

# NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ LÁ VỎI VÀ THỬ NGHIỆM TẠO BỘT LÁ VỎI HÒA TAN

## TO INVESTIGATE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT OF *CLEISTOCALYX OPERCULATUS* LEAVES AND INITIALLY MAKE SOUBLE POWDER

Ngô Thái Bích Vân<sup>1\*</sup>, Trần Thị Thu Hiền<sup>2</sup>, Phan Thị Trâm Anh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng

<sup>2</sup>Sinh viên lớp 16SH, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng

<sup>3</sup>Sinh viên lớp 15SH, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng

\*Tác giả liên hệ: ntbvan@dut.udn.vn

(Nhận bài: 28/10/2020; Chấp nhận đăng: 15/01/2021)

**Tóm tắt** - Nghiên cứu này nhằm khảo sát khả năng kháng khuẩn của cao chiết nước và cao chiết ethanol từ lá vối (*Cleistocalyx operculatus*) thu hái tại Quảng Nam lên bốn chủng gây bệnh thường gặp. Kết quả cho thấy cao etanol có hiệu quả ức chế vi khuẩn tốt hơn cao nước, với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của trên hai chủng vi khuẩn *L. monocytogenes*, *S. aureus* là 0,4 mg/ml, đối với *E. coli* là 1,6 mg/ml và *Salmonella* sp là 3,125 mg/ml. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của hai loại cao chiết cũng được khảo sát, cho thấy các cao của lá vối phơi khô và lá vối ủ đều có khả năng kiềm hãm sự phát triển của các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Đây là công bố đầu tiên về tính kháng khuẩn của lá vối trồng tại Quảng Nam. Ngoài ra, nhóm tác giả đã tạo bột lá vối hòa tan giữ được màu xanh và có khả năng kháng khuẩn cao. Kết quả thử nghiệm là cơ sở khoa học cho việc tạo các sản phẩm có hoạt tính sinh học từ lá vối.

**Từ khóa** - Cao chiết; lá vối; kháng khuẩn; *E. coli*; *Staphylococcus aureus*

### 1. Đặt vấn đề

Việc lạm dụng kháng sinh trong thời gian dài đã làm cho số lượng vi khuẩn đa kháng thuốc tăng cao. Và sự kháng kháng sinh của các dòng vi khuẩn gây bệnh hiện nay là một mối lo ngại lớn [1]. Trong nhiều năm, thực vật đã được công nhận là nguồn tự nhiên của các hợp chất hoạt tính sinh học với tiềm năng đầy hứa hẹn trong việc điều trị các bệnh do nhiễm khuẩn. Thực vật rất giàu chất chuyển hóa thứ cấp, nhiều chất đã được phát hiện có hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* [2].

Ở Việt Nam, đặc biệt là khu vực miền Bắc và Bắc Trung Bộ, cây vối (*Cleistocalyx operculatus*) được trồng nhiều để lấy lá làm trà uống (thường gọi nước vối), hoặc lá phơi khô dùng làm thuốc trị rối loạn tiêu hóa hoặc làm thuốc chống nhiễm trùng da. Nhiều nghiên cứu trên mô hình tế bào (*in vitro*) hay trên chuột (*in vivo*) đã chứng minh vối có hoạt tính sinh học cao như kháng ung thư, làm chậm phát triển khối u [3], có hiệu quả trong điều trị huyết áp và hoạt động tim mạch [4]. Theo nghiên cứu của Bui TG và cs, tinh dầu chiết xuất từ nụ vối có khả năng điều trị vết bỏng [5].

Như vậy, các nghiên cứu trong và ngoài nước đã cho thấy những hoạt tính sinh học của các hợp chất chiết xuất từ lá và nụ vối. Tuy nhiên, khả năng kháng lại vi khuẩn, đặc

**Abstract** - This study aimed to investigate the antibacterial ability of aqueous and ethanol extracts of the Robusta leaves (*Cleistocalyx operculatus*) collected in Quang Nam on four common pathogenic strains. The results showed that ethanolic extract has higher effect than aqueous one, its minimum inhibitory concentration (MIC) on *L. monocytogenes*, *S. aureus* is 0.4 mg/ml, on *E. coli* is 1.6 mg/ml and on *Salmonella* sp is 3.125 mg/ml. The minimum bactericidal concentration (MBC) of these two extracts were also identified, showing that all the extracts of the dried and incubated leaves were able to inhibit the growth of the tested bacterial strains. This is the first report about the antibacterial properties of the leaves grown in Quang Nam. And we initially made the soluble powder which retains its green color and have antibacterial activity. These results are the prerequisites for production of bioactive products from the Robusta leaves.

**Key words** – Extracts; *Cleistocalyx operculatus*; antibacterial activity; *E. coli*; *Staphylococcus aureus*

biệt là trên các chủng vi khuẩn như *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) và *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) của lá vối được trồng tại khu vực Quảng Nam - Đà Nẵng vẫn chưa được công bố. Vì vậy, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành khảo sát khả năng kháng khuẩn và xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory concentration – MIC), nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (minimum bacterial concentration – MBC) của các cao chiết lá vối sử dụng dung môi nước và ethanol trên các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Escheria coli* (*E. coli*) và *Salmonella* sp. Bên cạnh đó, nhóm tác giả thử nghiệm qui trình tạo bột lá vối có khả năng tan tốt trong nước, lá vối được làm lạnh ở 5°C là tốt nhất để đem sản xuất thử nghiệm bột lá vối hòa tan. Sau khi có sản phẩm tiếp tục đem thử hoạt tính sinh học. Kết quả cho thấy, tất cả các loại cao chiết và bột lá vối hòa tan đều có hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn nêu trên.

### 2. Vật liệu và phương pháp

#### 2.1. Vật liệu:

##### 2.1.1. Lá vối

Lá vối được thu hái tại xã Điện an, huyện Điện Bàn, tỉnh Quảng Nam vào tháng 8-11/2019.

<sup>1</sup> The University of Danang - University of Science and Technology (Ngo Thai Bich Van)

<sup>2</sup> Student of class 16SH, The University of Danang - University of Science and Technology (Tran Thi Thu Hien)

<sup>3</sup> Student of class 15SH, The University of Danang - University of Science and Technology (Phan Thi Tram Anh)

• Lá vôi phơi khô (PK): Lá vôi được phơi nắng từ 2- 3 ngày cho đến khi khô giòn, lược bỏ cuống và gân lá rồi xay thành bột.

• Lá vôi ủ: Lá vôi được ủ với rơm rạ cho đến khi đen đều, để ráo rồi xay thành bột.

### 2.1.2. Chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu gồm có: *Salmonella* sp, *E. coli*, *L. monocytogenes* và *S. aureus* được cung cấp bởi Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2 (Quatest 2), được nuôi cấy và bảo quản tại phòng thí nghiệm bộ môn Công nghệ sinh học - khoa Hóa - Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng.

### 2.1.3. Hóa chất

Dung môi ethanol tuyệt đối được cung cấp bởi công ty Chemsol (Việt Nam).

Thuốc thử Resazurin (Sigma) 0,015%: Hòa tan 0,015g thuốc thử trong 100 ml nước cất hai lần, bảo quản ở 40C, tránh ánh sáng trực tiếp.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp thu nhận cao thô

#### a. Phương pháp thu nhận cao thô etanol

Các bột lá phơi khô và ủ được ngâm dầm trong ethanol tuyệt đối (EtOH) với tỉ lệ 1:3 (w/v). Sau 3 ngày, lọc và thu dịch chiết. Phần bột lá còn lại được tiếp tục ngâm trong EtOH (2 lần, 3 ngày/lần). Tất cả các dịch chiết được cô quay chân không 50 vòng/phút ở 50°C để loại bỏ dung môi và thu cao thô etanol. Hiệu suất thu nhận cao tổng được tính là tỉ lệ % cao thu được so với khối lượng khô của mẫu.

#### b. Phương pháp thu nhận cao nước

Các bột lá phơi khô và ủ được ngâm dầm trong nước cất với tỉ lệ 1:50 (w/v). Sau 1 ngày, lọc và thu dịch chiết. Phần bột lá còn lại tiếp tục ngâm trong nước cất (2 lần, 1 ngày/lần). Tất cả các dịch chiết được cô quay chân không 50 vòng/phút ở 60°C để loại bỏ hết nước và thu cao nước.

### 2.2.2. Phương pháp đục lỗ thạch

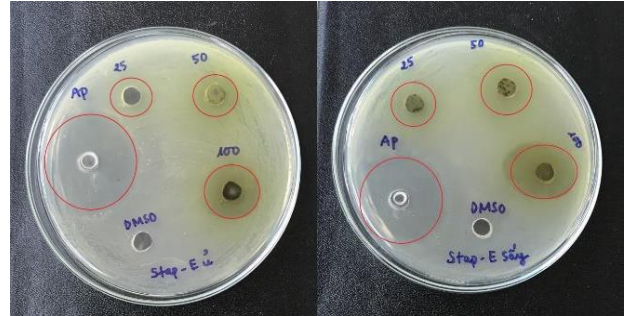
Trải đều 100µl dịch vi khuẩn (nồng độ  $10^8$  CFU/ml) trên môi trường thạch Buffered Pepton Water (BPW). Nhỏ lần lượt 50µl dịch cao chiết (50 mg/ml) vào các lỗ thạch (đường kính 6 mm) trên đĩa, nuôi ở 37°C, trong 24 giờ. Kháng sinh Ampicillin (50mg/ml) được sử dụng làm chứng dương, chứng âm là dung môi Dimethyl sulfoxide (DMSO) đối với cao etanol, và nước đối với cao nước. Khả năng ức chế vi khuẩn của cao chiết được xác định bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn tạo ra xung quanh lỗ thạch.

### 2.2.3. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết

Trong thí nghiệm này, các cao chiết này được pha loãng bậc 2 từ nồng độ ban đầu là 50 mg/ml trong nước (đối với cao nước) và trong DMSO (đối với cao etanol). Dịch vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm và được pha loãng ở mật độ  $10^6$  CFU/ml. Cho vào mỗi giếng gồm 50µl dịch vi khuẩn và 50µl dịch cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau. Các giếng đối chứng chứa dịch vi khuẩn và môi trường. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Ủ ở 37°C, qua đêm. Sau 24 giờ, thêm 30µl thuốc thử resazurin 0,015% được cho vào mỗi giếng. Ủ ở 37°C và quan sát sự đổi màu của hỗn hợp

trong giếng. Giá trị MIC là nồng độ thấp nhất trong dãy thử nghiệm của các cao chiết có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (giếng không làm đổi màu resazurin) [6].

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định bằng phương pháp trải đĩa: 100µl dịch thử nghiệm trên các giếng không có sự đổi màu resazurin sẽ được trải lên các đĩa thạch chứa môi trường BPW và được ủ ở 37°C, sau 24 giờ quan sát việc tạo thành khuẩn lạc. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của các cao chiết có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn.



**Hình 1.** Hình ảnh vòng kháng khuẩn của cao etanol lá vôi ủ (a) và phơi khô (b) đối với vi khuẩn *S. aureus*

### 2.2.4. Phương pháp tạo bột lá hòa tan

Để giữ được màu xanh của lá, nhóm tác giả thử nghiệm làm khô lá bằng các phương pháp khác nhau: (1) Lá sau khi thu hái, rửa sạch và làm khô nhiệt độ thấp (5°C và -20°C); (2) Đông khô lá bằng thiết bị đông khô. Sau đó, lá được nghiền mịn để thu bột lá. Hòa tan bột trong nước ấm và đánh giá độ hòa tan. Khả năng kháng khuẩn của bột lá được kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Hiệu suất thu hồi cao thô

Theo qui trình nghiên cứu được liệu của Viện Ung thư quốc gia của Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI), các loài thực vật được tách chiết cao thô (hay còn gọi là cao tổng) bằng hai loại dung môi khác nhau là nước và hỗn hợp methanol:diclorometan (1:1). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả sử dụng etanol vì dung môi này được đánh giá an toàn cho sức khỏe và môi trường, đồng thời đây được xem là loại dung môi toàn năng, có thể tách chiết được đa dạng các hợp chất trong thực vật [7].

Lá vôi ngoài việc được phơi khô và hãm lấy nước thì ở một số địa phương, người dân thường ủ lá trong rơm rạ cho đến khi lá đen và nấu nước uống. Vì vậy, nhóm tác giả sử dụng cả hai loại lá phơi khô (PK) và lá ủ (U) cho quá trình chiết cao thô trong hai dung môi là nước, etanol tuyệt đối.

**Bảng 1.** Hiệu suất thu hồi các loại cao thô

Mẫu bột lá	Dung môi	Hiệu suất (%)
Cao lá vôi phơi khô	Nước	10,8
	Ethanol	2,3
Cao lá vôi ủ	Nước	16,7
	Ethanol	2,1

Kết quả thu nhận cao thô cho thấy cao nước có hiệu suất thu hồi cao hơn cao etanol (Bảng 1) do trong quá trình ngâm dầm etanol đã bay hơi một cách đáng kể.

**3.2. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch.**

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành khảo sát trên hai chủng Gram âm: *E. coli* và *Salmonella sp*, hai chủng Gram dương: *L. monocytogenes* và *S. aureus*. Đây là những vi khuẩn gây bệnh thường gặp như tiêu chảy, ngộ độc thực phẩm, nhiễm trùng da, lở loét. Để đánh giá khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết, nhóm tác giả sử dụng phương pháp đục lỗ thạch (Mục 2.2.2). Đường kính vòng vô khuẩn tăng dần theo nồng độ của cao thô (25mg/ml, 50mg/ml và 100 mg/ml) (Hình 1). Kết quả cho thấy cao etanol của lá phơi khô có tác dụng kháng lại bốn chủng vi khuẩn thử nghiệm cao hơn các cao còn lại (Bảng 2). Và kết quả đường kính vòng kháng khuẩn trên *S. aureus* là cao nhất so với các chủng vi khuẩn khác.

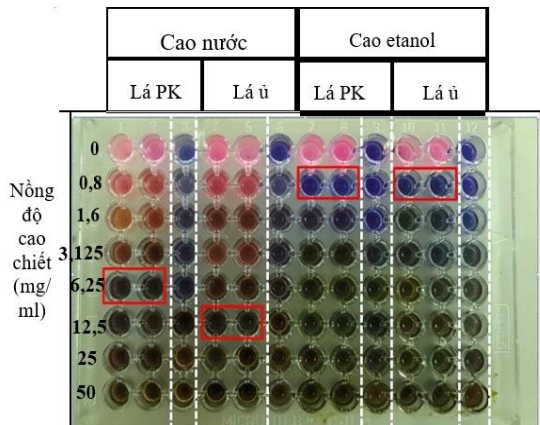
**Bảng 2. Kết quả đường kính vòng vô khuẩn (mm) của các loại cao chiết ở nồng độ 100 mg/ml**

	Dung môi	Chủng vi khuẩn			
		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>S. aureus</i>
Lá phơi khô	Nước	9,7±0,6	10,0±0,0	8,7±0,6	11,3±0,6
	Etanol	10,7±0,6	12,0±0,0	12,0±0,0	12,3±0,6
Lá ủ	Nước	9,3±0,6	9,3±0,6	10,3±0,6	11,0±0,0
	Etanol	10,0±0,0	10,3±0,6	11,3±0,6	11,7±0,6

**3.3. Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết (MIC)**

Để có thể so sánh và đánh giá cụ thể hơn về tác động của các loại cao chiết trên chủng vi khuẩn thử nghiệm, nhóm tác giả tiến hành xác định giá trị MIC trên môi trường lỏng bằng cách bổ sung chất chỉ thị màu Resazurin. Sự đổi màu của chất chỉ thị này theo thời gian phụ thuộc vào hoạt động của vi sinh vật. Ban đầu, dung dịch Resazurin có màu xanh, khi bị khử bởi các enzyme trong tế bào vi khuẩn sẽ tạo thành resorufin, có màu hồng [6]. Như vậy, khi vi khuẩn bị ức chế bởi cao chiết, chúng không có khả năng làm đổi màu thuốc thử. Ghi nhận nồng độ thấp nhất của cao chiết tại giếng không có sự chuyển màu của dung dịch resazurin. Giá trị MIC được xác định bằng ½ nồng độ ban đầu của cao chiết tại giếng đó.

Đối với mỗi loại cao chiết ở từng nồng độ nhóm tác giả thử nghiệm trên hai giếng, chứng âm là các giếng không vi khuẩn (được giới hạn bởi đường nét gạch trên Hình 2).



**Hình 2. Kết quả xác định MIC của các cao chiết trên chủng vi khuẩn *S. aureus***

Giá trị MIC của bốn loại cao chiết trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm được trình bày trong Bảng 3. Kết quả cho thấy, cao etanol có hoạt tính kháng khuẩn cao hơn cao nước. Tương tự như kết quả thu được từ phương pháp đục lỗ thạch, các cao chiết lá vối có tác dụng kháng lại các chủng Gram dương tốt hơn Gram âm. Điều này có thể được lí giải dựa trên cấu tạo của vi khuẩn Gram dương không có lớp màng lipopolysaccharide bên ngoài như vi khuẩn Gram âm, do đó các hợp chất dễ dàng thấm qua màng tế bào và ức chế vi khuẩn phát triển.

**Bảng 3. Giá trị MIC (mg/ml) của các loại cao chiết**

1	Dung môi	Chủng vi khuẩn			
		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>S. aureus</i>
Lá phơi khô	Nước	3,125	3,125	6,25	3,125
	Etanol	1,6	0,4	3,125	0,4
Lá ủ	Nước	6,25	6,25	6,25	6,25
	Etanol	0,8	0,4	1,6	0,4

**3.4. Kết quả xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của cao chiết (MBC)**

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) là nồng độ thấp nhất của các cao chiết thực vật có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn trong giếng. Việc xác định đồng thời hai giá trị MIC và MBC cho thấy rõ hơn tác động của cao chiết lên sự sinh trưởng của vi sinh vật.

**Bảng 4. Giá trị MBC (mg/ml) của các loại cao chiết**

	Dung môi	Chủng vi khuẩn			
		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>S. aureus</i>
Lá phơi khô	Nước	12,5	12,5	12,5	12,5
	Etanol	6,25	0,8	6,25	0,8
Lá ủ	Nước	25	12,5	25	12,5
	Etanol	3,125	0,8	3,125	0,8

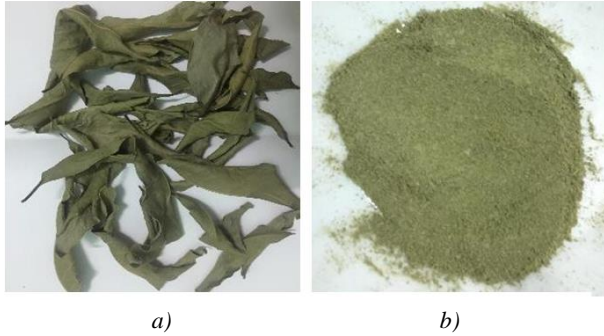
Tương tự như các kết quả trước, ở nồng độ thấp (0,8 mg/ml), cao etanol của lá phơi khô và lá ủ đã tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn *L. monocytogenes* và *S. aureus*. Trong nghiên cứu của Đào Thị Thanh Hiền và cs (2003), tác giả cũng đã chứng minh cao lá vối khô và lá vối ủ có tác động trên *S. aureus* tốt hơn trên *E. coli* [8].

Tính kháng khuẩn của cao chiết lá vối trên *S. aureus*, tụ cầu vàng gây bệnh nhiễm trùng trên da, đã được công bố trước đó [9, 10]. Tuy nhiên, giá trị MIC và MBC của cao chiết vẫn chưa được xác định cụ thể. Đặc biệt, tác động của lá vối trên các chủng *Salmonella sp*, và *L. monocytogenes* lần đầu tiên được khảo sát trong nghiên cứu của nhóm tác giả. Đây là những chủng gây bệnh đường ruột thường gặp ở người. Kết quả nghiên cứu đã làm sáng tỏ việc uống nước sắc lá vối để chữa bệnh tiêu chảy và tắm nước lá vối để chữa viêm da trong dân gian.

**3.5. Thử nghiệm tạo bột lá vối hòa tan**

Người dân thường dùng lá vối được phơi khô hoặc ủ lên men nấu nước uống. Cách làm này mất thời gian và có thể làm giảm hoạt tính sinh học của lá vối. Với mục tiêu hướng đến việc tạo ra các sản phẩm từ lá vối, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả thử nghiệm tạo bột lá vối hòa tan với yêu cầu vẫn giữ được màu xanh của lá và không làm mất hoạt tính kháng khuẩn.

Trong các điều kiện thử nghiệm làm khô lá (Mục 2.2.4), nhóm tác giả thấy rằng, lá vôi được làm lạnh ở 5°C trong 7 ngày vẫn giữ được màu xanh của lá và bột sau khi xay có độ mịn.



a)

b)

Hình 3. Hình ảnh lá vôi làm khô ở 5°C (a) và bột lá (b)

### 3.6. Kết quả kháng khuẩn của bột lá

Tiếp theo, nhóm tác giả cân một lượng nhất định bột lá và hòa trong nước ấm cho đến khi tan hoàn toàn để đạt nồng độ 25 mg/ml, 50 mg/ml và 100 mg/ml. Khả năng ức chế vi khuẩn của bột lá ở các nồng độ khác nhau được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả cho thấy, bột lá vôi hòa tan này vẫn còn giữ được hoạt tính ức chế vi khuẩn (Bảng 5).

Bảng 5. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của bột lá vôi

Chủng vi khuẩn	Nồng độ bột lá (mg/ml)		
	25	50	100
<i>E. coli</i>	7	8	9
<i>L. monocytogenes</i>	9	11	12
<i>Salmonella</i> sp	8	9	10
<i>S. aureus</i>	10	11	12

### 4. Kết luận

Từ kết quả thu được, nhóm tác giả kết luận như sau:

- Các cao chiết từ lá vôi sử dụng dung môi nước và etanol đều có khả năng ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Trong đó, cao etanol có hoạt tính kháng vi khuẩn tốt hơn cao nước.

- Các vi khuẩn Gram dương nhạy với cao chiết lá vôi hơn so với Gram âm.

Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn về cơ chế kháng khuẩn của vôi, đặc biệt trên *S. aureus*

– một trong hai chủng gây tỉ lệ nhiễm trùng cao trong các bệnh viện. Việc chiết tách các hợp chất từ lá vôi có tiềm năng trong tìm ra chất kháng sinh mới.

Bước đầu thử nghiệm cho thấy sấy lạnh là phương pháp thích hợp để tạo bột lá vôi hòa tan và giữ được hoạt tính kháng khuẩn.

**Lời cảm ơn:** Bài báo này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng với nghiên cứu có mã số: T2020-02-25.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lương TMN, Lê TKL, Nguyễn TTL, Nguyễn NQ, Lê TTL, Trương THH, Trần TH, “Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá và hoa dâm bụt *Hibiscus rosa – sinensis* L. lên *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*”, *Tạp chí Phát triển Khoa học & Công nghệ: chuyên san khoa học tự nhiên*, tập 2, số 1, 2018, trang 19-26.
- [2] Trần MN, Đoàn CS, Phạm TA, Đỗ PTT, “Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của nụ vôi (*Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry. Myrtaceae)”, *Tạp chí Dược học* số 422, 2011, trang 35-38.
- [3] Huang H, Niu J, Lu Y, Hua Y, “Multidrug resistance reversal effect of DMC derived from buds of *Cleistocalyx operculatus* in human hepatocellular tumor xenograft model”, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(1), 2012, p135-140.
- [4] Trương TM, Fumie N, Nguyen VC, “Antioxidant activities and hypolipidemic effects of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. and Perry”, *Journal of Food Biochemistry* 33(6), 2009, p790-807.
- [5] Tran GB, Le TNT, Dam SM, “Potential use of essential oil isolated from *Cleistocalyx operculatus* leaves as a topical dermatological agent for treatment of burn wound”, *Dermatology Research and Practice*, 2018 March 5, p1-8.
- [6] Mohamed E, Syed A, Scott F, Paul D, Mark MG, Roger M, and Ibrahim MB, “Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants”, *Biotechnology letter* 38, 2016, p1015- 1019.
- [7] Azwanida NN, “A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation”, *Medicinal & Aromatic Plants* 4(3), 2015, doi:10.4172/2167-0412.1000196.
- [8] Đào TTH, Phạm KT, Lê MH, “Nghiên cứu một số tác dụng sinh học của cây vôi”, *Tạp chí Dược học* (3), 2003, p 22-23.
- [9] Nguyen TD, Kim MJ, Kang SC, Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.033>.
- [10] Nguyen, PTM, Schultze, N, Boger, C, Alresley, Z, Bolhuis, A & Lindequist, U, “Anticaries and antimicrobial activities of methanolic extract from leaves of *Cleistocalyx operculatus* L.”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(1), 2017, p. 43-48.