

Đánh giá khả năng làm lành vết thương của cây Ba chạc (*Melicope pteleifolia* (Champ. Ex Benth.) T.g. Hartley)

- Nguyễn Thị Thanh Nhân
- Nguyễn Minh Cần
- Trần Linh Thuộc
- Đặng Thị Phương Thảo

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 18 tháng 9 năm 2016, nhận đăng ngày 10 tháng 04 năm 2017)

TÓM TẮT

Ba chạc (*Melicope pteleifolia* (Champ. ex Benth.) T.G. Hartley) là cây thuốc dân gian thường được người K'Ho ở Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà, Lâm Đồng, Việt Nam sử dụng trong điều trị vết thương, viêm loét và nhiều bệnh về da khác. Tuy nhiên, tính hiệu quả và an toàn của cây thuốc trong điều trị vết thương vẫn chưa được làm rõ. Để cung cấp những bằng chứng khoa học và giúp hiểu rõ cơ chế tác động của cây thuốc chúng tôi thực hiện khảo sát các hoạt tính làm lành vết thương *in vitro* và *in vivo* của cao chiết và các phân đoạn của cây thuốc. Kết quả cho thấy cây thuốc thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* và *Enterococcus faecalis*. Đối với các mô hình tế bào động vật, cây thuốc thể hiện khả năng kích thích tăng sinh nguyên bào sợi và tế bào keratin cũng như kháng viêm *in vitro* thông qua sự ức chế đại thực bào sinh Nitric oxide (NO). Ngoài ra, khảo sát trên mô hình động vật cho thấy khả năng kích thích hình thành vảy vết thương nhanh hơn so với lô đối chứng. Như vậy có thể dự đoán các hoạt tính kháng khuẩn, kích thích tăng sinh tế bào da và ức chế đại thực bào sinh NO là cơ sở làm lành vết thương của cây thuốc.

Keywords: Ba chạc, kháng khuẩn, kháng viêm, tăng sinh, vết thương

MỞ ĐẦU

Ba chạc là cây thuốc dân gian được sử dụng phổ biến để điều trị vết thương, viêm loét, côn trùng cắn ở Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà, Lâm Đồng, Việt Nam. Ngoài ra, nó còn được dùng trị ngứa, eczema, vết thương, viêm, trĩ, thấp khớp, đau lưng ở Trung Quốc [1] hay chăm sóc sức khỏe hậu sản ở Bắc Thái Lan [2]. Các nghiên cứu trước cho thấy, Ba chạc có khả năng kháng viêm *in vitro* [3-5] và giảm đau trên mô hình động vật [6]. Bên cạnh đó cũng có các khảo sát về hoạt tính kháng oxy hóa [4] và kháng nấm [7] nhưng hiệu quả không cao. Tuy nhiên, vẫn chưa có công bố nào tập trung vào hiệu quả và cơ chế làm lành vết thương của cây thuốc.

Quá trình lành vết thương gồm bốn giai đoạn, đông máu, viêm, tăng sinh và tái cấu trúc. Đầu tiên, ngay sau khi bị thương, quá trình đông máu diễn ra thông qua sự co mạch và hình thành cục máu đông để ngăn chặn sự mất máu. Tiếp theo, vi khuẩn và các tế bào chết sẽ được loại bỏ bởi đại thực bào, bạch cầu trung tính và các tế bào miễn dịch khác thông qua giai đoạn viêm. Trong giai đoạn tăng sinh, đại thực bào và nguyên bào sợi tiết các nhân tố tăng trưởng kích thích nguyên bào sợi tăng sinh và di chuyển đến vùng bị thương. Các protein nền gồm fibronectin và collagen được tổng hợp. Cùng thời điểm đó thì các mạch bị tổn thương cũng được hình thành lại. Tiếp

theo, tế bào keratin di chuyển, tăng sinh và biệt hóa để làm liền miệng vết thương. Cuối cùng da sẽ được tổ chức và tái cấu trúc chất nền ngoại bào, hình thành myofibroblast, co vết thương và các tế bào không cần thiết chết theo chu trình [8-11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát hoạt tính làm lành vết thương của cây ba chạc dựa theo các giai đoạn của quá trình lành vết thương tự nhiên trên.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Ba chạc được thu nhận tại Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà, Lâm Đồng, Việt Nam và định danh tại Khoa Sinh học- Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

Tách chiết hợp chất

Mẫu được làm sạch sơ bộ, phơi khô tự nhiên (< 40 °C) và nghiền thành bột mịn. Bột cây được ngâm giâm trong ethanol 70 % (tỉ lệ khối lượng (g): thể tích (mL) là 1:10) trong 48 giờ sau đó cô quay chân không. Cao chiết ethanol tiếp tục được phân đoạn với các dung môi ether dầu hòa, ethyl acetate và nước. Cao chiết ethanol và cao phân đoạn được bảo quản ở -4°C [12].

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch được sử dụng [13] với các cao chiết ethanol (50–400 mg/mL), cao nước (200 mg/mL), cao ethyl acetate (100 mg/mL) và cao ether dầu hòa (50 mg/mL). Bốn chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* và *Enterococcus faecalis* được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ sinh học Phân tử và Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Chúng dương là ampicillin 0,1 mg/mL (tetracycline 0,3 mg/mL đối với *P. aeruginosa*) [14]. Đường kính vòng vô khuẩn được tính bằng hiệu số giữa đường kính vô khuẩn và đường kính lỗ thạch.

Nuôi cấy tế bào

Nguyên bào sợi chuột NIH3T3 (ATCC^R CRL - 1658TM), tế bào keratin người HaCaT (ATCC No.: HB - 8065) và đại thực bào chuột RAW 264.7 (ATCC TIB 71) được nuôi cấy trong môi trường DMEM – F12 bổ sung 7,5 % huyết thanh (FBS), 1 % penicillin/streptomycin ở 37 °C, 5 % CO₂.

Thử nghiệm MTT

Thử nghiệm MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) dựa trên sự chuyển đổi MTT thành tinh thể formazan trong ti thể tế bào sống. Cao chiết được pha trong DMSO sau đó tiếp tục pha loãng thành dãy nồng độ khác nhau trong môi trường nuôi cấy DMEM-F12 1 % FBS, nồng độ DMSO cuối cùng là 0,25 %. Môi trường 1% FBS là môi trường tối ưu để khảo sát khả năng kích thích tăng sinh tế bào của cao chiết. Đầu tiên, mỗi giếng của đĩa 96 giếng chứa 100 µl tế bào (10⁵ tế bào /mL), môi trường DMEM-F12 7,5 % FBS được nuôi cấy ở 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ trong 24 giờ. Sau đó, môi trường ban đầu được thay bởi 100 µl môi trường chứa cao chiết. Mỗi nồng độ cao chiết được lập lại 3 lần. Đối chứng là môi trường chứa tế bào không có cao chiết. Tất cả được ủ 37 °C với 5 % (v/v) CO₂ trong 48 giờ. Tiếp theo, 10 µL MTT 5 mg/mL (Sigma, USA), hòa tan trong nước muối phosphate (PBS), được thêm vào mỗi giếng, ủ 3 giờ. Sau đó loại bỏ toàn bộ môi trường trong giếng. Bổ sung 100 µL isopropanol-HCl 0,1N để hòa tan tinh thể formazan. Cuối cùng, mẫu được đo mật độ quang ở bước sóng 550 nm bằng máy đọc ELISA [15]. Đối chứng dương là môi trường DMEM-F12 7,5 % FBS. Đối chứng âm là môi trường DMEM-F12 1 % FBS + 0,25 % DMSO. Ngoài ra, đối chứng DMEM-F12 1 % FBS dùng để kiểm tra độc tính của DMSO đối với tế bào. Số lượng tế bào được quy đổi từ giá trị OD bằng cách dựng đường tương quan tuyến tính của hai giá trị này. NIH3T3 được quy đổi từ giá trị OD theo công thức $y = 225219x - 22647$ và HaCaT được quy đổi theo công thức $y = 261121x - 25205$, với y là số lượng tế bào, x là giá trị OD.

Thử nghiệm Griess

Thử nghiệm Griess được sử dụng để đo nồng độ NO. Nguyên bào sợi chuột (RAW 264.7) được nuôi cấy trong môi trường DMEM – F12, 10 % trong đĩa 96 giếng (10⁴ tế bào/100 µL), ủ 12 giờ ở 37 °C, 5 % CO₂. Thay toàn bộ môi trường trong giếng bằng 100 µL cao chiết pha loãng trong DMEM – F12 1 % FBS. Tế bào được kích thích bằng 0,5 µg/mL LPS (lipopolysaccharide) trong 24 giờ. Sự hiện diện của nitrite, sản phẩm oxy hóa của NO, được xác định bằng chất thử Griess (1 % sulfanamide và 0,1 % N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride trong 2,5 % H₃PO₄). 50 µL dịch nuôi cấy tế bào được trộn với 50 µL chất thử Griess trong đĩa 96 giếng sau đó đo mật độ quang ở bước sóng 550 nm. Dexamethasone được sử dụng làm đối chứng dương [16]. Môi trường chứa 0,5 µg/mL LPS (1) làm đối chứng âm và môi trường không chứa LPS (2) được sử dụng để so sánh khả năng kích thích sinh NO khi kích thích LPS. Phần trăm ức chế đại thực bào sinh NO tính theo công thức $\frac{OD(1) - OD(mẫu)}{OD(1) - OD(2)} \times 100\%$. Các nồng độ cao chiết trong thử nghiệm được chọn dựa trên sự quy đổi theo hiệu suất tách chiết so với cao thô.

Mô hình vết thương cắt

Chuột Swiss albino (25 ± 3 g) được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm 6 con. Chuột được cạo sạch lông ở lưng, đóng dấu tròn đường kính 10 mm sau đó gây mê bằng ketamine (80 mg/kg) - xylazine (20 mg/kg) và cắt vùng da lưng theo đường tròn đã đánh dấu. Nhóm I được điều trị với dung môi pha cao (ethanol 35 %), nhóm II điều trị với cao chiết ethanol (200 mg/kg) [17]. Vết thương được theo dõi, ghi nhận từng ngày.

Xử lý thống kê

Dữ liệu được phân tích thống kê ANOVA one – way, dữ liệu có p ≤ 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Sự hiện diện của vi khuẩn là tác nhân gây viêm, nhiễm trùng, kéo dài thời gian lành của vết thương ở giai đoạn viêm [18]. Để đánh giá khả năng kháng khuẩn của cao chiết ethanol và các phân đoạn, phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được sử dụng với các nồng độ mẫu khác nhau. Kết quả đường kính vòng vô khuẩn được ghi nhận như Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn của chứng dương nằm trong khoảng ức chế đối với vi khuẩn theo CLSI [14]. Kết quả cho thấy cao chiết ethanol có hoạt tính kháng các chủng *S. aureus* ở các nồng độ 100– 400 mg/mL và *P. aeruginosa*, *E. feacalis* ở nồng độ 200–400 mg/mL nhưng không có tác dụng với *E. coli*. Tuy nhiên, cả ba phân đoạn ether dầu hòa, ethyl acetate và nước chỉ có hiệu quả kháng khuẩn với *S. aureus*. Bên cạnh đó, cây thuốc thể hiện khả năng kháng các chủng vi khuẩn gram dương là *S. aureus* (4,3 ± 1,2 mm) và *E. feacalis* (7,7 ± 1,5 mm) tốt hơn các chủng gram âm như *P. aeruginosa* (2,0 ± 0,0 mm) và *E. coli*. Như vậy, có thể thấy tác dụng kháng khuẩn được phân bố ở cả ba phân đoạn, chúng có tác dụng cộng gộp trong cao chiết ethanol và hoạt tính này được thể hiện rõ ở các chủng vi khuẩn gram dương. Ngoài công bố về hoạt tính kháng khuẩn trên một số cây cùng họ [19, 20], đây là kết quả kháng khuẩn đầu tiên đối với cây ba chạc trên 4 chủng vi khuẩn được khảo sát trên.

Bảng 1. Kết quả khảo sát kháng khuẩn

Cao chiết	Nồng độ (mg/mL)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)			
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. feacalis</i>	<i>E. coli</i>
Ethanol 70%	400	4,3 ± 1,2	2,0 ± 0,0	7,7 ± 1,5	-
	200	2,3 ± 0,6	1,0 ± 0,0	4,3 ± 0,6	-
	100	1,3 ± 0,6	-	-	-
	50	-	-	-	-
Ether dầu hỏa	50	4,0±0,0	-	-	-
Ethyl acetate	100	5,7±0,6	-	-	-
Nước	200	2,7±0,6	-	-	-
Chứng dương		14,3±1,3	9,2±1,0	11,8±1,6	8,0±1,0

Khảo sát hoạt tính kháng viêm *in vitro*

Để đánh giá khả năng kháng viêm *in vitro*, chúng tôi tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế đại thực bào RAW 264,7 tiết NO khi bị kích thích bằng LPS. NO là phân tử quan trọng tham gia vào nhiều quá trình sinh lý và bệnh lý của cơ thể. Việc sản xuất quá mức NO dẫn đến hàng loạt các biểu hiện bệnh lý trong đó có viêm. Vì vậy, điều hòa sản xuất NO được xem như liệu pháp quan trọng để ngăn chặn và điều trị viêm [25]. Thử nghiệm Griess được thực hiện để kiểm tra nồng độ NO được sản sinh từ tế bào. Kết quả thu được cho thấy cao chiết cây ba chạc ức chế tế bào Raw 264.7 sinh NO (Bảng 3). Trong đó, hoạt tính ức chế mạnh nhất hiện diện ở phân đoạn ethyl acetate

(20 µg/mL, 117,01 %); cao chiết ethanol (62,5 µg/mL) ức chế 95,24 % lượng NO sinh ra, cao hơn đối chứng dương dexamethasone (83,33 %). Cao ether dầu hỏa ức chế 76,19 % (20 µg/mL) và cao nước ức chế 35,37 % (15,625 µg/mL) (Bảng 2). Với kết quả này cho thấy, các hợp chất kháng viêm có xu hướng tập trung ở pha không phân cực và phân cực trung bình. Các kết quả trong nghiên cứu này hoàn toàn tương đồng với các nghiên cứu trước. Faridah Abas và cộng sự thu được kết quả ức chế sinh NO là 95 % (tỉ lệ tế bào bị gây độc 4 %) khi sử dụng cao methanol [4]. Một công bố khác của Faridah Abas và cộng sự về các phân đoạn cũng cho thấy hoạt tính kháng viêm hiện diện ở tất cả các phân đoạn được khảo sát [5].

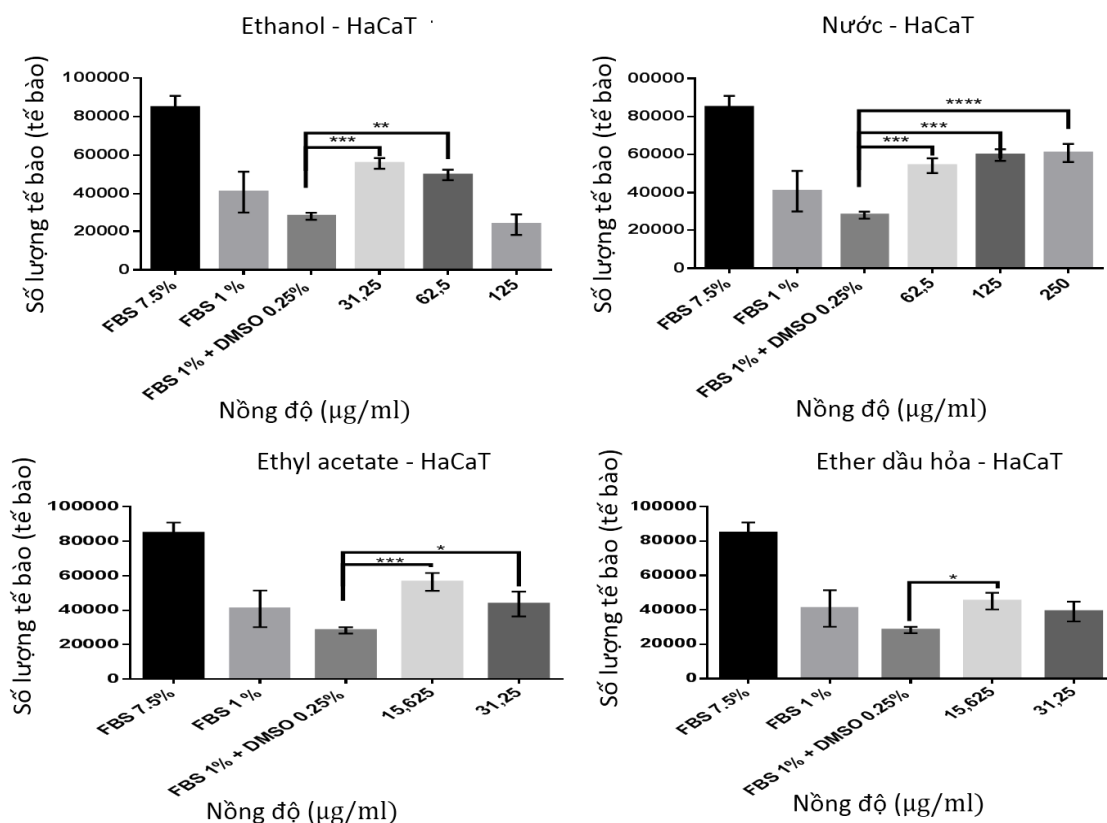
Bảng 2. Kết quả khảo sát khả năng ức chế RAW264.7 sinh NO

Cao chiết	Nồng độ (µg/mL)	% ức chế
Ethanol	62,50	95,24
	15,63	43,54
Ether dầu hỏa	20,00	76,19
	5,00	13,61
Ethyl acetate	20,00	117,01
	5,00	57,14
Nước	62,50	10,88
	15,63	35,37
Dexamethasone	50,00	83,33

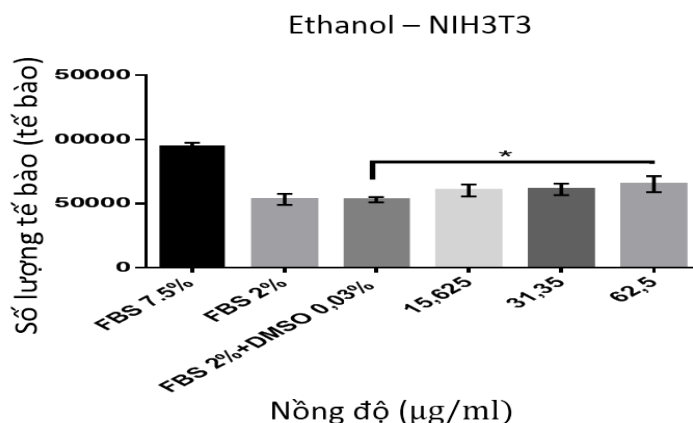
Khảo sát hoạt tính kích thích tăng sinh nguyên bào sợi và tế bào keratin.

Sự tăng sinh của nguyên bào sợi và tế bào keratin đóng vai trò quan trọng trong pha tăng sinh của quá trình lành vết thương. Kích thích tăng sinh hai loại tế bào này giúp nhanh chóng làm liền miệng vết thương cũng như phục hồi cấu trúc và chức năng của da bị tổn thương [26, 27]. Để kiểm tra hoạt tính kích thích tăng sinh tế bào keratin và nguyên bào sợi của cây ba chạc, chúng tôi thực hiện đánh giá khả năng kích thích tăng sinh hai dòng tế bào NIH3T3 và HaCaT bằng phương pháp MTT. Kết quả cho thấy cao chiết ethanol và cả ba phân đoạn đều kích thích tăng sinh

HaCaT. Trong đó đáng chú ý là phân đoạn nước và ethyl acetate cho kết quả tăng sinh gấp khoảng 2 lần so với đối chứng (Hình 1). Ngược lại, chỉ có cao ethanol có khả năng kích thích tăng sinh nhẹ NIH3T3 trong khi cả ba phân đoạn đều không thể hiện hoạt tính (Hình 2). Đây là những kết quả hoàn toàn mới về hoạt tính kích thích tăng sinh tế bào của cây ba chạc. Như vậy, có thể dự đoán tác động của cây thuốc lên pha tăng sinh tập trung vào kích thích tăng sinh tế bào keratin, giúp lành miệng vết thương nhanh hơn và các hợp chất có hoạt tính tập trung vào pha phân cực và phân cực trung bình.



Hình 1. Kết quả kích thích tăng sinh tế bào keratin của cây Ba chạc. * thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

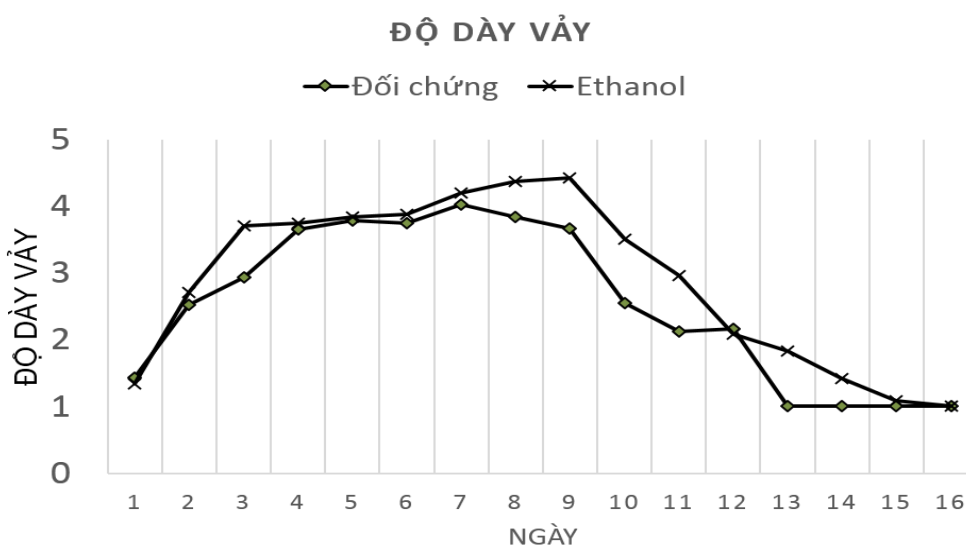


Hình 2. Kết quả kích thích tăng sinh nguyên bào sợi của cây ba chạc.* thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. * p < 0,05

Đánh giá khả năng làm lành vết thương trên mô hình chuột

Hoạt tính lành vết thương của cao chiết ethanol được đánh giá trên mô hình động vật. Mặc dù thời gian lành vết thương và diện tích vết thương không có sự khác biệt giữa hai lô chuột thí nghiệm, sự hình

thành và độ dày vảy ở bề mặt vết thương nhanh hơn và dày hơn rõ rệt so với lô đối chứng (Hình 3). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả *in vitro* về tăng sinh tế bào keratin. Ngoài công bố về hoạt tính giảm đau trên mô hình chuột [6], đây là công bố đầu tiên về điều trị vết thương bằng cây Ba chạc.



Hình 3. Độ dày vảy bề mặt vết thương khi điều trị bằng cao chiết (1: không có vảy; 2: vảy mỏng; 3: vảy trung bình; 4: vảy dày; 5: vảy rất dày)

KẾT LUẬN

Ba chạc (*Melicope pteleifolia* (Champ. ex Benth.) T.G. Hartley) có hoạt tính kháng khuẩn đối với *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Enterococcus faecalis*. Bên cạnh đó, cao chiết cây thuốc có khả năng kích thích tăng sinh nguyên bào sợi và tế bào keratin cũng như kháng viêm *in vitro* thông qua sự ức chế đại thực bào sinh Nitric oxide (NO). Thử nghiệm khả năng làm lành vết thương trên mô hình động vật cho thấy cao chiết cây Ba chạc kích thích hình thành vảy vết thương.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ đề tài mã số B2014-18-04. Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn sự hỗ trợ của Ban quản lý Vườn Quốc gia Bidoup, Núi Bà, Lâm Đồng trong công tác khảo sát, thu mẫu. Xin ghi nhận sự đóng góp của Nguyễn Trọng Hoà và các thành viên trong nhóm nghiên cứu CNG-UD cho thành công của nghiên cứu này.

Evaluating the wound healing ability of *Melicope pteleifolia* (Champ. Ex Benth.) T.g. Hartley

- Nguyen Thi Thanh Nhan
- Nguyen Minh Can
- Tran Linh Thuoc
- Dang Thi Phuong Thao

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Melicope pteleifolia (Champ. ex benth.) T.g. Hartley, a folk medicinal plant, is used by ethnic minorities in Bidoup–Nui Ba National Park, Lam Dong Province, Vietnam to treat effectively wound, inflammation and skin ulcer. To scientifically prove the claimed utilization and understand the mechanism of action of the plant, the *in vitro* and *in vivo* healing properties of the extract and fractions of the plant were investigated. The ethanol 70 % extract (50 – 400 mg/mL), aqueous (200 mg/mL), ethyl acetate (100 mg/mL) and petroleum ether (50 mg/mL) fractions were used to evaluate the antibacterial activities by using agar diffusion method. The healing properties were *in vitro* investigated through

fibroblasts and keratinocytes proliferation and migration (7.8 μ g/mL to 250 μ g/mL in accordance with each extract and fraction). Besides, the macrophage-induced inhibition of the nitric oxide (NO) production was examined (15.6 – 62.5 μ g/mL). In addition, the excision wound model was used to test the wound healing activity on mice model. We found that the ethanol extract and the ethyl acetate fraction showed potent activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The extract and fractions stimulated fibroblasts and keratinocytes proliferation in a concentration-dependent way. They also inhibited macrophage produce NO. In addition, mice

treated by the extract formed scabs on wound excision of mice model faster than the control group. The wound healing efficiency seems to involve

antibacterial, stimulating fibroblasts and keratinocytes proliferation, inhibition of macrophages produce NO.

Keywords: *Melicope pteleifolia*, antibacterial, anti-inflammatory, proliferation, wound healing

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C.L. Sumei Li, F. Liu, S. Lee, Q. Guo, R. Li, Y. Liu, Herbs for medicinal baths among the traditional Yao communities of China. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 1, 59–67 (2006).
- [9]. K. Panyaphu, T.V. On, P. Sirisa-ard, P. Srisa-nga, S. ChansaKaow, S. Nathakarnkitkul, Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women, *J Ethnopharmacol*, 135, 2, 226–37 (2011).
- [10]. K. Shaari et al., Bioassay-guided identification of an anti-inflammatory prenylated acylphloroglucinol from *Melicope pteleifolia* and molecular insights into its interaction with 5-lipoxygenase. *Bioorg Med Chem*, 19, 21, 6340–7 (2011).
- [11]. F. Abas, N.H.L., D.A. Israf, S. Khozirah, Y. Umi Kalsom, Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malaysia traditional vegetables. *Food Chemistry*, 95, 4, 566–573 (2006).
- [12]. F. Abas, K.S., D.A. Israf, Suryati Syafri, Zurina Zainal, Nordin H. Lajis, LC–DAD–ESI–MS analysis of nitric oxide inhibitory fractions of tenggek burung (*Melicope pteleifolia* Champ. ex Benth.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 1, 107–112 (2010).
- [13]. M.R. Sulaiman, K. Shaari, S. Khalid, W.M. Shaik Mossadeq, A.S. Mohamad, S. Ahmad, A. Akira, D.I.N. Lajis, Antinociceptive activity of melicope pteleifolia ethanolic extract in experimental animals. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1–6 (2010).
- [14]. Q. Liu, et al., Antifungal activity in plants from Chinese traditional and folk medicine. *J Ethnopharmacol.*, 143, 3, 772–8 (2012).
- [15]. G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M.T. Longaker, Wound repair and regeneration. *Nature*, 453, 7193, 314–21 (2008).
- [16]. B.K. Sun, Z. Siprashvili, P.A. Khavari, Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, 346, 6212, 941–5 (2014).
- [17]. T.K. Hunt, Basic principles of wound healing. *J Trauma*, 30 (12 Suppl), S122-8 (1990).
- [18]. M.B. Witte, A. Barbul, General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*, 77, 3, 509–28 (1997).
- [19]. W.J.H. Liu, Traditional herbal medicine research methods. *A John Wiley & Sons, Inc., Canada*, 27–132 (2011).
- [20]. A.S.a.A. Batra, Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia azedarach* L. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 4, 2, 67–73 (2012).
- [21]. Clinical, Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty - third Informational Supplement M100-S19. Wayne, PA: CLSI. (2013).
- [22]. V. Meerloo, G.J. Kaspers, J. Cloos, Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*, 731, 237-45 (2011).
- [23]. R. Ahmad, A.M. Ali, D.A. Israf, N.H. Ismail, K. Shaari, N.H. Lajis, Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. *Life Sci.*, 76, 17, 1953–64 (2005).
- [24]. E.K. Akkol, I. Sunter, T.F. Erdogan, H. Keles, T.M. Gonenc, B. Kivcak, Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: a

- comparative study. *J Ethnopharmacol*, 139, 2, 478–84 (2012).
- [25]. L. Lucas, A. Russell, R. Keast, Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr Pharm Des*, 17, 8, 754–68 (2011).
- [26]. T.A. Rosyid, R.K.N.M. Adzahan, F.M. Ghazali, Antibacterial activity of several Malaysian leaves extracts on the spoilage bacteria of yellow alkaline noodles. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 8, 898–904 (2011).
- [27]. F. O'Donnell, V.N. Ramachandran, T.J. Smyth, W.F. Smyth, P. Brooks, An investigation of bioactive phytochemicals in the leaves of *Melicope vitiflora* by electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, 634,1, 115–20 (2009).
- [28]. M. Chahardehi, A. Ibrahim, Darah, F. Sulaiman, Shaida, Mousavi, Leila, Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Revista de Biología Tropical*, 60, 4, 1567–1576 (2012).
- [29]. W.S. Lall, A.A.C. Akhilesh Bind, Antimicrobial activity of methanolic and acetonic extracts of *Azadirachta indica*, *Saraca asoca* and *Curcuma longa*. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, 3, 2, 79–86 (2013).
- [30]. S.L. Sukanya, J.S.P. Hariprasada, S.R. Niranjana, H.S. Prakash, S.K. Fathima, Antimicrobial activity of leaf extracts of Indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 8, 23, 6677–6682 (2009).
- [31]. J.A. IE Oboh, O. Obasuyi, Antimicrobial activity of the ethanol extract of the aerial parts of *Sida acuta* burm.f. (Malvaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6, 4, 809–813 (2007).
- [32]. M.M. Rafi, P.N. Yadav, A.O. Rossi, Glucosamine inhibits LPS-induced COX-2 and iNOS expression in mouse macrophage cells (RAW 264.7) by inhibition of p38-MAP kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Nutr Food Res.*, 51, 5, 587–93 (2007).
- [33]. P. Bainbridge, Wound healing and the role of fibroblasts. *J. Wound Care*, 22, 8, 407–8, 410–12 (2013).
- [34]. S. Werner, T. Krieg, H. Smola, Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol*, 127, 5, 998–1008 (2007).
- [35]. M. Dikmen, Y. Ozturk, G. Sagratini, M. Ricciutelli, S. Vittori, F. Maggi, Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts. *Phytother. Res.*, 25, 2, 208–14 (2011).
- [36]. J.P. Wang, J.L. Ruan, Y.L. Cai, Q. Luo, H.X. Xu, Y.X. Wu, *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. *J. Ethnopharmacol.*, 134,3, 1033–8 (2011).
- [37]. A.A. Muhammad, N.A. Pauzi, P. Arulselvan, F. Abas, S. Fakurazi, *In vitro* wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. *Biomed. Res. Int.*, 974580 (2013).
- [38]. *Res. Int.*, 974580 (2013).