

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HOÁ VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC CAO CHIẾT XUẤT TỪ LÁ SA KÊ (*ARTOCARPUS ALTILIS* L.)

EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *ARTOCARPUS ALTILIS* L. LEAF EXTRACTS

Đái Thị Xuân Trang, Phan Kim Định, Trần Chí Linh, Trần Thanh Mến,
Nguyễn Kim Đua, Nguyễn Trọng Tuấn*

Trường Đại học Cần Thơ; *trongtuan@ctu.edu.vn

Tóm tắt - Bột lá Sa kê được chiết với methanol, từ cao methanol tách phân đoạn lần lượt với petroleum ether, dichloromethane và ethyl acetate. Kết quả cho thấy cao methanol và ethyl acetate có hàm lượng polyphenol ($547,2 \pm 8,2$ mg GAE/g và $360,9 \pm 1,9$ mg GAE/g) và flavonoid ($764,8 \pm 22,2$ mg QE/g và $770,6 \pm 20,4$ mg QE/g) cao nhất. Kết quả thử nghiệm kháng oxy hóa cho thấy, cao ethyl acetate có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH cao nhất ($EC_{50} = 56,4 \pm 0,2$ μ g/mL), gần tương đương với vitamin C ($EC_{50} = 46,5 \pm 0,7$ μ g/mL) và cũng thể hiện năng lực khử sắt cao hơn các cao còn lại ($OD_{0,5} = 256,7 \pm 13,1$ μ g/mL) so với đối chứng dương là BHA ($OD_{0,5} = 30,2 \pm 0,1$ μ g/mL). Hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch trên 6 dòng vi khuẩn gây bệnh trên người. Kết quả cho thấy, cao methanol và cao ethyl acetate có hoạt tính kháng cả 6 dòng vi khuẩn ($MIC \leq 16$ μ g/mL) và cao hơn các cao còn lại ở cùng nồng độ khảo sát. Kết quả này chứng minh rằng, cao ethyl acetate từ lá Sa kê có khả năng kháng oxy hóa và kháng khuẩn.

Từ khóa - *Artocarpus altilis* L.; flavonoid; kháng khuẩn; kháng oxy hóa; polyphenol

1. Giới thiệu

Các gốc tự do hoạt động chứa oxy (Reactive oxygen species-ROS) như superoxide, hydrogen peroxide, và các gốc tự do hydroxyl có thể gây tổn thương oxy hóa các cấu trúc tế bào, các đại phân tử chức năng như: DNA, protein và lipid [1]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, các gốc tự do là nguyên nhân chính gây ra nhiều bệnh tật, bao gồm: ung thư, viêm, lão hóa, xơ vữa động mạch, ức chế miễn dịch và rối loạn thoái hóa thần kinh [2]. Bên cạnh đó, quá trình hình thành các bẫy ngoại bào (Extracellular traps-ETs) tiêu diệt các loại vi khuẩn, nấm khi xâm nhập vào cơ thể cũng góp phần tạo ra các nhóm oxy phản ứng thúc đẩy quá trình stress oxy hóa tạo ra các gốc tự do [3]. Các nghiên cứu đã chứng minh sự hiện diện của các chất chuyển hóa thứ cấp trong thực vật có khả năng phòng chống các bệnh gây ra do gốc tự do [4]. Việc nghiên cứu các hợp chất tự nhiên từ thực vật có hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn ngày càng được quan tâm, vì tính ứng dụng và an toàn trong điều trị bệnh, cũng như do sự gia tăng đáng báo động của nhiều loài vi khuẩn gây bệnh kháng lại kháng sinh [5].

Cây Sa kê (*Artocarpus altilis* L.) thuộc họ Dâu Tằm, có chứa nhiều chất chuyển hóa thứ cấp thuộc nhóm phenyl propanoids bao gồm flavonoid và flavone [6]. Ngoài ra, cây Sa kê còn được sử dụng trong y học cổ truyền. Hoa được sử dụng để chữa đau răng và rễ của nó được sử dụng để ngăn ngừa chảy máu [7, 8]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã phân lập được các hợp chất có hoạt tính sinh học có khả năng kháng khuẩn [9], kháng nấm [10], kháng sốt rét [11, 12] và gây độc tính tế bào [13, 14]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Trọng Tuấn và cộng sự (CS) đã chứng

Abstract - Powder of *Artocarpus altilis* L. leaves is extracted with methanol followed by fractionizing with petroleum ether, dichloromethane and ethyl acetate. The total polyphenol and flavonoid contents in methanol extract of ($547,2 \pm 8,2$ mg GAE/g and $764,8 \pm 22,2$ mg QE/g, respectively) and in ethyl acetate extract ($360,9 \pm 1,9$ mg GAE/g and $360,9 \pm 1,9$ mg GAE/g, respectively) are higher than those in the other two solvents. Antioxidant assay has shown that, ethyl acetate extract exhibits DPPH scavenging ($EC_{50} = 56,4 \pm 0,19$ μ g/mL) in comparison with vitamin C ($EC_{50} = 46,5 \pm 0,7$ μ g/mL). Furthermore, acetate extract is also the most potential extract in reducing powder method ($OD_{0,5} = 256,7 \pm 13,10$ μ g/mL) compared to BHA ($OD_{0,5} = 30,19 \pm 0,13$ μ g/mL). The antibacterial activity is investigated in 6 bacterial strains which can cause human diseases. The results show that, the methanol and ethyl acetate extract is the most effective antibacterial extracts ($MIC \leq 16$ μ g/mL). This study has proved that, ethyl acetate extract from *Artocarpus altilis* L. leaves possess notable antioxidant and antibacterial activities.

Key words - *Artocarpus altilis* L.; flavonoid; Antibacterial; antioxidant; polyphenol

minh cao chiết lá cây Sa kê tươi có khả năng kháng oxy hóa [15]. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hoạt tính sinh học của các cao chiết xuất từ lá cây Sa kê dựa trên khả năng kháng oxy hóa và kháng một số vi khuẩn gây bệnh của các cao gồm cao methanol (Me), cao phân đoạn petroleum ether (PE), dichloromethane (DC) và ethyl acetate (EA) điều chế từ lá cây Sa kê khô.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Lá của cây Sa kê khô tự rụng được thu tại Cần Thơ được sử dụng cho nghiên cứu này. Các dòng vi khuẩn được sử dụng trong thử nghiệm là: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* 15.100816, *Salmonella typhimurium* 13.100816, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27855 được cung cấp bởi Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Điều chế cao chiết

Mẫu lá Sa kê sau khi thu về được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Mẫu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm trong methanol (99,7%). Sau 24 giờ dịch chiết được lọc để loại bỏ cặn. Mẫu được ngâm 5 lần (mỗi lần 24 giờ), dịch chiết của các lần ngâm được gom lại, cô quay đuổi dung môi và thu được cao methanol tổng của lá Sa kê. Cao methanol lá Sa kê được tách phân đoạn theo phương pháp phân bố lỏng - lỏng với các dung môi petroleum ether, dichloromethane và ethyl acetate thu được các cao chiết tương ứng [16].

2.3. Định tính thành phần hóa học của cao chiết lá Sa kê

Thành phần hóa học của các cao chiết lá Sa kê gồm: alkaloid, flavonoid, glycoside, tanin, triterpenoid, saponin được định tính sơ bộ bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên [16].

2.4. Định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong các cao chiết lá Sa kê

2.4.1. Định lượng polyphenol toàn phần bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu

Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp của Singleton và CS [17] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250 μ L cao chiết trong 250 μ L nước và 250 μ L thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều. Sau đó, thêm vào 250 μ L Na_2CO_3 10%, ủ 30 phút ở 40°C trong bể điều nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm bằng máy đo quang phổ 96 giếng (Thermo Scientific, Phần Lan). Acid gallic được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Hàm lượng polyphenol trong các cao chiết lá Sa kê được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn acid gallic.

2.4.2. Phương pháp định lượng flavonoid

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp so màu AlCl_3 của Bag và CS [18] có hiệu chỉnh. Hòa tan 1 mL cao chiết ở nồng độ khảo sát với 1 mL nước rồi thêm vào 200 μ L NaNO_2 5%, để yên 5 phút, tiếp tục thêm 200 μ L AlCl_3 10%, lắc đều. Hỗn hợp phản ứng sau khi ủ 6 phút được thêm 2 mL NaOH 1M. Cuối cùng nước được thêm vào cho đủ 5 mL và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Quercetin được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các cao chiết lá Sa kê được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

2.5. Khảo sát hoạt động kháng oxy hóa của các cao chiết lá Sa kê in vitro

2.5.1. Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH

Khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết lá Sa kê được xác định bằng phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH của Prakash và CS [19] có hiệu chỉnh, được tóm tắt như sau: Hỗn hợp phản ứng gồm 200 μ L DPPH (6×10^{-4} M) được trộn đều với 200 μ L dung dịch cao chiết lá Sa kê ở các nồng độ: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 và 100 μ g/mL và ủ trong tối ở nhiệt độ phòng 60 phút. Sau khi ủ, độ hấp thụ quang phổ của DPPH được đo ở bước sóng 517 nm. Khả năng kháng oxy hóa được xác định dựa vào hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH và giá trị EC_{50} (Effective concentration of 50%). Hiệu suất phản ứng được tính dựa vào tỷ lệ giảm độ hấp thụ quang phổ ở 517 nm của DPPH khi không có và có ủ với chất kháng oxy hóa (cao chiết hoặc vitamin C). Giá trị EC_{50} được tính dựa trên phương trình tuyến tính của từng loại cao khảo sát. Chất đối chứng dương được sử dụng là vitamin C ở các nồng độ khảo sát: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50 μ g/mL.

2.5.2. Khảo sát năng lực khử sắt (RP)

Năng lực khử sắt của các cao chiết lá Sa kê được thực hiện theo phương pháp của Oyaizu [20]. Hỗn hợp phản ứng lần lượt gồm 0,5 mL cao chiết lá Sa kê ở các nồng độ khảo sát (100, 200, 300, 400, 500, 600 và 700 μ g/mL), 0,5 mL đệm phosphate (0,2 M, pH 6,6) và 0,5 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%.

Sau khi hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50°C trong 20 phút, thêm 0,5 mL CCl_3COOH 10% rồi ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch sau khi ly tâm được rút 0,5 mL cho vào 0,5 mL nước và 0,1 mL FeCl_3 0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm. Butylated hydroxyanisole (BHA) được sử dụng như chất đối chứng dương khảo sát ở các nồng độ: 0, 10, 20, 40, 60, 80 và 100 μ g/mL.

2.6. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết lá Sa kê

Khả năng kháng khuẩn của các cao chiết lá Sa kê được xác định dựa trên sự hình thành vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch nhỏ cao chiết. Dịch vi khuẩn với mật độ 10^6 CFU/mL được trải đều trên bề mặt đĩa thạch LB với thể tích dịch khuẩn là 100 μ L. Tiến hành đục lỗ và nhỏ vào giếng thạch 50 μ L cao chiết lá Sa kê ở các nồng độ 8, 16, 32, 64 và 128 μ g/mL. Đường kính vòng kháng khuẩn (không tính đường kính giếng thạch 7 mm) được đo bằng thước đo đơn vị mm sau 24 giờ ủ mẫu ở nhiệt độ 32°C.

2.7. Thống kê phân tích số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel 2013. Phân tích ANOVA và so sánh trung bình bằng chương trình Minitab 16.0.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả định tính thành phần hóa học trong các cao chiết lá Sa kê

Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học của các cao chiết lá Sa kê cho thấy, sự có mặt của các thành phần có hoạt tính sinh học khác nhau được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học có trong các cao chiết lá Sa kê

Hợp chất	Me	PE	DC	EA
Tanin	+	+	+	+
Saponin	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+
Alkaloid	+	+	+	+
Triterpenoid	+	-	+	+
Glycoside	+	-	+	+

Ghi chú: + Có hiện diện; – không hiện diện

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, saponin không hiện diện ở tất cả các loại cao chiết lá Sa kê được khảo sát; các thành phần còn lại như tanin, flavonoid, alkaloid, triterpenoid và glycoside hiện diện ở các phân đoạn cao methanol, dichloromethane và ethyl acetate; trong khi đó cao petroleum ether chỉ chứa tanin, flavonoid và alkaloid. Một số nghiên cứu khác về cây Sa kê cũng cho thấy, cao ethanol cành Sa kê có sự hiện diện của các nhóm chất: phytosterol, glycoside, flavonoid, diterpene. Đồng thời, cao dichloromethane cành Sa kê chỉ có chứa phytosterol và cao hexane chỉ chứa 2 nhóm chất là phytosterol, terpenoid [21]. Như vậy, kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả chứng minh rằng, lá Sa kê cũng chứa nhiều hợp chất sinh học đầy tiềm năng.

3.2. Kết quả định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong các cao chiết lá Sa kê

Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) với chất chuẩn acid gallic trong dãy nồng độ từ 2 đến 10 μ g/mL có phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,161x + 0,0807$

($R^2 = 0,99$). Hàm lượng flavonoid toàn phần (TFC) từ chất chuẩn quercetin trong dãy nồng độ từ 20 đến 120 $\mu\text{g/mL}$ với phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0087x - 0,0069$ ($R^2 = 0,98$). Trên cơ sở các đường chuẩn, xác định được hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong các cao chiết lá Sa kê được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng polyphenol và flavonoid trong các cao chiết lá Sa kê

Phương pháp	Cao chiết			
	Me	PE	DC	EA
TPC (mg GAE/g)	547,2 ^a ±8,2	125,7 ^d ±19,3	204,5 ^c ±16,1	360,9 ^b ±1,9
TFC (mg QE/g)	764,8 ^a ±22,2	443,7 ^b ±21,7	459,7 ^b ±16,6	770,6 ^a ±20,4

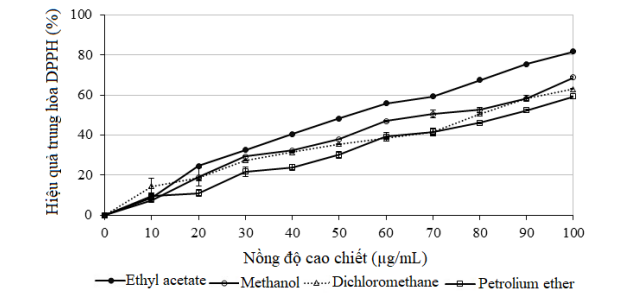
Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một hàng giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% bằng phép thử Fisher.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao methanol và ethyl acetate có hàm lượng polyphenol và flavonoid nhiều hơn các cao petroleum ether và dichloromethane. Hàm lượng polyphenol và flavonoid trong các cao chiết methanol, dichloromethane và hexane của trái Sa kê đã được xác định có chứa hàm lượng polyphenol (781±53,0 mg GAE/g) và flavonoid (6213,3±142,2 mg QE/g) nhiều hơn các cao chiết được khảo sát [22]. Như vậy, trong nghiên cứu này cao methanol lá Sa kê (547,2±8,2 mg GAE/g) cũng được xác định là có hàm lượng polyphenol cao hơn các cao còn lại.

3.3. Kết quả về hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết lá Sa kê in vitro

3.3.1. Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH

Hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết lá Sa kê được xác định dựa vào hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH. Hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH được tính dựa trên tỷ lệ giảm độ hấp thụ quang phổ của DPPH khi có và không có các cao chiết lá Sa kê (Hình 1). Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của các loại cao chiết lá Sa kê và vitamin C được so sánh dựa vào giá trị EC_{50} . Giá trị EC_{50} của các loại cao được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính và trình bày trong Bảng 3.



Hình 1. Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của các cao chiết lá Sa kê

Bảng 3. Giá trị EC_{50} của vitamin C và các cao chiết lá Sa kê

Cao chiết	Phương trình hồi quy	Giá trị EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Vitamin C	$y = 0,9846x + 4,1977$ ($R^2 = 0,9814$)	46,5 ^e ±0,7
Ethyl acetate	$y = 0,7937x + 5,2387$ ($R^2 = 0,9835$)	56,4 ^d ±0,2
Methanol	$y = 0,6416x + 4,5311$ ($R^2 = 0,9754$)	70,9 ^c ±0,3

Dichloromethane	$y = 0,5664x + 6,1333$ ($R^2 = 0,974$)	77,5 ^b ±0,8
Petroleum ether	$y = 0,571x + 1,8845$ ($R^2 = 0,9908$)	84,3 ^a ±0,7

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Kết quả trình bày ở Hình 1 cho thấy, khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết lá Sa kê tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết. Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của các loại cao lá Sa kê giảm dần theo thứ tự như sau: cao ethyl acetate, cao methanol, cao dichloromethane, cao petroleum ether. Trong các loại cao chiết lá Sa kê được khảo sát thì cao ethyl acetate có khả năng kháng oxy hóa cao hơn các cao còn lại ở nồng độ khảo sát từ 20 đến 100 $\mu\text{g/mL}$, hiệu suất kháng oxy hóa của cao ethyl acetate đạt trên 80% ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$. Ngược lại, cao petroleum ether có hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH thấp nhất trong tất cả các loại cao được khảo sát, ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ hiệu suất trung hòa gốc tự do chỉ đạt 59,2±0,1%. Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của hai loại cao còn lại là cao methanol và dichloromethane đều thấp hơn 70%.

Hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết lá Sa kê tăng dần theo thứ tự: ethyl acetate ($EC_{50} = 56,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$), methanol ($EC_{50} = 70,9 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$), dichloromethane ($EC_{50} = 77,5 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) và petroleum ether ($EC_{50} = 84,3 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) (Bảng 3). Trong các cao chiết khảo sát, cao ethyl acetate cho hoạt tính kháng oxy hóa mạnh hơn các cao còn lại và chỉ thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng dương Vitamin C ($EC_{50} = 46,5 \mu\text{g/mL}$). Nghiên cứu trước đó đã chứng minh rằng, flavonoid là các hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh [23]. Trong thí nghiệm này, kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng flavonoid có trong mẫu cao ethyl acetate là cao nhất (Bảng 2). Từ đó cho thấy, kết quả của nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đó. Nếu so sánh với kết quả của các nghiên cứu khác thì cao ethyl acetate lá Sa kê trong thí nghiệm này có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH tương đương cao methanol trái Sa kê ($EC_{50} = 55,0 \pm 5,9 \mu\text{g/mL}$) [22], nhưng yếu hơn cao ethyl acetate lá của một loài thực vật cùng chi là *Artocarpus heterophyllus* ($EC_{50} = 29,3 \mu\text{g/mL}$) [24]. Kết quả nghiên cứu của Tuan và CS [15] đã cho thấy, cao ethyl acetate lá Sa kê tươi có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhất ($EC = 79,39 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$) trong các mẫu cao khảo sát. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của nhóm tác giả, mẫu được thu là lá Sa kê khô tự rụng, có thể thấy lá Sa kê khô tự rụng cho hoạt tính kháng oxy hóa hiệu quả hơn so với lá tươi.

3.3.2. Khảo sát năng lực khử sắt (RP) của cao chiết lá Sa kê

Hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết lá Sa kê dựa trên năng lực khử sắt được tính tương đương $\mu\text{g/mL}$ BHA dựa vào phương trình đường chuẩn BHA: $y = 0,0118x + 0,1448$ ($R^2 = 0,9935$). Kết quả được trình bày trong Bảng 4. Kết quả cho thấy, khả năng khử sắt của các cao chiết lá Sa kê tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết, hàm lượng chất kháng oxy hóa trong các cao lá Sa kê được tính tương đương $\mu\text{g/mL}$ BHA cũng tăng dần theo nồng độ của các cao chiết. Trong các cao chiết được khảo sát, cao ethyl acetate có hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương $\mu\text{g/mL}$ BHA cao nhất, tăng từ 8,8±1,5 $\mu\text{g/mL}$ đến 70,7±0,7 $\mu\text{g/mL}$ từ nồng độ từ 100 $\mu\text{g/mL}$ đến 700 $\mu\text{g/mL}$.

Hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết lá Sa kê theo phương pháp khử sắt ở các nồng độ khác nhau được so sánh với chất chuẩn BHA bằng cách sử dụng nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết có giá trị $\text{OD} = 0,5$ ($\text{OD}_{0,5}$) được trình bày trong Bảng 4. Theo kết quả nghiên cứu cho thấy, năng lực khử sắt của cao ethyl acetate ($\text{OD}_{0,5} = 256,7 \pm 13,1 \mu\text{g/mL}$) là cao nhất nhưng vẫn thấp hơn năng lực khử sắt của BHA ($\text{OD}_{0,5} = 30,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) là 8,5 lần.

Bảng 4. Hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương $\mu\text{g/mL}$ BHA của các cao chiết lá Sa kê

Nồng độ cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương $\mu\text{g/mL}$ BHA			
	Methanol	Petroleum ether	Dichloromethane	Ethyl acetate
100	$3,8^g \pm 0,1$	-	$4,5^g \pm 0,4$	$8,8^g \pm 1,5$
200	$13,2^f \pm 0,7$	$5,8^f \pm 0,2$	$10,4^f \pm 0,7$	$22,6^f \pm 0,5$
300	$25,0^e \pm 0,5$	$15,8^e \pm 0,3$	$22,8^e \pm 0,1$	$38,5^e \pm 0,8$
400	$31,8^d \pm 0,3$	$22,3^d \pm 0,3$	$32,8^d \pm 0,3$	$47,7^d \pm 0,3$
500	$40,2^c \pm 0,2$	$27,2^c \pm 0,6$	$41,3^c \pm 0,5$	$55,4^c \pm 0,4$
600	$49,8^b \pm 0,9$	$31,4^b \pm 0,7$	$49,4 \pm 3,2$	$60,0^b \pm 1,3$
700	$58,1^a \pm 0,9$	$33,8^a \pm 0,9$	$55,9^a \pm 3,2$	$70,7^a \pm 0,7$
$\text{OD}_{0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$380,1 \pm 12,2$	$584,0 \pm 15,4$	$386,4 \pm 14,3$	$256,7 \pm 13,1$
$\text{OD}_{0,5}$ của BHA ($\mu\text{g/mL}$)	$30,2 \pm 0,1$			

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5. (-) là không xác định.

3.4. Kết quả về khả năng kháng khuẩn của các cao chiết lá Sa kê

Hoạt tính kháng khuẩn của 4 loại cao chiết lá Sa kê tương ứng với 4 loại dung môi methanol, petroleum ether, dichloromethane và ethyl acetate được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch trên 6 dòng vi khuẩn gồm: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*. DMSO 1% được dùng làm dung môi để pha loãng cao chiết trong thí nghiệm kháng khuẩn nên cũng được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn tương tự như các cao chiết. Kết quả cho thấy, DMSO 1% không có hoạt tính kháng 6 dòng vi khuẩn thử nghiệm.

Các cao methanol, petroleum ether, dichloromethane và ethyl acetate lá Sa kê thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn qua sự xuất hiện vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch chứa cao chiết. Hiệu quả kháng khuẩn của các loại

cao chiết lá Sa kê và kháng sinh euvioxcin được trình bày ở Bảng 5, Hình 2, Hình 3.

Cao ethyl acetate có hoạt tính kháng vi khuẩn *Escherichia coli* là cao nhất trong 4 loại cao được khảo sát. Trong đó, cao petroleum ether không thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn *E. coli* trong khoảng nồng độ khảo sát từ 8-128 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{MIC} > 128 \mu\text{g/mL}$). Khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* của các cao chiết lá Sa kê đều thấp hơn kháng sinh thương mại euvioxcin. Cao methanol và ethyl acetate lá *Artocarpus heterophyllus* (một loài thực vật cùng chi) đã được khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn *E. coli* tại nồng độ 25000 $\mu\text{g/mL}$ cho đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 6,5 và 8,0 mm [24]. Trong khi đó, cao methanol và ethyl acetate lá Sa kê tại nồng độ 128 $\mu\text{g/mL}$ đã cho đường kính vòng kháng vi khuẩn *E. coli* lần lượt là $7,0 \pm 1,0$ và $7,8 \pm 0,7$ mm. Như vậy, lá Sa kê có hoạt tính kháng vi khuẩn *E. coli* mạnh hơn loài thực vật cùng chi.

Bảng 5. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các cao chiết lá Sa kê

Dòng vi khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)				
	Methanol	Petroleum ether	Dichloromethane	Ethyl acetate	Euvioxcin
<i>E. coli</i>	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} > 128$	$16 < \text{MIC} \leq 32$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$
<i>S. typhimurium</i>	$\text{MIC} \leq 8$	$16 < \text{MIC} \leq 32$	$8 < \text{MIC} \leq 16$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$
<i>L. innocua</i>	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} > 128$	$\text{MIC} > 128$	$8 < \text{MIC} \leq 16$	$\text{MIC} > 128$
<i>B. cereus</i>	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} > 128$
<i>S. aureus</i>	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$
<i>P. aeruginosa</i>	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$	$\text{MIC} \leq 8$

Các cao chiết lá Sa kê đều có hoạt tính kháng vi khuẩn *Salmonella typhimurium* tại các nồng độ khác nhau. Hiệu quả kháng vi khuẩn *S. typhimurium* của các loại cao chiết lá Sa kê theo thứ tự giảm dần như sau: cao ethyl acetate ($\text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$), cao methanol, cao dichloromethane và cao petroleum ether ($16 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 32 \mu\text{g/mL}$). Tuy nhiên, khi so sánh với kháng sinh thương mại thì các cao

chiết lá Sa kê đều có hoạt tính kháng *S. typhimurium* thấp hơn kháng sinh thương mại euvioxcin ở tất cả các nồng độ được khảo sát.

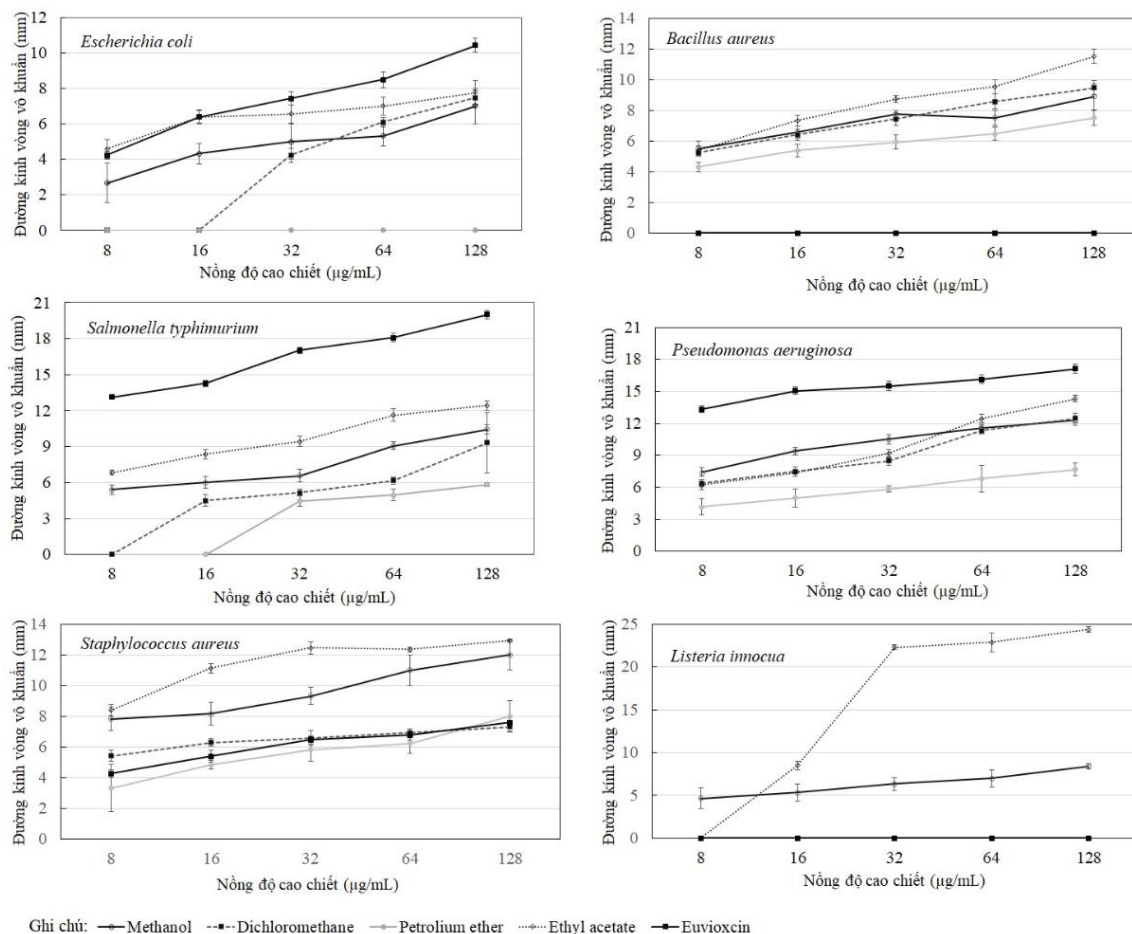
Qua kết quả nghiên cứu trình bày ở Hình 2 và Bảng 5 cho thấy, cao ethyl acetate lá Sa kê có hiệu quả kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* cao nhất trong các cao khảo sát, kể đến là cao methanol. Hiệu quả kháng vi khuẩn

Staphylococcus aureus của cao ethyl acetate và cao methanol cao hơn kháng sinh thương mại evuioxcin ở tất cả các nồng độ được khảo sát. Hiệu quả kháng vi khuẩn *S. aureus* của cao petroleum ether và chlorometane gần tương đương kháng sinh thương mại evuioxcin. Khả năng kháng khuẩn của cao methanol và dichloromethane của cành Sa kê được chứng minh với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) lần lượt là 250 và 500 $\mu\text{g/mL}$ [25]. Trong khi đó, tất cả các cao lá Sa kê được khảo sát trong nghiên cứu này đều có khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus* ở nồng độ 8 $\mu\text{g/mL}$, có nghĩa là nồng độ ức chế tối thiểu nhỏ hơn 8 $\mu\text{g/mL}$.

Trong nghiên cứu này kết quả cho thấy, kháng sinh thương mại evuioxcin không có khả năng kháng dòng vi khuẩn *Bacillus cereus*. Ngược lại, các cao chiết lá Sa kê đều thể hiện hoạt tính kháng ngay nồng độ đầu khảo sát là 8 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$). Trong đó, cao ethyl acetate cho hiệu quả kháng vi khuẩn *B. cereus* cao nhất với đường kính vòng kháng khuẩn từ 5,4 $\pm$ 0,3 đến 11,5 $\pm$ 0,5 $\mu\text{g/mL}$ trong khoảng nồng độ từ 8 đến 128 $\mu\text{g/mL}$. Hiệu quả kháng vi khuẩn *Bacillus cereus* của các cao lá Sa kê theo thứ tự giảm dần như sau: cao ethyl acetate, dichloromethane, methanol và petroleum ether. Nita và CS [24] đã chứng minh, methanol và ethyl acetate lá *Artocarpus heterophyllus* có

hoạt tính kháng vi khuẩn *B. cereus* với đường kính vòng kháng khuẩn tại nồng độ 25000 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt là 7,0 và 6,5 mm nhỏ hơn so với cao methanol (8,9 $\pm$ 0,9 mm) và ethyl acetate (11,5 $\pm$ 0,5 mm) lá Sa kê tại nồng độ 128 $\mu\text{g/mL}$. Như vậy, cao methanol và ethyl acetate của lá Sa kê trong nghiên cứu của nhóm tác giả có hiệu quả kháng vi khuẩn *Bacillus cereus* cao hơn lá của loài thực vật cùng chi là *Artocarpus heterophyllus* trong nghiên cứu trước đó.

Đối với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* thì kháng sinh thương mại evuioxcin cho hiệu quả kháng cao hơn các cao chiết lá Sa kê với đường kính vòng kháng khuẩn tại nồng độ 8 $\mu\text{g/mL}$ là 13,3 $\pm$ 0,3 mm tăng lên 17,1 $\pm$ 0,4 mm tại nồng độ 128 $\mu\text{g/mL}$. Cao methanol, cao dichloromethane và cao ethyl acetate cho hiệu quả kháng vi khuẩn *P. aeruginosa* cao hơn cao petroleum ether. Nhìn chung, các cao chiết lá Sa kê và kháng sinh thương mại đều có giá trị $\text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$, cho đường kính vòng kháng khuẩn tăng dần theo nồng độ cao chiết. Đường kính vòng kháng khuẩn *P. aeruginosa* tại nồng độ 128 $\mu\text{g/mL}$ của cao methanol (12,3 mm) và ethyl acetate (14,3 mm) lá Sa kê trong nghiên cứu này lớn hơn vòng kháng khuẩn tạo ra bởi cao methanol (6,5 mm) và cao ethyl acetate (7,0 mm) lá *Artocarpus heterophyllus* là một loài thực vật cùng chi của cây Sa kê [24].



Hình 2. Hiệu quả kháng từng dòng vi khuẩn của các loại cao chiết lá Sa kê

Trong các loại cao được khảo sát, chỉ có cao methanol ($\text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$) và ethyl acetate ($8 < \text{MIC} \leq 16 \mu\text{g/mL}$) lá Sa kê có hoạt tính kháng vi khuẩn *Listeria innocua*. Cao methanol có thể ức chế sự phát triển của *Listeria nnocua* ngay từ nồng độ 8 $\mu\text{g/mL}$, trong khi đó cao ethyl acetate tại

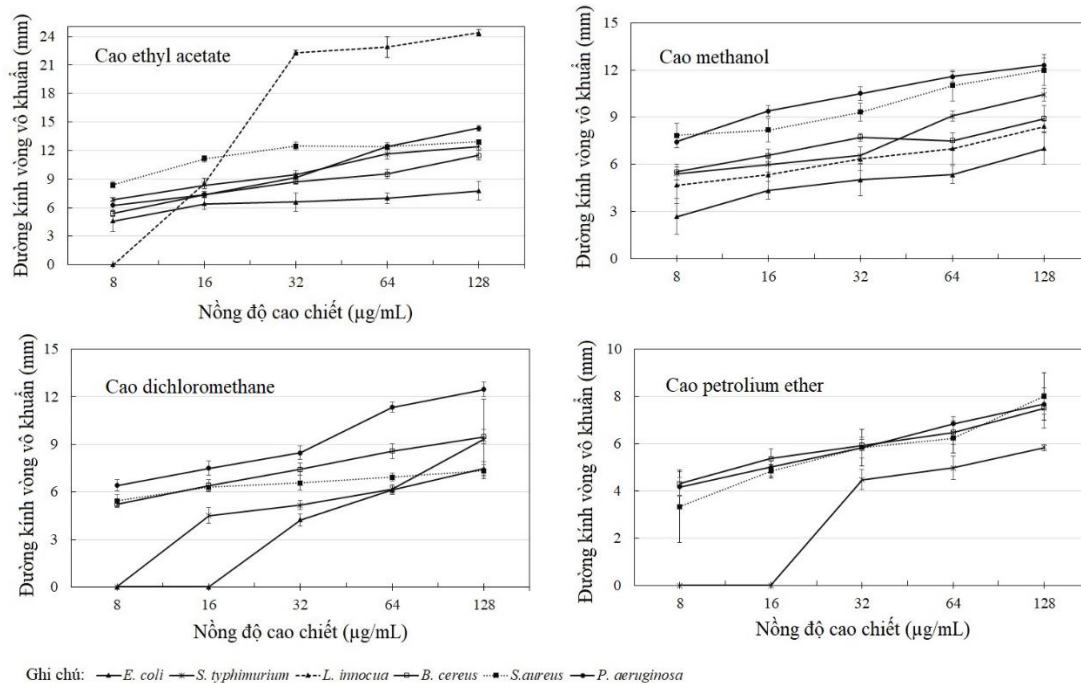
nồng độ 16 $\mu\text{g/mL}$ mới có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn *L. innocua*. Tuy nhiên, cao ethyl acetate tạo ra đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn cao methanol rất nhiều lần; ở nồng độ cao chiết 128 $\mu\text{g/mL}$ đường kính vòng kháng khuẩn được tạo ra bởi cao ethyl acetate và methanol lần lượt

là 24,4 mm và 8,4 mm. Kết quả cũng cho thấy, vi khuẩn *L. innocua* kháng lại kháng sinh thương mại euviocin.

Hiệu quả kháng các dòng vi khuẩn của từng loại cao chiết lá Sa kê (Hình 3) cho thấy, cao ethyl acetate, cao methanol có khả năng kháng lại tất cả 6 dòng vi khuẩn khảo sát trong nghiên cứu này gồm: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Samonella typhirinum*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*; cao dichloromethane có khả năng kháng lại 5 dòng vi khuẩn trừ dòng vi khuẩn *Listeria innocua*; riêng cao petroleum ether không có khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* và vi khuẩn *Listeria innocua*. Xét khả năng kháng từng dòng vi khuẩn thì cao ethyl acetate và cao methanol cũng kháng mạnh hơn các cao còn lại.

Kết quả phân tích thành phần hóa học cho thấy, các cao lá Sa kê đều chứa các thành phần hóa học tanin, alkaloid và flavonoid đây là các thành phần hóa học được chứng minh có

khả năng kháng oxy hóa [26] và kháng khuẩn [27]. Trong nghiên cứu của nhóm tác giả cho thấy, khả năng kháng oxy hóa cũng như khả năng kháng khuẩn của phân đoạn cao ethyl acetate và cao methanol lá Sa kê luôn cao hơn các cao còn lại trong thí nghiệm. Điều này phù hợp với kết quả định lượng flavonoid toàn phần và polyphenol tổng trong hai loại cao này cũng cao hơn các cao còn lại (Bảng 2). Hoạt tính kháng oxy hóa cũng như kháng khuẩn của phân đoạn cao petroleum ether lá Sa kê đều thấp hơn khi so sánh với các cao khác trong nghiên cứu, điều này cũng có thể do hàm lượng flavonoid và polyphenol có trong phân đoạn cao petroleum ether thấp hơn các phân đoạn khác (Bảng 2). Khi đối chiếu với kết quả định tính thành phần hóa học (Bảng 1) thì cao petroleum ether của lá Sa kê không chứa triterpenoid và glycoside. Đây cũng các hợp chất tự nhiên có trong các cây thuốc được các nghiên cứu y dược hiện đại quan tâm như một trong các hợp chất tiềm năng cho các thử nghiệm về hoạt tính sinh học.



Hình 3. Hiệu quả kháng các dòng vi khuẩn của từng loại cao chiết lá Sa kê

4. Kết luận

Các cao chiết từ lá Sa kê khô đều có chứa: flavonoid, alkaloid, tannin. Riêng các cao methanol, dichloromethane, ethyl acetate có chứa thêm triterpenoid, glycoside. Ngoài ra, các cao chiết lá Sa kê khô không có chứa saponin. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) có trong các cao methanol, ethyl acetate, dichloromethane, petroleum ether lần lượt là 547,2±8,2; 360,9±1,9; 204,5±16,1 và 125,7±19,3 mg GAE/g. Hàm lượng flavonoid toàn phần (TFC) có trong các cao methanol, ethyl acetate, dichloromethane, petroleum ether lần lượt là 764,8±22,2; 770,6±20,4; 459,7±16,6; 443,7±21,7 mg QE/g. Hiệu quả kháng oxy hóa của cao ethyl acetate ($EC_{50} = 56,4 \pm 0,2$ µg/mL và $OD_{0,5} = 256,7 \pm 13,1$ µg/mL) là tốt nhất trong 4 loại cao chiết được khảo sát. Ngược lại, hiệu quả kháng oxy hóa của cao petroleum ether thấp nhất ($EC_{50} = 84,3 \pm 0,7$ µg/mL và $OD_{0,5} = 584,0 \pm 3,6$ µg/mL). Hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát cũng cho thấy, cao ethyl acetate và methanol có thể kháng được cả 6 dòng vi khuẩn

Escherichia coli, *Bacillus cereus*, *Samonella typhirinum*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* trong khoảng nồng độ được khảo sát từ 8 đến 128 µg/mL. Kết quả khảo sát là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm ra các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính tốt chữa bệnh trên người.

Lời cảm ơn – Nghiên cứu này được tài trợ bởi Dự án nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, 408(6809), 2000, 239-247.
- [2] S. Chanda, M. Kaneria, R. Nair, Antibacterial activity of *Psoralea corylifolia* L. seed and aerial parts with various extraction methods, *Research Journal of Microbiology*, 6(2), 2011, 124-131.
- [3] M. Breitenbach, E. Academic, E. Peter, E. Academic, The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular

- Traps (ETs) in Humans, *Biomolecules*, 5(2), 2015, 702-723.
- [4] G.O. Adeshina, J.A. Onaolapo, J.O. Ehinmidu, L.E. Odama, Phytochemical and antimicrobial studies of the ethyl acetate extract of *Alchornea cordifolia* leaf found in Abuja, Nigeria, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(8), 2010, 649-658.
- [5] V.T.K. Ngăn, N. T. N. Mai, N. T. Hoàng, T. H. Đức và N. Đ. Độ, Khảo sát hàm lượng phenolic tổng, flavonoid tổng, hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết ethanol và methanol của lá và thân rễ cây Cỏ Tranh (*Imperata cylindrica*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 52b, 2017, 16-22.
- [6] T. Nomura, Y. Hano, M. Aida, Isoprenoid-substituted flavanoids from *Artocarpus* plants (Moraceae), *Heterocycles*, 47(2), 1998, 1179-1205.
- [7] K. Kochummen, Moracea in tree flora of Malaya, Vol. 2, Forest Research Institute, Kepong, Malaysia (1987).
- [8] K. Heyne, Useful Plants of Indonesia II, Penerbit Badan Litbang Kehutanan, Jakarta, Indonesia, (1987).
- [9] M.R. Khan, A.D. Omoloso, M. Kihara, Antibacterial activity of *Artocarpus heterophyllus*, *Fitoterapia*, 74, 2003, 501-505.
- [10] B.P. Juliana, C.F. Valdir, F.N. Vania, R.K. Mara, E.B. Daniela, B.C. Alexandrer, Antimicrobial activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum bradiliense* (Clusiaceae/Guttiferae), *Z. Naturforsch Journal*, 59c, 2004, 657-662.
- [11] A. Widyawaruyanti, K.S.K. Subehan, S. Awale, M. Nindatu, N.C. Zaini, D. Syafruddin, New prenylated flavones from *Artocarpus champeden* and their antimalarial activity *in vitro*, *J Nat Med.*, 61, 2007, 410-413.
- [12] C. Boonlaksiri, W. Oonanant, P. Kongsaree, P. Kittakoop, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, An antimalarial stilbene from *Artocarpus integer*, *Phytochem*, 54, 2000, 415-417.
- [13] H.H. Ko, Y.H. Lu, S.Z. Yang, S.J. Won, C.N. Lin, Cytotoxic prenylflavonoid from *Artocarpus elasticus*, *J Nat Prod.*, 68, 2005, 1692-1695.
- [14] Y.M. Syah, L.D. Juliawaty, S.A. Achmad, E.H. Hakim, E.L. Ghisalberti, Cytotoxic prenylated flavones from *Artocarpus champeden*, *Journal Natural Medicine*, 60, 2006, 308-312.
- [15] N.T. Tuấn, M.V. Hiếu, L.T.B. Tuyền, Phân lập các geranyl flavonoid và hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết lá sa kê (*Artocarpus altilis*), *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 22(3), 2017, 91-97.
- [16] N.K.P. Phụng, *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- [17] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Method Enzymol*, 299, 1999, 152-78.
- [18] G.C. Bag, P.G. Devi, T. Bhaigayabati, Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 30(1), 2015, 154-159.
- [19] A. Prakash, F. Rigelhof and E. Miller, Antioxidant activity, *Analytical progress Medallion Laboratories*, 2000, 1-4.
- [20] M. Oyaizu, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Jap J Nutr*, 44, 1986, 307-315.
- [21] P. Sivagnanasundaram and K.O.L.C. Karunanayake, Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus altilis* leaf and stem bark extracts, *Ousl Journal*, 9, 2015, 1-17.
- [22] T.K. Jalal, I.A. Ahmed, M. Mikail, L. Momand, S. Draman, M.L. Isa, M.S. Abdull Rasad, M. Nor Omar, M. Ibrahim, R. Abdul Wahab, Evaluation of antioxidant, total phenol and flavonoid content and antimicrobial activities of *Artocarpus altilis* (breadfruit) of underutilized tropical fruit extracts, *Appl Biochem Biotechnol*, 175(7), 2015, 3231-3274.
- [23] G.B. Bubols, D.R. Vianna, A. Medina-Reimon, V.G. Poser, R.M. Lamuela-Raventos, V.L. Eifler-Lima, S.C. Garcia. The antioxidant activity of coumarins and flavonoid. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13, 2013, 318-334.
- [24] T. Nita, T. Pratiksha, B. Jay, N. Prasodhan, S. Nikita, S.G. Bhupal, Study of Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Artocarpus heterophyllus*, *Nepal Journal of Biotechnology*, 4(1), 2016, 47-53.
- [25] K. Tara, A. Muzammil, M.N. Omar, Evaluation of antimicrobial activity of *Artocarpus altilis* on pathogenic microorganisms, *Science Series Data Report*, 4(9), 2012, 41-48.
- [26] P.G. Pietta, Flavonoid as antioxidants, *J Nat Prod*, 63(7), 2000, 1035-1042.
- [27] P. Luisa, G. Irene, Antimicrobial Properties of Flavonoid, *Dietary Phytochemicals and Microbes*, 2012, 33-91.

(BBT nhận bài: 27/3/2019, hoàn tất thủ tục phản biện: 23/11/2019)