



Non-aromatic compounds of *Centella asiatica* methanolic extract and analysis of their pharmacology network on burn wounds

Rizki Awaluddin^{1*}, Rafli M. Mustaqim¹, Dayar Arbain¹, Farida Hayati², Siti Khaerunnisa³

¹Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta Utara, Indonesia.

²Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta, Indonesia.

³ Departemen Ilmu Faal dan Biokimia Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Submitted 20 October 2023; Revised 22 December 2023; Accepted 26 December 2023; Published 07 June 2024

*Corresponding author: awaluddinrizki@gmail.com

Abstract

Physical changes after burns reduce the skin function, quality of life, and aesthetics of the skin. The *Centella asiatica* reported contain triterpenoids to enhance burn wound healing. However, the polarity of its triterpenoids is similar to the presence of chlorophyll and other compounds in the extract and difficult to be separated. The aim of this study is to explore a new method for extracting non-aromatic triterpenoids using activated carbon, and then network pharmacology studies were carried out *in silico* to study protein-protein and compound-protein interactions related to burn wounds. *Centella asiatica* was macerated with methanol, filtered, then treated with activated carbon until the green color disappeared then evaporated to yield a white powder. This powder was chromatographed on silica gel plate with anisaldehyde-sulfuric acid reagent together with standards compounds. The results showed that the presence of asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid as major components in the purified extract. The results showed that presence of asiaticoside, asiatic acid and madecassic acid as major constituents in the purified extract. Non-aromatic compounds play a role in accelerating the healing of burn wounds by influencing the proteins of enzyme, cytokine, and hormones.

Keywords: Activated-carbon, Burn wound, *Centella asiatica*, Purified extract, Triterpenoid

Senyawa Non-aromatik dari ekstrak metanol Herba *Centella asiatica* dan Analisis Farmakologi Jejaring pada Luka Bakar

Abstrak

Perubahan fisik pasca luka bakar dapat menurunkan fungsi, kualitas hidup, dan estetika kulit. Herba pegagan (*Centella asiatica*) dilaporkan mengandung berbagai senyawa triterpenoid yang mempercepat luka bakar. Namun, polaritas senyawa triterpenoid yang polar identik dengan keberadaan klorofil dan senyawa lainnya yang sulit dipisahkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi metode baru pada ekstraksi herba pegagan menggunakan karbon aktif serja kajian farmakologi jejaring dilakukan secara *in silico* untuk mengkaji interaksi protein-protein dan senyawa-protein yang berkaitan dengan luka bakar. Herba pegagan dimaserasi dengan metanol, difiltrasi kemudian diberikan karbon aktif hingga warna hijau memudar, kemudian dievaporasi hingga didapatkan ekstrak berwarna kekuningan. Ekstrak dikarakterisasi menggunakan KLT dengan reagen anisaldehyd-asam sulfat bersama dengan standar senyawa triterpenoid. Hasil skrining fitokimia menunjukkan keberadaan asiaticoside, *asiatic acid*, dan *madecassic acid* pada ekstrak terpurifikasi. Senyawa non aromatik berperan dalam mempercepat kesembuhan luka bakar dengan mempengaruhi protein enzim, sitokin dan hormon.

Kata Kunci: Karbon aktif, Luka bakar, *Centella asiatica*, Ekstrak terpurifikasi, Triterpen

1. Pendahuluan

Di Indonesia pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa pada tahun 2013-2015 di RSCM Jakarta terdapat peningkatan kematian dari 14.43% menjadi 27.77% kematian akibat luka bakar.¹ Luka bakar dikaitkan dengan trauma psikologis dan permasalahan fisik seperti *contractures*, *hypertrophic scars*, *muscle wasting*, *keloid*, *pain*, *itching*, *depression*, and *anxiety*. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa 1-15% penderita pasca luka bakar kesulitan bekerja.² Selain itu, perubahan fisik pasca luka akibat lama penyembuhan/regenerasi luka dan terbentuknya scar menjadi penyebab rendahnya kualitas hidup pasien.^{3,4}

Centella asiatica atau pegagan telah banyak yang melaporkan terkait aktivitas regenerasi sel dan perbaikan pasca luka. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pasien dengan ulkus kronis dapat mempercepat penyembuhan luka pada 2 pekan setelah pemberian 1% krim ekstrak *Centella asiatica*.⁵ Pada penelitian yang lain, dilaporkan bahwa tikus jantan sparague-dawley yang diinduksi luka bakar dan diberikan ekstrak metanol *Centella asiatica* 10% secara signifikan meningkatkan penyembuhan luka sebesar 60.31%.⁶ Penelitian menggunakan mencit ICR jantan yang diinduksi luka bakar *full-thickness burn* (luka bakar derajat-3) menguji empat senyawa triterpenoid; terlihat *madecassic acid* yang menunjukkan penyembuhan luka yang signifikan secara *in vitro* dan *in vivo*.⁷ Pemberian *asiaticoside* dosis rendah (10 pg/ml) dapat menstimulasi VEGF dan meningkatkan jumlah keratinosit.⁸ Pemberian *asiatic acid* dapat ditoleransi oleh sel fibroblast dan dapat mempengaruhi TGF- β yang berkaitan erat dengan keloid pada luka bakar.^{9,10} Penelitian lain melaporkan bahwa kandungan *asiaticoside* dapat mempercepat penyembuhan luka dalam waktu 21 hari.⁷ Disamping triterpenoid tersebut, pada herba pegagan ini juga ditemukan senyawa bioaktif lain yang berperan dalam penyembuhan luka seperti β -sitosterol.^{11,12} Selain itu, senyawa asam ursolik dilaporkan dapat meningkatkan kerja enzim-enzim *hyaluronidase*, *collagenase*, dan *elastase* untuk penyembuhan

luka.¹³ Bahkan, Herba Pegagan telah dibuat dalam bentuk sediaan salep madecassol yang mengandung ekstrak *Centella asiatica* 1%.¹⁴

Hasil ekstraksi konvensional dilaporkan mengandung klorofil 57 mg/g berat simplisia kering, yang minim aktivitas farmakologi dan sulit untuk dipisahkan meskipun dilakukan fraksinasi terutama menggunakan fraksi semipolar dan fraksi polar.¹⁵ Penelitian sebelumnya juga telah melakukan fraksinasi ekstrak etanol, dengan kloroform tapi tetap menghasilkan fraksi yang mengandung klorofil. Adanya kandungan klorofil dalam fraksi memungkinkan mempengaruhi efikasi dan kelarutan fraksi.¹⁶ Banyak penelitian yang telah melaporkan triterpenoid *Centella asiatica* tapi masih sangat terbatas upaya untuk menghasilkan bahan baku triterpenoid secara efisien.

Penggunaan karbon aktif (*activated charcoal*) banyak digunakan sebagai adsorben dalam cecair atau limbah untuk menyerap senyawa aromatik. Metode ini telah dicoba dimanfaatkan untuk memisahkan senyawa non-aromatik pada ekstraksi herba *Centella asiatica* seperti *asiatic acid*, *madecassic acid*, *asiaticoside*, *madecassoside*, *ursolic acid*, *maslinic acid*, dan *corosolic acid*.¹⁷ Pada sisi lain, mekanisme penyembuhan luka bakar melibatkan banyak ekspresi gen yang masih menimbulkan kontroversi terkait mekanisme aksi dan target protein yang potensial. Banyak penelitian yang melaporkan aktivitas triterpenoid menghambat TGF- β , IL-1, IL-6 dan TNF- α padahal hormon dan sitokin tersebut merupakan kunci proses penyembuhan luka.^{18,19} Namun, paradigma penemuan obat tidak hanya ‘one target, one drug’ karena kondisi patologis melibatkan banyak protein.²⁰ Bahkan, penelitian sebelumnya melaporkan bahwa sebagian senyawa bahan alam memiliki efek sinergistik dan sisanya antagonis yang keduanya tidak dapat disimpulkan hanya melalui satu pendekatan.²¹ Oleh karena itu dibutuhkan kajian pendahuluan yang komprehensif menggunakan pendekatan multitarget melalui identifikasi interaksi antara senyawa dan protein guna menyimpulkan mekanisme aksi senyawa bahan alam. Penelitian ini berfokus

pada kajian fitokimia senyawa non-aromatik beserta analisa farmakologi jejaring pada luka bakar.

2. Metode

2.1. Alat

Neraca analitik (Ohaus), *Magnetic stirrer & heater* (Ika C-Mag HS7), *rotary evaporator* (BUCHI), alat gelas (Pyrex). Studi farmakologi jejaring menggunakan perangkat keras berupa laptop dengan spesifikasi model sistem: ASUS dengan *Processor* Intel(R) Core(TM) i3-3217U CPU1.80Ghz (4 CPUs) ~1.8Ghz; *Random Acces Memory* (RAM) 2 *Gigabyte*; *Windows* 8.0. Perangkat lunak yang digunakan untuk analisa farmakologi jejaring yakni *MarvinSketch* versi 16.8.1 (*ChemAxon*), *Cytoscape* versi 3.10.1. Adapun database berbasis website yang digunakan yakni PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); STRING (<https://string-db.org/>) yang didukung oleh *Swiss Institute of Bioinformatics*, *Novo Nordisk Foundation Center Protein Research*, dan *European Molecular Biology Laboratory*; DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>); *Open Target* (<https://platform.opentargets.org/>); *SwissTargetPrediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) yang didukung oleh *Swiss Institute of Bioinformatics*.

2.2. Bahan

Simplisia Serbuk *Centella asiatica* (PT. Merapi Farma, Yogyakarta), plat KLT (Merck), Karbon Aktif (Sigma-Aldrich C9157-500G), *Asiaticoside* (Sigma-Aldrich 43191-5MG-F), *Asiatic Acid* (ACE Biolabs CAS.464-92-6) dan *Madecassic acid* (isolat yang didapatkan dari Prof. apt. Dayar Arbain, Ph.D). Pelarut *analytical grade* yakni Metanol 96% (Merck), Kloroform (Merck), Asam Asetat Anhidrat (Merck), Asam Asetat glasial (Merck), p-anisaldehyd (Merck), Asam Sulfat (Merck) dan akuades.

2.3. Prosedur

2.3.1. Preparasi Ekstrak Terpurifikasi Herba *Centella asiatica*

Sebanyak 1 Kg simplisia serbuk *Centella asiatica* dimaserasi dengan metanol

96% sebanyak 3 liter selama 48 jam dengan empat kali remaserasi. Setelah itu, maserat ditambahkan dengan karbon aktif kedalam maserat kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan skala 2 selama 25 menit pada suhu $28 \pm 2^\circ\text{C}$ hingga warna hijau memudar atau menjadi jernih. Campuran tersebut didiamkan selama 10 menit dan dilakukan filtrasi menggunakan kertas saring. Supernatan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

2.3.2. Identifikasi Fitokimia Senyawa Golongan Triterpenoid

Disiapkan sampel berupa maserat ekstrak metanol herba *Centella asiatica*, ekstrak terpurifikasi herba *Centella asiatica*, standar *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* 0.1%. Sampel ditotolkan pada plat KLT 3x10 cm dengan batas bawah 2 cm dan batas atas 1 cm dan di elusi menggunakan fase gerak kloroform: asam asetat glasial: metanol: akuades (60:32:12:8 v/v). Adapun identifikasi adanya senyawa *asiatic acid* dan *madecassic acid* dilakukan dengan menotolkan maserat, ekstrak terpurifikasi, *asiatic acid* dan *madecassic acid* pada plat KLT 4x10 cm dengan batas bawah 2 cm dan batas atas 1 cm. Elusi dilakukan menggunakan fase gerak kloroform: asam asetat glasial: metanol (95:7.5:2.5 v/v). Plat KLT hasil elusi dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada udara terbuka, kemudian salah satu plat disemprot menggunakan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat dan dipanaskan pada suhu 100°C menggunakan *hot plate* selama 10 menit atau hingga terjadi perubahan warna pada area elusi sampel. Bercak yang muncul diidentifikasi perubahan warnanya dan dihitung nilai R_f ketiga sampel diatas pada sinar tampak atau cahaya visibel.²²

2.3.3. Preparasi senyawa non-aromatik dan protein target yang terkait

Senyawa non-aromatik yang dipilih yaitu senyawa yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya dan tidak mengandung gugus aromatik, yaitu *asiatic acid*, *madecassic acid*, *asiaticoside*, *madecassoside*, *ursolic acid*, *maslinic acid* dan *corosolic acid*.^{23,24,25}

Struktur 2D senyawa direkonstruksi menggunakan Marvin Sketch versi 16.8.1 (Gambar 1.).²⁶

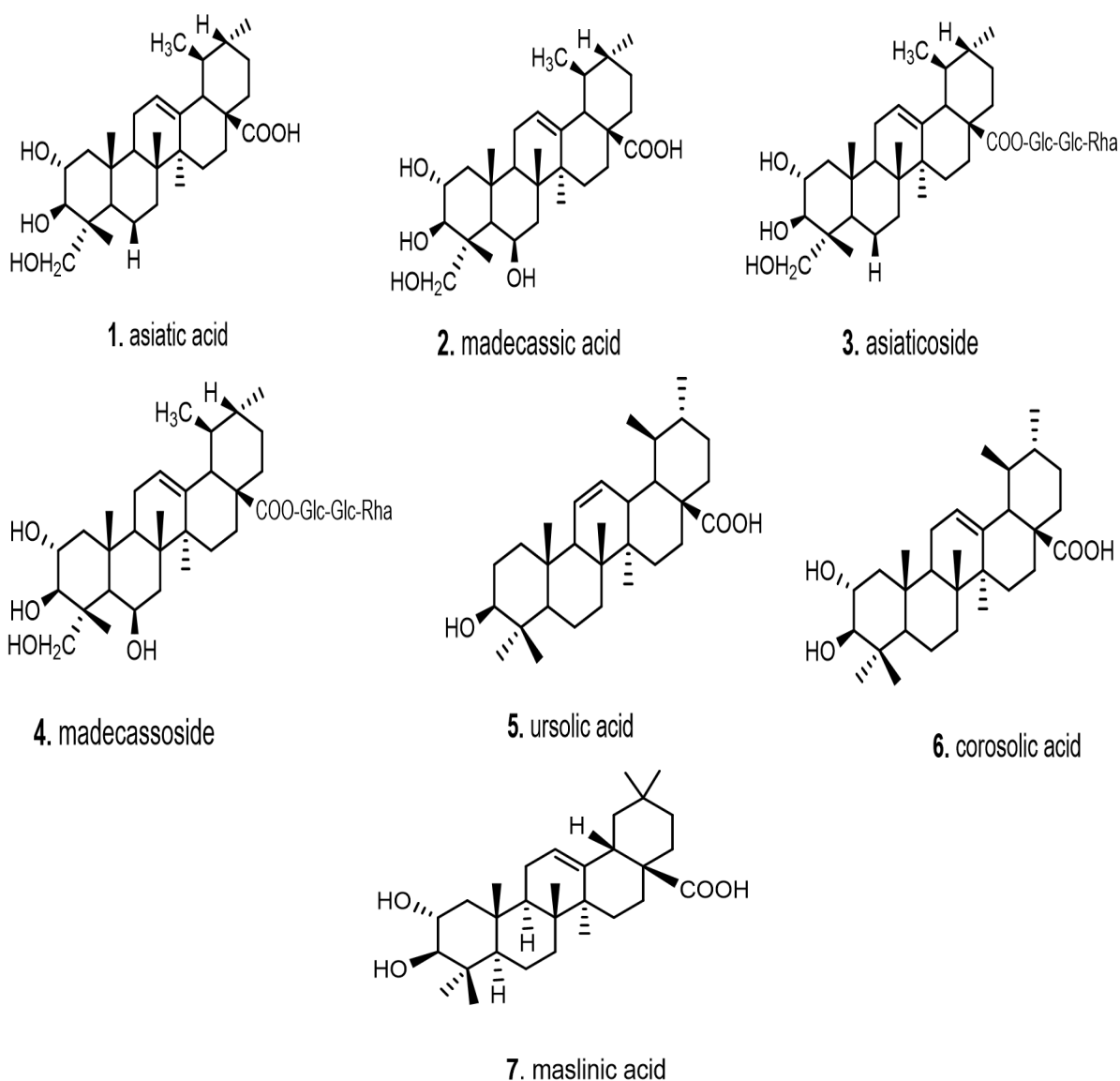
Protein target yang terkait senyawa diperoleh dari *Comparative Toxicogenomics Database* (<https://ctdbase.org/>) yang didukung oleh *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS), dan *SwissTargetPrediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) yang didukung oleh *Swiss Institute of Bioinformatics*. Data gene interactions disimpan dalam format excel (.xls). Data protein dari masing-masing senyawa dikumpulkan, digabung, dan dihapus apabila terdapat duplikasi.²⁷

2.3.4. Pengumpulan Protein Target terkait Luka Bakar

Protein target yang terkait dengan luka bakar diperoleh dengan memasukkan kata kunci “burn” dan “burn scar” pada basis data DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) dan Open Target (<https://platform.opentargets.org/>). Protein target yang dikumpulkan dari kedua basis data (database) digabungkan dan dihapus apabila terdapat duplikasi.²⁸ Daftar protein tersebut dibuat jejaring pada laman STRING (<https://string-db.org/>) dan disimpan dalam format *Tab-Separated Values* (.tsv) untuk tahap selanjutnya.

2.3.5. Pembuatan farmakologi jejaring dan analisa interaksi protein-protein

Dokumen daftar protein (.tsv) dibuka dan dianalisa menggunakan *Cytoscape* versi 3.10.1 kemudian dilakukan filter berdasarkan



Gambar 1. Struktur senyawa non-aromatik yang terdapat pada *Centella asiatica*.^{23,29}

“degree centrality (DC)” (10 – 82) dan “betweenness centrality (BC)” (0.01 - 0.216). Klasterisasi dilakukan dengan menggunakan ClusterONE dengan *minimum size* 10 dan *minimum density* 0.5. Visualisasi proses biologis (*gene ontology*) dilakukan dengan Golorize berdasarkan proses biologis yang relevan.²⁸

2.3.6. Analisa jejaring interaksi senyawa pada protein

Protein hasil klasterisasi dan protein terkait senyawa dielaborasi dan dianalisa protein yang menjadi bagian dari irisan dari kedua data tersebut, kemudian ditampilkan melalui diagram venn. Jejaring mode aksi dibuat dengan #*node1* adalah senyawa non-aromatik dan *node2* adalah protein yang menjadi irisan pada diagram venn serta *combined score* ditetapkan dengan nilai 0,7. Dokumen tersebut disimpan dengan format excel (.xls) dan dianalisa jejaring menggunakan Cytoscape versi 3.10.1. Mode aksi suatu senyawa ditentukan berdasarkan pada data *gene interaction* yang terdapat di *Comparative Toxicogenomics Database* (<https://ctdbase.org/>) dan dielaborasi berdasarkan referensi yang relevan.²⁷

3. Hasil

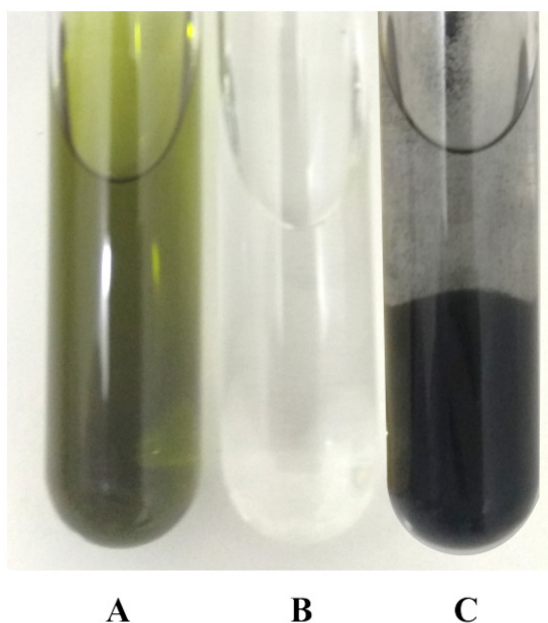
Berdasarkan hasil purifikasi metanol

herba *Centella asiatica* ekstrak, didapatkan bahwa maserat yang semula berwarna hijau atau hijau gelap (Gambar 2A) berubah menjadi tak berwarna hingga kuning jernih (Gambar 2B). Karbon aktif berwarna hitam sehingga menghasilkan maserat kehitaman disertai dengan endapan hitam pada dasar tabung sebelum difiltrasi (Gambar 2C). Adapun setelah evaporasi didapatkan ekstrak dengan konsistensi kental berwarna kuning.

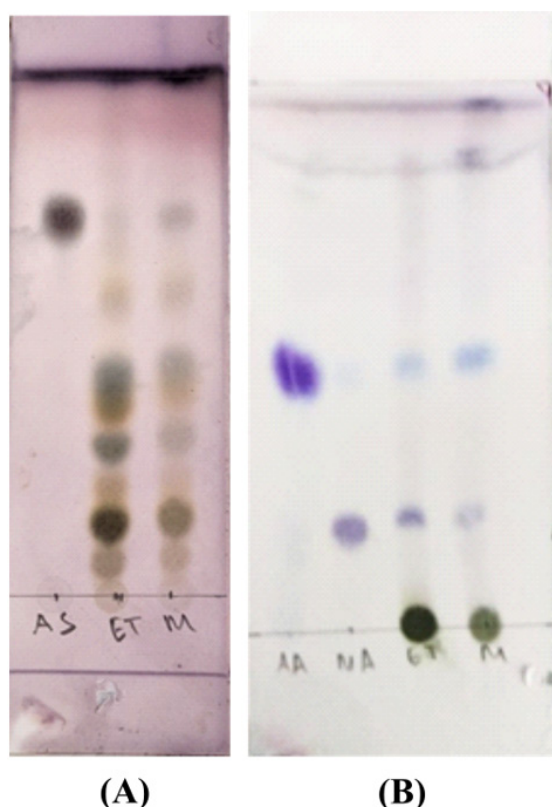
3.1. Identifikasi Fitokimia Senyawa Golongan Triterpenoid

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa *asiaticoside*, *asiatic acid*, dan *madecassoside* pada ekstrak terpurifikasi. Berdasarkan hasil elusi menggunakan KLT ditunjukkan bahwa ekstrak terpurifikasi mengandung *asiaticoside* pada Rf 0.73 (Tabel 1.) dengan warna violet atau ungu tua (Gambar 3A.). Selain itu, pada ekstrak terpurifikasi juga terdapat bercak-bercak lain dengan warna kuning dan hijau muda dengan nilai Rf yang identik pada sampel maserat setelah disemprot dengan reagen anisaldehyd-asam sulfat (Tabel 1).

Hasil elusi *asiatic acid*, dan *madecassic acid*, ekstrak terpurifikasi, dan maserat pada menggunakan KLT pada Gambar 3B, terlihat bahwa ekstrak terpurifikasi mengandung *asiatic acid* pada Rf 0.49 dengan bercak yang



Gambar 2. Hasil purifikasi ekstrak metanol Herba Pegagan (*Centella asiatica*). Maserat(A); maserat terpurifikasi setelah difiltrasi (B); maserat setelah pemberian karbon aktif (C).



Gambar 3. Profil fitokimia KLT asiatic acid (AA), dan madecassic acid (MA), ekstrak terpurifikasi (ET), maserat (M) dan asiaticoside (AS) setelah diberikan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat.

berwarna biru keunguan. Ekstrak terpurifikasi juga mengandung *madecassic acid* pada nilai Rf 0.21 dengan bercak berwarna ungu atau violet (Tabel 1). Ekstrak terpurifikasi dan maserat masih terdapat bercak lain berwarna hijau gelap setelah disemprot dengan reagen anisaldehyd-asam sulfat (Gambar 3B).

3.2. Jejaring interaksi protein-protein

Identifikasi interaksi protein-protein ini bertujuan untuk menentukan kluster protein yang paling berpengaruh dan proses biologis yang terjadi pada luka bakar. Hasil analisa menunjukkan bahwa dari 382 *node* protein

didapatkan 51 *node* protein dengan *degree* (10 - 82) dan *betweenness centrality* (0.01 – 0.216). Hasil klusterisasi menggunakan metode *ClusterONE* didapatkan 32 *node* protein yakni IL1 β , MMP1, IL-2, IRF4, KITLG, ICAM1, MAPK8, IL-1 α , COL1A1, TGF- β 1, TNF, XDH, TP53, CSF3R, IL-6, NR3C1, PTGS2, VCAM1, CD4, TJP1, IL-10, FGF-2, IL-4, MMP8, PLG, MMP-14, MMP13, NF κ B1, SOD2, NOX-4, PPAR- α , dan IFNG γ (Gambar 4). Selain itu, hasil analisa interaksi protein-protein pada Gambar 5A, menunjukkan bahwa protein TP53, IL1B dan SOD2 memiliki *degree centrality* yang

Tabel 1. Nilai Rf bercak sampel pada KLT setelah disemprot anisaldehyd-asam sulfat

Sampel	Plat A (Gambar 2A)	Plat B (Gambar 2B)
	Kloroform:asam asetat:metanol:air (80:32:12:8)	Kloroform: asam asetat: metanol (95:7.5:2.5)
Asiatic acid (AA)	-	0.50
Madecassic acid (MA)	-	0.21
Asiaticoside (AS)	0.74	-
Ekstrak terpurifikasi (ET)	0.73; 0.57; 0.43; 0.53; 0.30; 0.21; 0.16; 0.09	0.49; 0.21; 0.01
Maserat (M)	0.74; 0.60; 0.44; 0.31; 0.17; 0.09	0.87; 0.51; 0.21; 0.01

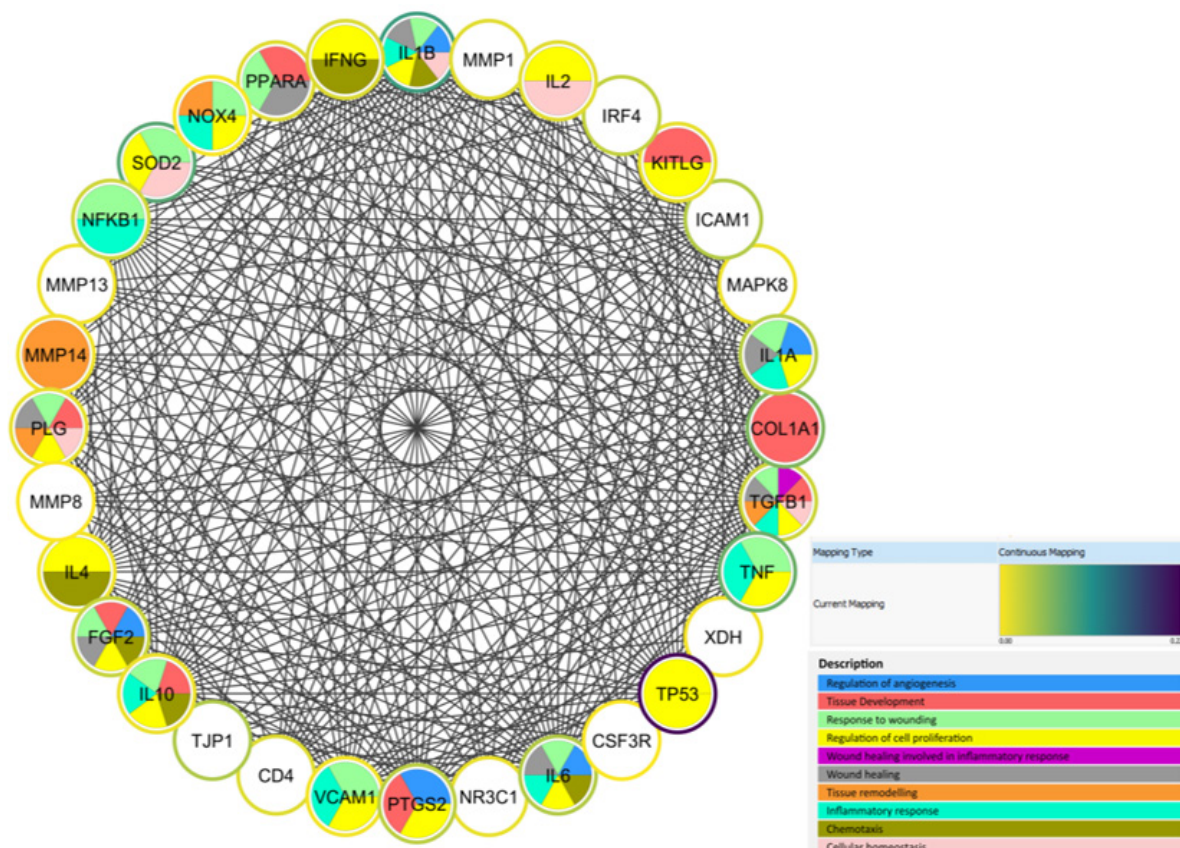
dominan (*continuous mapping* mendekati 0.22) dibandingkan dengan protein lainnya. Protein yang terlibat pada proses inflamasi yakni IL-1 β , IL-1 α , TGF-1 β , TNF, IL-6, VCAM, IL10, NF- κ B1 dan NOX. Adapun protein yang terlibat pada proses penyembuhan luka (*wound healing*) yakni IL-1 β , IL-1 α , TGF-1 β , IL-6, PLG, dan PPAR- α .

3.3. Jejaring interaksi senyawa pada protein

Analisa parameter ini bertujuan untuk mengkaji target protein yang terkait dengan senyawa dan mode aksi senyawa pada protein. Pada data *gene interaction* pada *Comparative Toxicogenomics Database*, senyawa *asiaticoside* terkait dengan 14 protein, *asiatic acid* 29 protein, *corosolic acid* 53 protein, *madecassoside* 2 protein, *maslinic acid* 13 protein, *ursolic acid* 73 protein, dan *madecassic acid* 100 protein. Berdasarkan data protein tersebut, hasil elaborasi data protein dari 7 senyawa didapatkan 230 protein dari 284 protein setelah menghilangkan duplikasi data protein. Berdasarkan 230 protein tersebut dan 32 protein hasil klusterisasi didapatkan

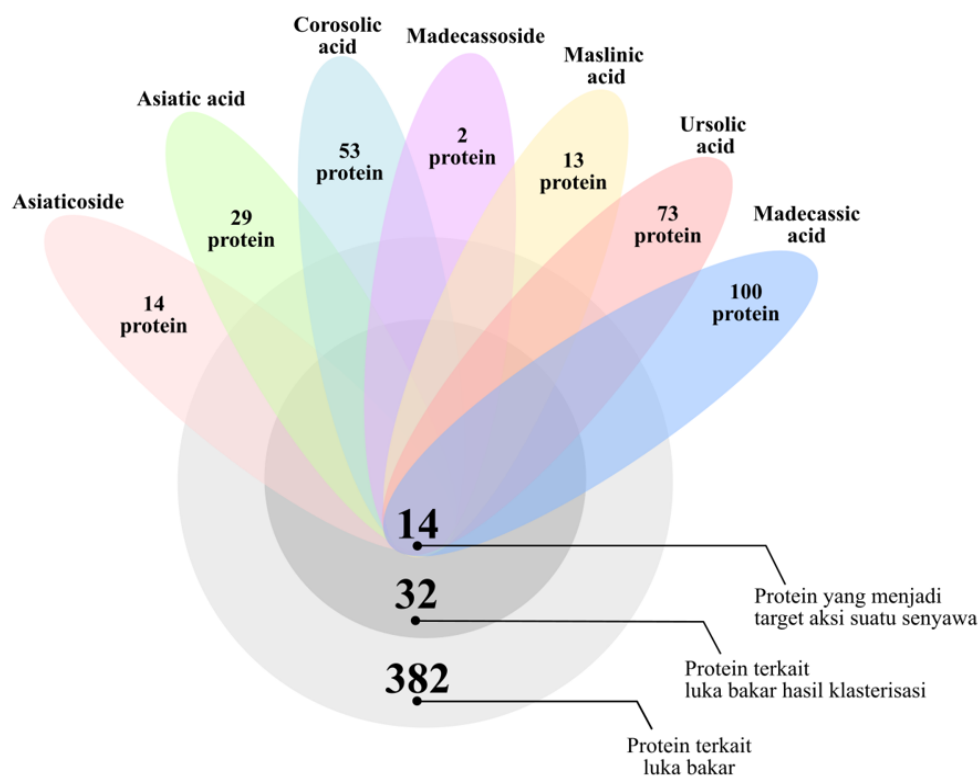
14 protein yang merupakan irisan dari kedua data (Gambar 5A) dan hanya 10 protein yang relevan dengan mekanisme senyawa pada luka bakar yakni IL-1 β , IL-6, MAPK8, PTGS2, NOX4, IFN- γ , NF- κ B1, TGF- β 1, MMP-13, dan TNF (Gambar 5B). Pada Gambar 4, berdasarkan 10 protein tersebut diatas menunjukkan bahwa protein IL1 β memiliki *degree centrality* dan *betweenes centrality* yang paling besar, kemudian diikuti protein TNF dengan *degree centrality* dan *betweenes centrality* lebih rendah dibandingkan IL-1 β .

Mode aksi suatu senyawa dikaji berdasarkan data *gene interaction* pada *Comparative Toxicogenomics Database* dengan kategori stimulus protein (*increased expression*), menghambat protein (*decreased expression*, *downregulate expression*, dan *inhibit protein*). Berdasarkan hasil kajian mode aksi (Gambar 5B), didapatkan bahwa senyawa *asiatic acid* menghambat protein IL-1 β , IL-6, dan MAPK8; senyawa *ursolic acid* menghambat protein IL-6, TNF, NF- κ B1, MAPK8, IFN- γ , PTGS2 dan menstimulasi TGF β 1; *Madecassic acid* menghambat

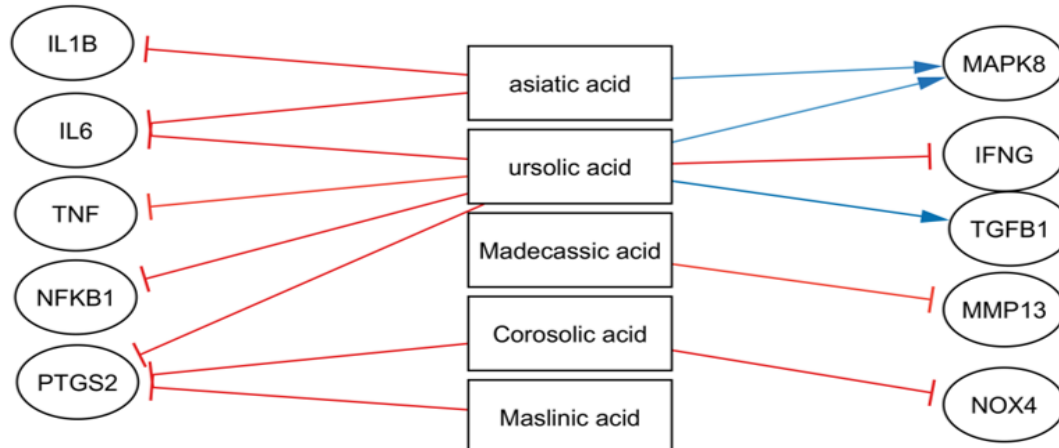


Gambar 4. Gen dan protein beserta proses biologis (biological process) yang terlibat pada luka bakar.

A



B



Gambar 5. (A) Gen dan protein beserta proses biologis (biological process) yang terlibat pada luka bakar, (B) Diagram irisan protein yang terkait luka bakar dan yang menjadi target aksi senyawa

MMP13; senyawa *corosolic acid* menghambat PTGS2 dan NOX4; serta senyawa *maslinic acid* menghambat protein PTGS2.

4. Pembahasan

Kandungan bioaktif pada *Centella asiatica* terkenal dengan 4 senyawa yakni *asiatic acid*, *madecassic acid*, *asiaticoside*, *madecassoside* yang memiliki aktivitas penyembuhan luka.^{17,22,29} Namun, tidak tertutup kemungkinan adanya senyawa non-aromatik lain seperti *ursolic acid*, *corosolic acid*, dan *maslinic acid* juga telah dilaporkan memiliki aktivitas penyembuh luka. Penelitian

sebelumnya melaporkan bahwa *ursolic acid* dapat mempercepat penyembuhan luka dalam waktu kurang dari 3 hari yang ditandai dengan re-epitelisasi lengkap.³⁰ Senyawa *maslinic acid* menurunkan fase inflamasi melalui penghambatan jalur pensinyalan NF-κB dan STAT-1.³¹ Adapun *corosolic acid* menekan inflamasi melalui penghambatan *interleukin receptor-associated kinase* (IRAK)-1 melalui jalur NF-κB.³²

Hasil penelitian menunjukkan bahwa maserat yang pada awalnya berwarna hijau tua berubah menjadi jernih tak berwarna setelah pemberian karbon aktif. Teknik tersebut telah

dilakukan pada penelitian sebelumnya untuk menghilangkan klorofil pada produk herbal ekstrak rosemary dan thyme.³³ Karbon aktif dapat menghilangkan klorofil pada maserat dengan cara mengikat senyawa dengan gugus aromatik pada lapisan struktur karbon.³⁴ Karbon aktif kerap digunakan untuk memurnikan air atau meminimalkan cemaran dalam air.^{35,36} Karbon aktif serbuk (*powdered activated carbon*) memiliki struktur mikrokristal dengan banyak pori-pori partikel. Struktur karbon aktif terdiri dari atom karbon yang berikatan secara kovalen, membentuk struktur heksagon dan tersusun berlapis-lapis.³⁷ Karakteristik tersebut memungkinkan karbon aktif menyerap lebih optimal interaksi antara senyawa organik aromatik melalui interaksi phi (π - π *interaction*), interaksi van der Waals dan elektrostatis.³⁸ Oleh karena itu, senyawa golongan klorofil, flavonoid, kumarin, dan tanin terjerap pada karbon aktif dan menyisakan senyawa non-aromatik pada ekstrak terpurifikasi.

Senyawa triterpenoid tidak dapat diamati pada UV 254 dan 366. Oleh karena itu, visualisasi bercak pada plat KLT derivatisasi pereaksi semprot seperti asam asetat anhidrat pada reagen Liebermann-burchard dan reagen anisaldehyd-asam sulfat. Metode derivatisasi senyawa menggunakan anisaldehyd-asam sulfat akan terjadi penambahan gugus anisaldehyd pada atom C-3 struktur triterpen sehingga yang semula tidak memiliki gugus kromofor yang dapat terdeteksi oleh sinar UV, dengan masuknya gugus anisaldehyd yang terikat pada rantai oksigen C-3 triterpen membentuk struktur aromatik. Keberadaan asam sulfat disertai pemanasan maka struktur non-aromatik berubah menjadi aromatik akibat oksidasi dan resonansi elektron yang menghasilkan variasi warna.³⁹

Pada penelitian ini *asiaticoside*, *madecassoside*, dan *asiatic acid* sulit dielusi pada fase gerak yang sama. Hal ini dikarenakan gugus gula (glikon) meningkatkan polaritas senyawa sehingga terelusi lebih lambat. Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa *asiaticoside* dan *madecassoside* memiliki nilai R_f lebih rendah dibandingkan *asiatic acid* dan *madecassic acid*.²² Oleh karena

itu, identifikasi *asiatic acid* dan *madecassic acid* dilakukan pada fase gerak dengan polaritas rendah yakni menghilangkan air dan menurunkan rasio metanol pada fase gerak. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kandungan empat senyawa triterpenoid pada *Centella asiatica* cukup rendah yakni *asiaticoside* 0.25%, *madecassoside* 1.02%, *asiatic acid* 0.12%, dan *madecassic acid* 0.54%.⁴⁰

Tanaman *Centella asiatica* dipercaya baik secara etnofarmakologi maupun secara eksperimental mempercepat proses penyembuhan luka. Kandungan bioaktif triterpen dilaporkan memiliki efek mempercepat penyembuhan luka. Berdasarkan hasil kajian jejaring farmakologi didapatkan 10 protein yang relevan dengan mekanisme senyawa pada luka bakar beberapa IL-1 β , IL-6, MAPK8, PTGS2, NOX4, IFN- γ , NF- κ B1, TGF- β 1, MMP13, dan TNF. Protein IL-1 β dan TNF memiliki *degree centrality* dan *betweenness centrality* yang besar dibandingkan protein lainnya. Protein IL-1 β merupakan sitokin pro-inflamasi yang berperan pada respon imunitas terhadap infeksi dan kerusakan jaringan. Adanya kerusakan sel akibat luka bakar mengaktifasi sel makrofag melalui *damage associated molecular pattern* (DAMP) untuk mensekresikan IL-1 β (41,42). Adapun tumor *necrosis factor* (TNF) merupakan sitokin sebagai kunci regulasi inflamasi dan proses penyembuhan luka. TNF secara cepat disekresikan oleh sel endotel vaskuler, keratinosit, dan sel fibroblast pada area luka, kemudian menginisiasi fase inflamasi dengan mengundang sel leukosit ke area luka. Selain itu, TNF meregulasi aktivitas fibroblast, endotel vaskular dan keratinosit untuk mensintesis matriks ekstraseluler.⁴³ Pada penelitian ini, *asiatic acid* mengurangi sekresi sitokin IL-1 β sehingga memperpendek fase inflamasi dan bergeser ke fase proliferasi dan remodeling. Pada fase tersebut *asiatic acid* menstimulasi fibronektin dan sintesis kolagen.⁴⁴ Secara umum, inflamasi berkaitan dengan dua jalur pensinyalan yakni jalur MAPK dan NF- κ B, kedua jalur tersebut merupakan *second messenger*

setelah aktivasi reseptor interleukin-1 (IL-1) oleh IL-1 pada saat terjadi luka bakar.⁴⁵

Proses penyembuhan luka terdiri dari 3 (tiga) tahap yakni fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodeling. Pada fase inflamasi, adanya induksi panas menyebabkan kerusakan sel dan membentuk *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs) yang memicu aktivasi makrofag menjadi M1 makrofag yang mensekresikan mediator proinflamasi. Makrofag membantu perubahan sel T Naïve untuk berdiferensiasi menjadi Sel Th1 dan Sel Th2. Sel Th1 bertanggungjawab pada sekresi sitokin IL-2 dan IFN, sedangkan Sel Th2 yang mensekresikan IL-4 dan IL-10.⁴⁶ Sel M1 makrofag mensekresikan mediator inflamasi IL-23 yang mempengaruhi sel Th-17 untuk mensekresikan IL-17 dan TNF- α guna mengundang leukosit ke tempat luka untuk meminimalkan adanya infeksi.^{44,47}

Pada penelitian ini kami menemukan bahwa protein IL-1 β , IL-6, MAPK8, PTGS2, IFN- γ , NF- κ B1, dan TNF merupakan protein yang terlibat dalam proses inflamasi. Senyawa asiatic acid menekan IL-1 β dan IL-6 dengan mekanisme penghambatan pada NF- κ B1 sebagai faktor inflamasi. Senyawa triterpenoid mengurangi inflamasi dengan menurunkan pelepasan TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 serta menghambat ekspresi iNOS, COX-2 dan NF- κ B.^{44,48}

Fase proliferasi berkaitan dengan perbanyakan sel keratin (*keratinocyte*) dan sel fibroblas. Fase proliferasi umumnya terjadi secara tumpang tindih (*overlapping*) dengan fase remodeling yang ditandai dengan perbanyakan sel keratin (*keratinocyte*) dan sel fibroblas melalui sitokin dan faktor pertumbuhan. *Asiaticoside* dilaporkan meningkatkan migrasi sel keratin ke area luka melalui peningkatan ekspresi gen Rac1 dan ThA serta menginduksi fosforilasi protein ERK dan p38 MAPK.^{49,50}

Fase *remodeling* diperankan oleh aktivasi TGF- β yang diproduksi oleh sel M2 makrofag. Penelitian ini didapatkan bahwa NOX4, TGF- β 1, dan MMP13 terlibat pada proses remodeling. Senyawa *ursolic acid* memacu TGF- β 1 yang berperan pada

diferensiasi sel fibroblas untuk sintesis matrik ekstraseluler, sedangkan *madecassic acid* menghambat MMP13. Adanya TGF- β akan mengaktivasi reseptor TGF- β 1 dan TGF- β 2 yang bertanggungjawab pada proliferasi sel fibroblas, diferensiasi sel fibroblast menjadi myofibroblas dan sekresi kolagen, serta menekan enzim matrix metalloproteinase/MMP.⁴⁴ Setelah tercapainya jumlah myofibroblas maka sel Th1 berperan dalam menekan aktivitas myofibroblas dengan melepaskan IFN- γ dan IL12.⁵¹ Senyawa *asiatic acid* dan *ursolic acid* menekan ekspresi TGF- β melalui penghambatan fosforilasi Smad 2/3 dan peningkatan kadar Smad7 (52,53). Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa *ursolic acid* menghambat menurunkan ekspresi gen TGF- β melalui aktivasi jalur Nrf2/HO-1.⁵⁴ Namun, hal tersebut berbeda dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa *ursolic acid* mempercepat penyembuhan luka setelah pemberian *ursolic acid* 0.2%.⁵⁵ Adapun NOX4 dihambat oleh *corosolic acid* padahal NOX4 berperan dalam diferensiasi fibroblas. Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa hambatan NOX4 tidak berpengaruh signifikan pada diferensiasi fibroblas karena TGF- β merupakan faktor kunci diferensiasi fibroblast.⁵⁶ Oleh karena itu, pada penelitian ini mengungkap bahwa senyawa non-aromatik pada herba *Centella asiatica* dimungkinkan dapat mempercepat penyembuhan luka bakar dengan cara menekan mediator proinflamasi dan jalur pensinyalannya serta menekan enzim MMP. Penelitian selanjutnya masih memungkinkan untuk dilakukan guna mengkaji senyawa non-aromatik pada penyembuhan luka bakar secara *in vitro* dan *in vivo* untuk mengukur parameter makroskopis, mikroskopis dan molekuler.

5. Conclusion

Penambahan karbon aktif pada ekstrak metanol herba *Centella asiatica* dapat menghilangkan pigmen daun dan senyawa aromatik. Ekstrak terpurifikasi mengandung senyawa *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* pada hasil KLT. Hasil kajian

farmakologi jejaring menunjukkan bahwa senyawa non-aromatik pada herba *Centella asiatica* menghambat pelepasan mediator proinflamasi dan jalur pensinyalannya serta menekan enzim MMP pada proses penyembuhan luka.

Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (Kemdikbudristek) atas pendanaan hibah penelitian tahun anggaran 2023.

Referensi

1. Wardhana A, Basuki A, Prameswara ADH, Rizkita DN, Andarie AA, Canintika AF. The epidemiology of burns in Indonesia's national referral burn center from 2013 to 2015. *Burns Open*. 2017;1(2):67–73.
2. Utami AM, Elfiah U, Wisudanti DD. Assessments of quality of life in burn patients after hospital treatment in Jember. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 2020;11(2):157–64.
3. Spronk I, Legemate CM, Dokter J, van Loey NEE, van Baar ME, Polinder S. Predictors of health-related quality of life after burn injuries: A systematic review. *Critical Care*. 2018;22(1):1–13.
4. Spronk I, Legemate C, Oen I, van Loey N, Polinder S, van Baar M. Health related quality of life in adults after burn injuries: A systematic review. *PLoS ONE*. 2018;13(5):1–21.
5. Kosalwatna S, Shaipanich C, Bhanganada K. The effect of one percent centella asiatica cream on chronic ulcers. 1988 [cited 2023 Dec 8]; Available from: <http://imsear.searo.who.int/handle/123456789/138303>
6. Somboonwong J, Kankaisre M, Tantisira B, Tantisira MH. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12(1):1.
7. Wu F, Bian D, Xia Y, Gong Z, Tan Q, Chen J, et al. Identification of Major Active Ingredients Responsible for Burn Wound Healing of *Centella asiatica* Herbs. 2012;2012.
8. Kimura Y, Sumiyoshi M, Samukawa K ichi, Satake N, Sakanaka M. Facilitating action of asiaticoside at low doses on burn wound repair and its mechanism. *European Journal of Pharmacology*. 2008 Apr;584(2–3):415–23.
9. Awaluddin R, Nugrahaningsih DAA, Solikhah EN. The concentration-dependent pro-fibrotic effect of metformin on LPS and high glucose induced fibroblast NIH 3T3 and macrophage raw 264.7 cell co-culture. *Medical Journal of Malaysia*. 2020;75(May):10–3.
10. Awaluddin R, Nugrahaningsih DAA, Solikhah EN, Chabib L. The Effect of Asiatic Acid and Metformin on the Viability Percentage of Mouse Macrophage Cell Lines RAW264.7 and Mouse Fibroblast Cell Lines NIH3T3. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020;448(1).
11. Abbas manal mohammad, Ar-rawi N, Abbas M ahmad, Al-khateeb I. Naringenin potentiated β -sitosterol healing effect on stracth wound assay. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2019;14(6):566–73.
12. Jewo PI, Fadeyibi IO, Babalola OS, Saalu LC, Benebo AS, Izegebu MC, et al. A Comparative Study of the Wound Healing Properties of Moist Exposed Burn Ointment (MEBO) and Silver Sulphadiazine. *Annals of burns and fire disasters*. 2009;22(2):79–82.
13. Küpeli Akkol E, Renda G, İlhan M, Bektaş NY. Wound healing acceleration and anti-inflammatory potential of *Prunella vulgaris* L.: From conventional use to preclinical scientific verification. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022 Sep 15;295:115411.
14. Farida D, Hidayathillah AP, Firdaus SD. Perbandingan Efektivitas Daun Sesu (*Chromolaena odorata*) dengan Salep Madecassol terhadap Luka Bakar Derajat IIA pada Mencit (*Mus musculus*).
15. Seong E, Heo H, Sang Jeong H, Lee H, Lee J. Enhancement of bioactive compounds and biological activities of

- Centella asiatica through ultrasound treatment. Ultrasonics Sonochemistry. 2023;94(March):106353.
16. Harwoko, Pramono, Nugroho A Endro. Triterpenoid-rich fraction of Centella asiatica leaves and in vivo antihypertensive activity. 2014;21(1):149–54.
 17. Chong NJ, Aziz Z. A systematic review on the chemical constituents of Centella asiatica. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2011;2(3):445–59.
 18. Moon GH, Lee Y, Kim EK, Chung KH, Lee KJ, An JH. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Asiatic Acid in a DNCB-Induced Atopic Dermatitis Animal Model. Nutrients. 2021 Jul 17;13(7):2448.
 19. Lv H, Qi Z, Wang S, Feng H, Deng X, Ci X. Asiatic Acid Exhibits Anti-inflammatory and Antioxidant Activities against Lipopolysaccharide and d-Galactosamine-Induced Fulminant Hepatic Failure. Frontiers in Immunology [Internet]. 2017 [cited 2023 Dec 22];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00785>
 20. Noor F, Tahir ul Qamar M, Ashfaq UA, Albutti A, Alwashmi ASS, Aljasir MA. Network Pharmacology Approach for Medicinal Plants: Review and Assessment. Pharmaceuticals. 2022 May;15(5):572.
 21. Uduwana S, Abeynayake N, Wickramasinghe I. Synergistic, antagonistic, and additive effects on the resultant antioxidant activity in infusions of green tea with bee honey and Citrus limonum extract as additives. Journal of Agriculture and Food Research. 2023 Jun 1;12:100571.
 22. James J, Dubery I. Identification and quantification of triterpenoid centelloids in Centella asiatica (L.) Urban by densitometric TLC. Journal of Planar Chromatography - Modern TLC. 2011;24(1):82–7.
 23. Arribas-López E, Zand N, Ojo O, Snowden MJ, Kochhar T. A Systematic Review of the Effect of Centella asiatica on Wound Healing. IJERPH. 2022 Mar 10;19(6):3266.
 24. Sun B, Wu L, Wu Y, Zhang C, Qin L, Hayashi M, et al. Therapeutic Potential of Centella asiatica and Its Triterpenes: A Review. Front Pharmacol. 2020 Sep 4;11:568032.
 25. Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Dańczak-Pazdrowska A, Brzezińska M. Centella asiatica in Dermatology: An Overview: THE EXPERIMENTS ABOUT USE OF CENTELLA ASIATICA IN DERMATOLOGY. Phytother Res. 2014 Aug;28(8):1117–24.
 26. Nursamsiar N, M. Mangande M, Awaluddin A, Nur S, Asnawi A. In Silico Study of Aglycon Curculigoside A and Its Derivatives as α -Amylase Inhibitors. Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2020;7(1):29.
 27. Rubianto Tjandrawinata R, Winda Amalia A, Tuna H, Novalinda Saidi V, Tan S, Tradisional Tiongkok P, et al. Mekanisme Molekuler Imunomodulasi oleh Huangqi (Astragali Radix) Menggunakan Sistem Farmakologi Jejaring (Molecular Mechanisms of Network Pharmacology-Based Immunomodulation of Huangqi (Astragali Radix)). Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2022;20(2):184–95.
 28. Fan J, Zhou J, Qu Z, Peng H, Meng S, Peng Y, et al. Network Pharmacology and Molecular Docking Elucidate the Pharmacological Mechanism of the OSTEOWONDER Capsule for Treating Osteoporosis. Frontiers in Genetics. 2022;13(February):1–13.
 29. Sun B, Wu L, Wu Y, Zhang C, Qin L, Hayashi M, et al. Therapeutic Potential of Centella asiatica and Its Triterpenes: A Review. Frontiers in Pharmacology. 2020;11(September):1–24.
 30. Saeidinia A, Keihanian F, Lashkari AP, Lahiji HG, Mobayyen M, Heidarzade A, et al. Partial-thickness burn wounds healing by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver sulfadiazine and centiderm. Medicine

- (United States). 2017;96(9).
31. Lee W, Kim J, Park EK, Bae JS. Maslinic Acid Ameliorates Inflammation via the Downregulation of NF- κ B and STAT-1. *Antioxidants* (Basel). 2020 Jan 25;9(2):106.
 32. Kim SJ, Cha JY, Kang HS, Lee JH, Lee JY, Park JH, et al. Corosolic acid ameliorates acute inflammation through inhibition of IRAK-1 phosphorylation in macrophages. *BMB Rep*. 2016 May 31;49(5):276–81.
 33. Tzima K, Brunton NP, Rai DK. Evaluation of the impact of chlorophyll removal techniques on polyphenols in rosemary and thyme by-products. *J Food Biochem* [Internet]. 2020 Mar [cited 2023 Dec 10];44(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.13148>
 34. Villacañas F, Pereira MFR, Órfão JJM, Figueiredo JL. Adsorption of simple aromatic compounds on activated carbons. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006 Jan 1;293(1):128–36.
 35. Gaydukova AM, Nenasheva AS, Kolesnikov VA, Vetlugin NA. The Extraction of Activated Carbon from Aqueous Solutions in the Presence of Organic and Inorganic Compounds by the Electroflotation Method. *Journal of Water Chemistry and Technology* 2021 43:2. 2021 Jun 8;43(2):116–22.
 36. Oesterle P, Lindberg RH, Fick J, Jansson S. Extraction of active pharmaceutical ingredients from simulated spent activated carbonaceous adsorbents. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(20):25572–81.
 37. Sujiono EH, Zabrian D, Zurnansyah, Mulyati, Zharvan V, Samnur, et al. Fabrication and characterization of coconut shell activated carbon using variation chemical activation for wastewater treatment application. *Results in Chemistry*. 2022;4(November 2021):100291.
 38. Jawad AH, Abdulhameed AS, Mastuli MS. Mesoporous Crosslinked Chitosan-Activated Charcoal Composite for the Removal of Thionine Cationic Dye: Comprehensive Adsorption and Mechanism Study. *Journal of Polymers and the Environment*. 2020 Mar 1;28(3):1095–105.
 39. Agatonovic-Kustrin S, Kustrin E, Gegechkori V, Morton DW. High-performance thin-layer chromatography hyphenated with microchemical and biochemical derivatizations in bioactivity profiling of marine species. *Marine Drugs*. 2019;17(3):1–14.
 40. Sawatdee S, Choochuay K, Chanthorn W, Srichana T. Evaluation of the topical spray containing *Centella asiatica* extract and its efficacy on excision wounds in rats. *Acta Pharm*. 2016 Jun 1;66(2):233–44.
 41. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011 Aug;22(4):189–95.
 42. Wilson SE. Interleukin-1 and Transforming Growth Factor Beta: Commonly Opposing, but Sometimes Supporting, Master Regulators of the Corneal Wound Healing Response to Injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2021 Apr 15;62(4):8.
 43. Ritsu M, Kawakami K, Kanno E, Tanno H, Ishii K, Imai Y, et al. Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*. 2017 Jan 1;21(1):14–9.
 44. Diniz LRL, Calado LL, Duarte ABS, de Sousa DP. *Centella asiatica* and Its Metabolite Asiatic Acid: Wound Healing Effects and Therapeutic Potential. *Metabolites*. 2023;13(2).
 45. Xiao K, Liu C, Tu Z, Xu Q, Chen S, Zhang Y, et al. Activation of the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways Contributes to the Inflammatory Responses, but Not Cell Injury, in IPEC-1 Cells Challenged with Hydrogen Peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020 Jan 21;2020:e5803639.
 46. Penatzer JA, Srinivas S, Thakkar RK. The role of macrophages in thermal injury.

- International Journal of Burns and Trauma. 2022;12(1):1.
47. Lateef Z, Stuart G, Jones N, Mercer A, Fleming S, Wise L. The cutaneous inflammatory response to thermal burn injury in a Murine model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3).
 48. Xu X, Si L, Xu J, Yi C, Wang F, Gu W, et al. Asiatic acid inhibits cardiac hypertrophy by blocking interleukin-1 β -activated nuclear factor- κ B signaling in vitro and in vivo. *Journal of Thoracic Disease*. 2015;7(10):1787–97.
 49. Lee JH, Kim HL, Lee MH, You KE, Kwon BJ, Seo HJ, et al. Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012 Oct 15;19(13):1223–7.
 50. Singkhorn S, Tantisira MH, Tanasawet S, Hutamekalin P, Wongtawatchai T, Sukketsiri W. Induction of keratinocyte migration by ECa 233 is mediated through FAK/Akt, ERK, and p38 MAPK signaling. *Phytotherapy Research*. 2018 Jul 1;32(7):1397–403.
 51. Korkmaz HI, Flokstra G, Waasdorp M, Pijpe A, Papendorp SG, de Jong E, et al. The Complexity of the Post-Burn Immune Response: An Overview of the Associated Local and Systemic Complications. *Cells*. 2023;12(3).
 52. Bian D, Zhang J, Wu X, Dou Y, Yang Y, Tan Q, et al. Asiatic Acid Isolated From *Centella Asiatica* Inhibits TGF- β 1-induced Collagen Expression in Human Keloid Fibroblasts via PPAR- γ Activation. *International Journal of Biological Sciences*. 2013;9:1032–42.
 53. Ruan JS, Zhou H, Yang L, Wang L, Jiang ZS, Sun H, et al. Ursolic acid attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in NSCLC by targeting integrin α v β 5/MMPs signaling. *Oncology Research*. 2019;27(5):593–600.
 54. Pei J, Wu M, Cai S, Peng J, Zhan X, Wang D, et al. The Protective Effect of Ursolic Acid on Unilateral Ureteral Obstruction in Rats by Activating the Nrf2/HO-1 Antioxidant Signaling Pathway. *Computational Intelligence and Neuroscience*. 2022 Aug 25;2022:e3690524.
 55. Lv H, Zhao M, Li Y, Li K, Chen S, Zhao W, et al. Electrospun Chitosan–Polyvinyl Alcohol Nanofiber Dressings Loaded with Bioactive Ursolic Acid Promoting Diabetic Wound Healing. *Nanomaterials*. 2022 Jan;12(17):2933.
 56. Lévigne D, Modarressi A, Krause KH, Pittet-Cuénod B. NADPH oxidase 4 deficiency leads to impaired wound repair and reduced dityrosine-crosslinking, but does not affect myofibroblast formation. *Free Radic Biol Med*. 2016 Jul;96:374–84.