

## Uji Penyembuhan Luka dan Potensi Iritasi Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis)

### (Wound Healing Evaluation and Irritation Potency of Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) Ethanolic Extract)

SRI HARTATI YULIANI<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Pasca Sarjana, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Utara, Pongung, Sleman, Yogyakarta, 55281.

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Kampus III, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta.

Diterima 15 Juni 2012, Disetujui 7 Agustus 2012

**Abstrak:** Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai penyembuh luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas penyembuh luka dan potensi iritasi dari ekstrak etanol daun Binahong. Daun Binahong kering diblender dan diayak menggunakan ayakan no. 40. Serbuk kering daun binahong dimaserasi dengan 10 kali volume etanol 96% selama 90 menit dengan pengadukan 200 rpm. Hasil maserasi disaring dan dipekatkan hingga seperempatnya, kemudian dicampur homogen dengan basis gel masing-masing dengan kadar 2,5%; 5%; 10% dan 20%. Masing-masing gel diuji aktivitas penyembuhannya dengan metode *incision wound* pada mencit jantan galur swiss dengan berat 25 – 30 g. Mencit dikelompokkan menjadi 7 kelompok yang terdiri dari kontrol negatif, kontrol pembawa, kontrol positif (Bioplacenton®) dan 4 kelompok perlakuan. Potensi iritasi ekstrak diuji dengan metode *hen's egg tes – corioallantoic membrane* (HET-CAM). Kontrol positif untuk uji iritasi adalah asam laktat. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas penyembuhan luka tertinggi diperlihatkan oleh sampel dengan kadar ekstrak 5% dengan aktivitas penyembuhan luka sebesar 63,30%. Iritasi terjadi pada penggunaan kadar ekstrak etanol daun binahong 10% dan 20%.

**Kata kunci:** *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis, penyembuh luka, ekstrak etanol, potensi iritasi.

**Abstract:** Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) has been used as wound healing in traditional Indonesian medicine. The aim of this study was to examine the wound healing activity and irritation potency of ethanolic extract of *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis. Dry Binahong leaves were ground and screened with mesh no 40. Dry Binahong leaves were macerated with 10 times of volume of 96% ethanol for 90 minutes with constant agitation (200 rpm). It was screened and concentrated until the liquid would be a quarter. Then the extract was incorporated to gel base as 2,5%; 5%; 10% and 20%. Incision wound method was employed to activity test of wound healing. Male mice (strain Swiss), weight between 25 – 30 g, was used to this test. The male mice were classified into 7 groups i.e. negative control, control vehicle, positive control and 4 groups of sample. The extract then was assessed to irritation potency using HET-CAM method. Lactic acid was used as the positive control for irritation assessment. The result of this study stated that the highest activity of wound healing was shown by the sample containing 5% of ethanolic extract. The percentage activity of wound healing was 63,30%. Irritation appeared on the 10% and 20% ethanolic extract of binahong leaves.

**Keywords:** *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis, wound healing, ethanolic extract, irritation potency.

\* Penulis korespondensi, Hp.081328712851  
e-mail: sriharti.yuliani@gmail.com

## PENDAHULUAN

LUKA adalah hilangnya integritas kulit<sup>(1)</sup>. Fungsi utama kulit adalah sebagai organ pelindung terhadap lingkungan. Hilangnya integritas kulit dalam jumlah yang besar akan menimbulkan cedera atau nyeri yang mengakibatkan sakit atau bahkan kematian<sup>(2)</sup>. Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) merupakan gulma yang tidak mempunyai nilai ekonomi dan sangat sulit dikendalikan pertumbuhannya<sup>(3)</sup>. Namun demikian binahong telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai penyembuh luka. Binahong digunakan dengan cara meremas-remas daunnya dan meletakkannya pada luka.

Kandungan kimia tanaman binahong diantaranya *ethyl-3 $\beta$ -hydroxy-30-noroleana-12, 18-dien-29-oate*. Senyawa lain yang telah teridentifikasi terdapat dalam tanaman ini adalah *larreagenin A*, *3 $\beta$ -hydroxy-30-noroleana-12, 19-dien-28-oic acid* dan etil esternya, asam ursolat, dan *28-ethyl hydrogen 3 $\beta$ -hydroxyolean-12-ene-28, 29-dioate*<sup>(4)</sup>.

Asam ursolat dapat memperbaiki fungsi permeabilitas *barrier* kulit<sup>(5)</sup>. Asam ursolat menstimulasi keluarnya reseptor PPAR- $\alpha$  (*peroxisome proliferasi-activated receptor- $\alpha$* ), *involucrin*, *loricrin* dan *filaggrin*. Stimulasi PPAR- $\alpha$  ini kemudian menstimulasi diferensiasi epidermis yang merupakan fase formasi jaringan (fase kedua dari proses penyembuhan luka setelah fase inflamasi)<sup>(6)</sup>. Kandungan asam ursolat binahong diduga dapat menstimulasi keluarnya PPAR- $\alpha$  sehingga akan mempercepat proses penyembuhan luka dengan stimulasi diferensiasi epidermis. Karena binahong mengandung asam ursolat maka diduga ekstrak etanol daun binahong dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

Potensi iritasi ekstrak etanol daun binahong perlu dianalisis karena iritasi akan mengganggu proses penyembuhan luka. Iritasi merupakan fenomena inflamasi yang terjadi di kulit yang disebabkan oleh senyawa asing. Inflamasi merupakan fase pertama dalam proses penyembuhan luka, dan lama inflamasi memegang peranan penting dalam proses penyembuhan luka. Terjadinya inflamasi yang berlebihan pada jaringan kulit yang luka akan menghambat proses perbaikan jaringan<sup>(7)</sup>. Apabila ada senyawa yang mengiritasi kulit pada tempat luka, maka akan memperpanjang waktu pengeluaran *pro-inflammatory cytokines* (interleukin-1 dan TNF- $\alpha$ ). Ketika hal ini terjadi maka fase inflamasi akan diperpanjang yang berakibat meningkatnya level *Matrix Metalloproteases* (MMPs). MMPs merupakan famili protein yang mampu mendegradasi *Extracellular Matrix* (ECM). ECM merupakan bahan penting pada proses re-epiteliasi<sup>(8)</sup>.

Uji iritasi dilakukan dengan metode *hen's egg test chorioallantoic membrane* (HET-CAM). Metode ini dipilih karena mempunyai kelebihan yaitu a) merupakan metode uji yang tidak tergantung pada mekanisme inflamasi<sup>(9)</sup>; b) *Chorioallantoic membrane* (CAM) mempunyai arteri, vena dan kapiler sehingga respon CAM terhadap iritan mirip dengan pengujian pada mata kelinci (*Draize methods*)<sup>(10)</sup>; dan c) skor iritasi asam laktat (iritan) berdasarkan HET-CAM mempunyai hasil yang serupa dengan uji iritasi asam laktat pada kulit manusia. Yang lebih menarik adalah hasil uji iritasi sampel ekstrak tanaman dengan metode HET-CAM menunjukkan hasil serupa dengan uji iritasinya pada kulit manusia<sup>(9)</sup>. Dengan demikian metode ini cocok digunakan untuk bahan alam.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Simplisia daun binahong, etanol 96% (teknis), metanol (p.a.), *orthophosphoric acid* (p.a.), Kolom Eurospher 100 C18 fase balik, asam ursolat (Sigma), mencit jantan galur Swiss, telur ayam *leghorn*, ketamin, asam laktat (farmasetis), Bioplacenton<sup>®</sup>.

Alat. Maserator, alat bedah, HPLC Shimadzu.

**METODE.** **Ekstraksi kandungan aktif binahong.** Sepuluh gram daun binahong ditambah dengan 100 mL penyari etanol 96%, suhu dikendalikan 50°C menggunakan *waterbath* dengan pengadukan konstan 200 rpm selama 90 menit. Sari yang didapat dipisahkan dari ampasnya dan dipekatkan hingga volume tinggal 25% semula.

**Penetapan kadar kandungan aktif ekstrak etanol daun binahong.** Sistem HPLC yang digunakan adalah: fase diam kolom Eurospher 100 C18 fase balik (250 mm x 4,6 mm), fase gerak metanol: 1% (b/v) - larutan 1% *orthophosphoric acid* dalam air (90:10), kecepatan alir 0,6 mL/menit, volume injeksi 20  $\mu$ L, detektor UV pada panjang gelombang 210 nm.

Sampel ekstrak etanol daun binahong. Penyiapan sampel dilakukan dengan mengambil 10 mL ekstrak, dikeringkan di atas *waterbath* suhu 60°C. Ekstrak kering dilarutkan dalam 10 mL metanol kemudian disaring dengan menggunakan *millipore*. Sampel siap diinjeksikan.

Standar asam ursolat. Pembuatan larutan standar asam ursolat dengan pelarut etanol sehingga didapat konsentrasi akhir 100  $\mu$ g/mL (larutan stok). Kurva kalibrasi didapat dari 5 seri konsentrasi hasil pengenceran larutan stok tersebut.

**Uji aktivitas penyembuh luka.** Uji aktivitas penyembuh luka dilakukan dengan metode insisi<sup>(11,12,13)</sup>. Binatang percobaan mencit jantan galur Swiss, berat 25 - 30 g dikelompokkan menjadi 7 kelompok dengan

masing-masing kelompok menggunakan 3 ekor mencit, dengan kelompok satu kontrol negatif, kelompok 2 dengan perlakuan pembawa (1% Carbopol), kelompok 3 kontrol positif (Bioplacenton®), kelompok 4 – 7 menggunakan ekstrak daun binahong dengan 4 peringkat dosis (ekstrak 2,5%, ekstrak 5%, ekstrak 10% dan ekstrak 20% didalam pembawa yaitu 1% Carbopol).

Punggung mencit dicukur dan diolesi dengan depilatori. Setelah 48 jam ditimbang dan dikelompokkan secara random. Mencit dianestesi dengan ketamin, punggung mencit dibersihkan dengan etanol dan dilukai 1 cm melintang axis punggung mencit. Luka kemudian dijahit dengan benang operasi. Ekstrak diaplikasikan pada luka tiap 12 jam. Jumlah ekstrak/pembawa/kontrol positif yang diaplikasikan sebanyak 100 µL tiap mencit. Setelah 48 jam mencit dimatikan dengan pemberian eter, kulit diambil dan diukur *wound breaking strength* (WBS) dengan aplikasi gaya tertentu menggunakan metode tetesan air.

#### Uji iritasi ekstrak etanol daun binahong.

Uji iritasi ekstrak etanol daun binahong dilakukan dengan metode HET-CAM yang dimodifikasi oleh Wilson dan Steck (2000)<sup>(9)</sup>. Telur ayam *leghorn* dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37°C. Rongga udara telur dipastikan berada disebelah atas. Telur dirotasi selama 10 hari. Pada hari ke sepuluh telur diteropong, Telur yang tidak mengandung embrio hidup dibuang. Rongga udara telur ditandai. Telur kemudian ditimbang dan hanya telur dengan berat 50,0 – 60,0 g yang digunakan. Untuk setiap sampel digunakan 3 telur.

Sampel yang diujikan adalah ekstrak daun Binahong dengan kadar 2,5%, 5%, 10% dan 20% dengan pelarut air. Sebagai standar iritan digunakan asam laktat 45% dalam air. Asam laktat 45% selalu dibuat baru setiap hari.

Telur yang telah disiapkan pada langkah sebelumnya dipindahkan dari inkubator ke laminair air flow (LAF). Rongga telur yang telah ditandai, digunting cangkang terluarnya dengan menggunakan gunting steril. Untuk mempermudah proses ini membran terluar telur 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 *chorioallantoic membrane* (CAM) akibat proses tersebut.

Tiga buah telur dengan CAM baik, masing-masing ditetesi dengan 100 µL asam laktat 45%. Waktu

dihitung sejak CAM ditetesi dengan asam laktat, dan reaksi iritasi diamati selama 5 menit (300 detik). Pengamatan dilakukan dengan melihat waktu pertama terjadinya hemoragi, lisis, dan koagulasi.

Tiga buah telur dengan CAM baik ditetesi dengan 100 µL ekstrak. Waktu dihitung sejak CAM ditetesi dengan ekstrak. Reaksi iritasi diamati selama 5 menit (300 detik). Pengamatan dilakukan dengan melihat waktu pertama terjadinya hemoragi, lisis, dan koagulasi.

**Analisis Data Uji aktivitas.** Data yang didapat berupa kekuatan kulit yang luka (*wound breaking strength* = WBS)<sup>(14)</sup>.

$$\% \text{ aktivitas} = \frac{(\text{WBS uji} - \text{WBS kontrol})}{\text{WBS kontrol}}$$

**Analisis Data Uji iritasi (HET-CAM).** Data yang didapat adalah waktu pertama kali terjadinya hemoragi, lisis, dan koagulasi. Skor iritasi dihitung dengan mengikuti rumus<sup>(9)</sup>.

$$300[\text{IS}] = 5[301\text{-H}] + 7[301\text{-L}] + 9[301\text{-C}]$$

Keterangan: IS: skor iritasi, H: waktu mulainya terjadi reaksi hemoragi pada CAM, L: waktu mulainya terjadi lisis pembuluh darah pada CAM, C: waktu mulai terjadinya koagulasi pada CAM.

**Tabel 1. Kriteria iritasi berdasarkan nilai skor iritasi menurut Luepke dan Kalweit<sup>(15)</sup>.**

Skor iritasi HET-CAM	Kategori iritasi
≤ 0,9	Tidak mengiritasi
1,0 – 4,9	Iritan lemah
5,0 – 8,9	Iritan moderat
9,0 – 21	Iritan kuat

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan aktif ekstrak etanol daun binahong diukur berdasarkan kadar asam ursolat. Kadar asam ursolat dalam ekstrak adalah 0,1430±0,0032 g/L. Asam ursolat digunakan sebagai dasar perhitungan kandungan aktif ekstrak etanol daun binahong karena asam ursolat berperan dalam memacu proses remodeling kulit pada penyembuhan luka.

Uji aktivitas penyembuh luka dilakukan secara *in vivo* dengan metode insisi. Uji aktifitas dilakukan secara *in vivo* karena proses penyembuhan luka merupakan proses yang kompleks dimana setiap tahapannya belum sepenuhnya diketahui. Selain itu, ekstrak banyak sekali mengandung senyawa-senyawa yang kemungkinan mempengaruhi/berpotensi sebagai senyawa aktif dalam penyembuhan luka dan belum diketahui mekanismenya.

Secara alami luka akan sembuh dengan sendirinya. Suatu senyawa mempunyai potensi sebagai agen

penyembuh luka apabila senyawa tersebut dapat mempercepat proses penyembuhan luka. *Wound Breaking Strength* (WBS) digunakan sebagai parameter untuk menilai potensi penyembuhan luka suatu senyawa. Semakin besar nilai WBS suatu senyawa maka semakin cepat senyawa tersebut menyembuhkan luka apabila dibandingkan dengan luka tanpa pengobatan. Oleh karena itu digunakan kontrol negatif. Kontrol negatif pada percobaan ini adalah hewan uji tidak diberi perlakuan apapun.

Hasil pengukuran WBS (Tabel 2) menunjukkan bahwa nilai WBS kontrol pembawa adalah nol, hal ini berarti bahwa antara kontrol pembawa dan kontrol negatif pada kulit mencit mempunyai kekuatan yang sama. Sampel uji dengan ekstrak daun binahong kadar 2,5% memberikan nilai WBS sama dengan WBS kontrol positif. Sampel uji dengan ekstrak daun binahong kadar 5% memberikan nilai WBS yang paling besar dibandingkan yang lain. Selanjutnya sampel uji dengan ekstrak daun binahong kadar 10% dan 20% menunjukkan nilai WBS yang jauh lebih kecil di bandingkan kontrol positif.

Sampel uji dengan ekstrak etanol daun binahong kadar 10% dan 20% mempunyai aktivitas penyembuh luka yang lebih kecil dibandingkan sampel uji dengan ekstrak etanol daun binahong berkadar lebih kecil (2,5% dan 5%). Hal ini diduga terkait dengan potensi iritasi sampel, yaitu sampai kadar 5% ekstrak tidak mempunyai sifat iritasi. Kemudian dengan semakin meningkatnya kadar ekstrak, nilai skor iritasi semakin besar. Hal tersebut dapat menjelaskan kadar ekstrak daun binahong 10% dan 20% memiliki nilai WBS lebih kecil dibandingkan nilai WBS sampel uji dengan kadar ekstrak etanol daun binahong 2,5 dan 5% (Tabel 2). Ekstrak 10% dan 20% mengiritasi kulit binatang percobaan, dengan kata lain inflamasi yang terjadi bertambah hebat karena aplikasi ekstrak etanol daun binahong 10% dan 20%. Inflamasi yang berlebihan akan memperlambat pengeluaran *pro-inflammatory*

*cytokines*, yang pada akhirnya akan mendegradasi ECM yang berperan dalam proses re-epitelisasi<sup>(8)</sup>. Sifat iritasi ekstrak etanol daun binahong 10% dan 20% yang mengakibatkannya mempunyai nilai WBS lebih kecil dari ekstrak etanol daun binahong 5% maupun 2,5% bahkan dari kontrol positif.

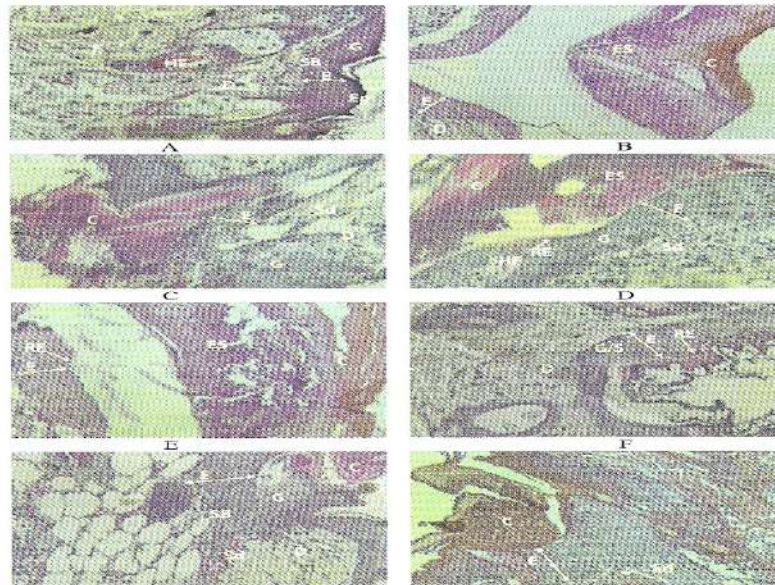
Uji histopatologi memperkuat diskusi pada paragraf di atas. Mencit dimatikan pada hari ke-2, pada proses penyembuhan normal hari ke-2 merupakan fase inflamasi. Ciri khas dari fase inflamasi adalah infiltrasi neutrofil, makrofag dan limfosit sehingga pada uji histopatologi akan terlihat adanya *eschar*; *clot*. Seperti disebutkan di atas bahwa senyawa penyembuh luka akan mempercepat proses penyembuhan luka. Hasil uji histopatologi dikatakan telah terjadi percepatan penyembuhan luka jika menunjukkan ciri fase proliferasi atau bahkan fase *remodeling* (pemodelan kembali) pada hari ke-2.

Susunan kulit mencit sehat tampak pada Gambar 1a. Tampak adanya *stratum basale*, jaringan granulasi, *stratum corneum* (lapisan epitelium), dermis, folikel rambut dan lapisan lemak. Fase inflamasi diperlihatkan oleh kulit mencit dengan perlakuan kontrol negatif, kontrol pembawa (basis gel), 10% dan 20% ekstrak etanol daun binahong dalam pembawa. Hasil uji histopatologi kontrol negatif memperlihatkan adanya *eschar* (ES) dan *clot* (C) yang mulai terlepas tetapi belum terlihat adanya epitelium baru pada lapisan paling luar epidermis (Gambar 1b). *Clot* yang masih menempel pada daerah luka tampak pada hasil uji histopatologi kontrol pembawa. Sel darah nampak menuju area luka untuk membentuk sistem pertahanan. Hal tersebut mengindikasikan proses penyembuhan luka masih berada pada tahap inflamasi (Gambar 1c). Kulit mencit dengan perlakuan ekstrak etanol daun binahong 10% dalam pembawa memperlihatkan *stratum basale* (SB) mulai bergerak ke atas membentuk jaringan granulasi, masih terdapat *clot*

Tabel 2. Hasil pengukuran *wound breaking strength* dan skor iritasi ekstrak etanol daun binahong.

Kadar ekstrak	<i>Wound breaking strength</i> (%)	Uji iritasi	
		Skor iritasi	Keterangan
Kontrol negatif	-	0	Tidak mengiritasi
Pembawa	0	-	Tidak dilakukan
Kadar 2,5%	30,91±1,05	0	Tidak mengiritasi
Kadar 5%	63,30±2,77	0,18±0,45	Tidak mengiritasi
Kadar 10%	6,44±2,04	2,51±0,42	Iritan lemah
Kadar 20%	6,02±1,38	3,43±1,09	Iritan lemah
Kontrol positif	27,01±1,81	9,83±0,47	Iritan kuat

Keterangan: Kontrol positif pada uji insisi (WBS) adalah gel Bioplacenton<sup>®</sup>, sedangkan pada uji iritasi (skor iritasi) adalah asam laktat 45%.



**Gambar 1.** Penampang melintang kulit mencit dengan perlakuan a) kulit mencit sehat, b) kontrol negatif, c) pembawa, d) kontrol positif, e) 2,5% ekstrak dalam basis gel, f) 5% ekstrak dalam basis gel, g) 10% ekstrak dalam basis gel dan h) 20% ekstrak dalam basis gel. C=clot, ES=eschar, G=granulation tissue, HF=folikel rambut, RE=epitelium baru, G/S= fase awal jaringan parut, SB=stratum basale, F=fatty acid, E=epidermis, D=dermis, Sd=sel darah, Ep=lapisan epitelium.

yang masih menempel pada kulit luka (Gambar 1g). Masih nampak adanya sel darah pada lapisan dermis. Proses penyembuhan luka masih berada pada fase inflamasi. Demikian juga dengan kulit mencit dengan perlakuan ekstrak etanol daun binahong 20%, masih tampak adanya *clot* yang masih menempel, *stratum basale* (SB) yang mulai bergerak naik membentuk jaringan granulasi dan sedikit terlihat sel darah (Gambar 1h).

Hasil uji histopatologi kontrol positif dan pembawa dengan kadar ekstrak etanol daun binahong 2,5% berada pada fase awal formasi jaringan. Kedua perlakuan ini masih memperlihatkan adanya *eschar* dan *clot*, tetapi mulai nampak adanya lapisan epitelium baru (RE) walaupun masih sedikit. Mulai adanya lapisan epitelium ini memperlihatkan bahwa keduanya masuk pada fase awal formasi jaringan. Apabila dibandingkan dengan kontrol negatif maka kedua perlakuan ini mempercepat proses penyembuhan luka.

Perlakuan ekstrak etanol daun binahong kadar 5% mempercepat proses penyembuhan luka. Kulit mencit dengan perlakuan ekstrak etanol daun binahong 5% memperlihatkan adanya lapisan epitelium baru dan jaringan parut pada fase awal (G/S) (Gambar 1f). Mulai munculnya jaringan parut menunjukkan proses penyembuhan luka

memasuki tahap akhir fase formasi jaringan. Proses penyembuhan luka lebih cepat terjadi pada ekstrak etanol daun binahong 5% dibandingkan kontrol positif, mencit dengan perlakuan kontrol positif memasuki awal fase formasi jaringan sedangkan mencit dengan perlakuan ekstrak etanol daun binahong 5% sudah memasuki akhir fase formasi jaringan.

## SIMPULAN

Kadar ekstrak etanol daun binahong sebesar 5% memberikan aktifitas penyembuh luka terbesar dengan nilai WBS 63,30%. Penggunaan kadar ekstrak etanol daun binahong 10% mulai menunjukkan gejala iritasi (skor iritasi 2,51%, iritan lemah), dan memberikan nilai WBS 6,44%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Drh. Reny Kusumastuti, M.Si., Ph.D. yang telah memperkenalkan dan mengajarkan metode HET-CAM.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Mallefet P and Dweck AC. Mechanism of wound healing examined. *Personal Care*. 2008. 75-83.

2. Singer AJ, Richard AF, Clark MD. Cutaneous wound healing : Mechanisms of Disease. N Engl J Med. 1999. 738-45.
3. Starr F, Starr K, Loope L. Plants of Hawaii-*Anredera cordifolia*, Halekala Field Station, Mawi, Hawaii, 2003. diambil dari: URL:<http://www.hear.org/starr/hiplants/reports/html/anrederacordifolia.htm>.
4. Lin H, Kuo S, Chao PL, Lin T. A new sapogenin from *Boussingaultia gracilis*. Journal of Natural Products. 1988. 51(4):797-8.
5. Lee HK, Nam GW, Kim SH, Lee SH. Phytocomponents of triterpenoids, oleanolic acid and ursolic acid, regulated differently the processing of epidermal keratinocytes via PPAR- $\alpha$  pathway. Exp Dermatol. 2006. 15:66-73.
6. Lim SK, Hong SP, Jeong SW, Kim B, Bak H, Ryoo HC, Lee SH, Ahn SK. Simultaneous effect of ursolic acid and oleanolic acid on epidermal permeability barrier function and epidermal keratinocyte differentiation via peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . J Dermatol. 2007. 34:625-34.
7. Guo S and DiPietro LA. Factors affecting wound healing. J Dent Res. 2010. 89(3):219-29.
8. Jones SG, Edwards R, Thomas DW. Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immunoregulation of wound healing. Lower Extremity Wounds. 2004. 3(4):201-8.
9. Wilson TD and Steck WF. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. Food Chem. Toxicol. 2000. 38:867-72.
10. Cazedey ECL, Carvalho FC, Fiorentino FAM, Gremiao MPD, Salgado HRN. Corositex<sup>®</sup>, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. Braz. J. Pharm. Sci. 2009. 45(4):759-66.
11. Emami-Razavi SH, Esmaeili N, Forouzannia SK, Amanpour S, Rabbani R, Alizadeh AM, et al. Effect of bentonite on skin wound healing: experimental study in rat model. Acta Med. Iran. 2006. 44(4):235-40.
12. Puratchikody A and Nagalakshmi G. Wound healing activity of *Memecylon umbellatum* Burm. J. Plant Sci. 2007. 2(2):179-86.
13. Srikanth D, Shenoy RR, Rao CM. The effect of topical (gel) astemizole and terfenadine on wound healing. Indian J. Pharmacol. 2008. 40(4):140-4.
14. Moura-Letts G, Villegas LF, Marcalo A, Vaisberg AJ, Hammond GB. In vivo wound healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*. J. Nat. Prod. 2006. 69:978-9
15. National Institute of Health Publication. Current status of in vitro test methods for identifying ocular corrosive and severe irritants: Hen's egg test - chorioallantoic membran test methods. 2006. diambil dari: URL:[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocudocs/ocu\\_brd.htm#Hetcam](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocudocs/ocu_brd.htm#Hetcam).