel menggunakan metode HET-CAM (Gambar 1). Metode

Tabel 4. Klasifikasi senyawa berdasarkan *slug irritation test* and HET-CAM.

No.	Senyawa	<i>Slug irritation test</i>		HET-CAM	
		% mukus	klasifikasi	skor	klasifikasi
1.	air	-13,94	Non-iritan	0	Non-iritan
2.	Basis gel	3,30	Non-iritan	0	Non-iritan
3.	SLS 1% dalam air	18,51	Iritan	7,58	Iritan
4.	SLS 1% dalam basis gel	14,99	Iritan	5,37	Iritan



Gambar 1. Hasil inspeksi visual pada uji HET-CAM untuk air (A) dan basis (B) sebagai kontrol dan SLS 1% dalam air (C) dan SLS 1% dalam basis (D). Tidak muncul tanda-tanda iritasi pada A dan B. Hemoragi yang muncul ditandai dengan lingkaran putih pada foto C dan D.

HET-CAM ini adalah metode yang mapan digunakan untuk mengklasifikasikan potensi iritasi senyawa. Hasil perhitungan skor HET-CAM dicocokkan dengan menggunakan Tabel 1 untuk menghasilkan klasifikasi iritasi berdasarkan HET-CAM seperti tercantum dalam Tabel 4. Klasifikasi potensi iritasi senyawa dengan menggunakan *slug irritation test* dan HET-CAM memberikan hasil yang sama (Tabel 4). Sehingga *slug irritation test* dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk mengukur potensi iritasi suatu senyawa.

Protokol *slug irritation test* tersebut kemudian digunakan untuk mengevaluasi potensi iritasi gel

gel penyembuh luka ekstrak etanol daun binahong adalah memiliki nilai rata-rata 4,55%. Nilai batas senyawa dikatakan mengiritasi adalah 8,97%. Jadi gel penyembuh luka ekstrak etanol daun binahong tidak mengiritasi kulit.

SIMPULAN

Gel penyembuh luka ekstrak etanol binahong menyebabkan siput mengeluarkan mukus sebanyak 4,55%, sehingga dapat disimpulkan bahwa sediaan ini tidak mengiritasi kulit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung secara finansial oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi melalui Penelitian Hibah Kompetensi Tahun 2015 (No. DIPA-023.04.1.673453/2015).

DAFTAR PUSTAKA

- Shai A, Maibach HI. Wound healing and ulcers of the skin, diagnosis and therapy-the practical approach. Springer Berlin Heidelberg; 2005.
- Singer AJ, Richard AF, Clark MD. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999. 341(10):738–46.
- Wilgus TA, Vodovotz Y, Vittadini E, Clubbs EA, Oberszyn TM. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. Wound Repair Regen. 2003. 11(1):25–34.

Tabel 5. Produksi mukus siput telanjang yang disebabkan oleh gel penyembuh luka ekstrak etanol binahong.

No.	Produksi mukus (% berat siput)	Nilai batas (%)	Klasifikasi
1.	5,75		Non-iritan
2.	5,33		Non-iritan
3.	4,10	8,79	Non-iritan
4.	3,48		Non-iritan
5.	3,98		Non-iritan

penyembuh luka ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis). Mukus yang dihasilkan oleh siput yang terpapar gel penyembuh luka ekstrak binahong (Tabel 5) kemudian dibandingkan dengan nilai batas 8,79% apabila jumlah mukus yang dihasilkan lebih kecil maka sediaan gel tidak mengiritasi kulit. Jumlah mukus yang dihasilkan oleh

4. Bullard KM, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal wound healing: Current biology. *World J Surg.* 2003. 27(1):54–61.
5. Chuangsuwanich A, Arunakul S, Kamnerdnakta S. The efficacy of combined herbal extracts gel in reducing scar development at a split-thickness skin graft donor site. *Aesthetic Plast Surg.* 2013. 37(4):770–7.
6. Hayouni EA, Miled K, Boubaker S, Bellasfar Z, Abedrabba M, Iwaski H, et al. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. *Phytomedicine.* 2011. 18(11):976–84.
7. Mukherjee PK, Mukherjee K, Kumar MR, Pal M, Saha BP. Evaluation of wound healing activity of some herbal formulations. *Phyther Res.* 2003. 17(3):265–8.
8. Sadaf F, Saleem R, Ahmed M, Ahmad SI, Navaid-ul-Zafar. Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in *Guinea pigs*. *J Ethnopharmacol.* 2006. 107(2):161–3.
9. Yuliani SH, Fudholi A, Pramono S, Marchaban. The effect of formula to physical properties of wound healing gel of ethanolic extract of ethanolic extract of binahong (*Anredera cordifolia* (ten Steenis)). *Int J Pharm Sci Res.* 2012. 3(11):4254–59.
10. Yuliani SH, Fudholi A, Pramono S, Marchaban. Physical properties of wound healing gel of ethanolic extract of binahong (*Anredera cordifolia* (Ten Steenis) during storage. *Indones J Pharm.* 2012. 23(4):203–8.
11. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010. 89(3):219–9.
12. Jones SG, Edwards R, Thomas DW. Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immunoregulation of wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2004. 3(4):201–8.
13. Balls M, Goldberg AM, Fentem JH, Caren L, Burch RL, Festing MFW, et al. The Three Rs : The way forward the report and recommendations of ECVAM workshop 11. *ATLA.* 1995. 3:838–66.
14. Dhondt M. Optimisation and validation of an alternative mucosal irritation. [Disertation]. Nazareth. Faculty of Pharmacy. Ghent University. 2005. 7-12.
15. Luepke NP, Kemper FH. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. *Food Chem Toxicol.* 1986. 24(6/7):495–6.
16. Lin H-Y, Kuo S-C, Chao P-DL, Lin T-D. A new sapogenin from *boussingaultia gracilis*. *J Nat Prod.* 1988. 5(4):797–8.
17. Sukandar EY, Fidrianny I, Adiwibowo LF. Efficacy of ethanol extract of *Anredera cordifolia* (ten Steenis) Leaves on Improving Kidney Failure in Rats. *Int J Pharmacol.* 2011. 7(8):850–5.
18. Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H. Review Ursolic acid : An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol Nutr Food Reseach.* 2008. 52:26–42.
19. Lee H, Nam G, Kim S, Lee S. Phytocomponents of triterpenoids, oleanolic acid and ursolic acid , regulated differently the processing of epidermal keratinocytes via PPAR-a pathway. *Exp Dermatol.* 2006. (5):66–73.
20. Liu J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 1995. 49:57–68.
21. Yuliani SH. Uji penyembuh luka dan potensi iritasi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis). *J Ilmu Kefarmasian Indonesia.* 2013. 11(1):83–8.
22. Okan D, Student M, Woo K, Clinic WH, Ayello EA, Advisor S, et al. The role of moisture balance in wound healing. *Adv Ski Wound Care.* 2007. (January):39–53.
23. Boateng JS, Matthews K, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A Review. *J Pharm Sci.* 2008. 97(8):2892–923.