

# KHẢO SÁT MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA, KHÁNG KHUẨN VÀ KHÁNG NẤM CỦA CAO CHIẾT LÁ BÌNH BÁT NƯỚC (*Annona glabra* L.)

**Lương Phong Dũ\*, Đỗ Thị Phương Dung, Nguyễn Đức Độ**

**\*Tác giả liên hệ:**

**Lương Phong Dũ**

**Email:**

dum0517016@gstudent.ctu.edu.vn

Viện nghiên cứu và phát triển  
CNSH, trường Đại học Cần Thơ

Nhận bài: 21/12/2018

Chấp nhận bài: 12/2/2019

**Từ khóa:** Cao chiết bình bát nước  
(*Annona glabra* L.), Kháng khuẩn,  
Kháng nấm, Kháng oxy hóa, Hàm  
lượng phenol tổng

## **TÓM TẮT**

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá một phần hoạt động kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm của lá bình bát nước (*Annona glabra* L.). Hai nghiệm thức cao chiết lá bình bát nước được ly trích lần lượt trong hai dung môi ethanol và methanol. Kết quả cho thấy hàm lượng phenol tổng lớn nhất ở nghiệm thức lá - methanol (LM) và nhỏ nhất ở nghiệm thức lá- ethanol (LE) với giá trị lần lượt là 37,8 và 31,8 mg GAE/g chiết xuất. Khả năng kháng oxy hóa của các nghiệm thức cao chiết được đánh giá qua khả năng khử gốc tự do DPPH (2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl) và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide). Cao chiết methanol với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 59,03 µg/mL; 139,27 µg/mL cho khả năng kháng oxy hóa mạnh nhất và yếu nhất ở cao chiết ethanol với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 131,47 µg/mL; 156,45 µg/mL so sánh dựa trên IC<sub>50</sub> của vitamin C. Hiệu quả kháng hai dòng vi khuẩn *B. subtilis*, *E. coli* của cao methanol và ethanol khá tốt, vượt trội hơn so với đối chứng dương ampicillin 5 mg/mL. Ngoài ra, cả hai nghiệm thức cao còn thể hiện hiệu quả ức chế dòng nấm *C. albicans* qua phương pháp khảo sát khuếch tán giếng thạch.

## **1. MỞ ĐẦU**

Sự thay đổi liên tục và khả năng đề kháng của mầm bệnh đối với các dược phẩm ngày càng tăng, dẫn đến nhu cầu tìm kiếm những chiết xuất và cơ chế kháng khuẩn, kháng nấm mới tăng lên (Oluwatuyi, 2004). Trong những năm gần đây, nhiều loại thuốc được phân tích và tổng hợp thông qua các phương pháp phân tử và phương pháp hóa học. Tuy nhiên, nguồn nguyên vật liệu từ thực vật vẫn đang chứng tỏ là nguồn vô giá (Iqbal và cs., 2008) do chứa nhiều các nhóm hợp chất thứ cấp như polyphenol, flavonoid, saponin, tannin với sự đa dạng về cấu trúc hóa học nên có khả năng kháng vi sinh vật theo nhiều cơ chế khác nhau (Arancibia-Avila và cs., 2008).

Bình bát nước (*Annona glabra* L.) là một loài thuộc họ Annonaceae đã được nghiên cứu rộng rãi trong những thập kỷ qua, với tiềm năng trị liệu cao do chứa nhiều hợp chất có khả năng kháng oxy hóa, kháng nấm và kháng khuẩn (Padmaja và cs., 1995), kháng giun, kháng viêm (Moghadamtousi và cs., 2015). Ngoài ra ở một số loài thuộc chi *Annona* đã được chứng minh có khả năng diệt ký sinh trùng, tiêu chảy (Pimenta và cs., 2003), sốt rét (Siebra và cs., 2009), kháng lại các tác nhân gây độc tế bào và loãng xương (Hamid và cs., 2012). Tuy nhiên, các nghiên cứu về bình bát nước ở Việt Nam vẫn chưa có nhiều công bố. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm xác định các nhóm hợp chất thực vật có trong lá bình bát nước, hàm lượng phenol tổng, khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn

và kháng nấm của hai loại cao chiết từ methanol và ethanol.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu, hóa chất

Vật liệu: Lá bình bát nước (*Annona glabra* L.) được thu hái từ phường Hưng Phú, quận Cái Răng, thành phố Cần Thơ.

Hóa chất: Các hóa chất cần thiết cho nghiên cứu bao gồm: Ethanol (EtOH, Việt Nam), Methanol (MeOH, Việt Nam), hexane (Việt Nam), ethyl acetate (Việt Nam), acetone (Việt Nam), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan (Trung Quốc), FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (Trung Quốc), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đđ (Trung Quốc), acid gallic (Trung Quốc), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Đức), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Trung Quốc), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Trung Quốc), vitamin C

(Trung Quốc) và một số hóa chất hiện có tại phòng công nghệ Enzyme.

### 2.2. Điều chế cao

Nguyên liệu được xay nhuyễn với dung môi (EtOH hoặc MeOH) tỉ lệ 1:5. Kết hợp sử dụng sóng siêu âm. Sau đó, mẫu được lọc để lấy phần dịch trích và cô quay chân không đến khi bay hơi hết dung môi, tiếp tục sấy mẫu ở 40°C để loại bỏ hoàn toàn ẩm độ, sau đó thu cao chiết và đem trữ đông ở -20°C. Hai loại cao chiết (gọi là nghiệm thức) từ lá bình bát nước bởi ethanol (LE) và methanol (LM) được sử dụng cho các phân tích sau đây.

### 2.3. Phương pháp phân tích

#### 2.3.1. Khảo sát thành phần hợp chất thực vật (HCTV)

Sự hiện diện các hợp chất thực vật được xác định dựa theo mô tả ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Các loại thuốc thử dùng để xác định các HCTV hiện diện trong cao chiết lá bình bát nước

HCTV khảo sát	Thuốc thử	Hiện tượng sau khi phản ứng
Phenol, tannin	FeCl <sub>3</sub> 5%, nước cất	Màu xanh đen
Flavonoid	Pb (OAc) <sub>4</sub> 10%	Màu vàng
Coumarine	NaOH 10%	Màu vàng
Alkaloid	Thuốc thử Wagner	Tủa màu vàng
Quinone	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đđ	Đổi màu
Saponin	Nước cất, dầu olive	Nhũ tương
Streroid	Chloroform, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đđ	Màu đỏ, xanh

Nguồn: Yadav và cs. (2011)

#### 2.3.2. Khảo sát hàm lượng phenol tổng (TPC)

Khảo sát hàm lượng phenol tổng theo mô tả của Yadav và Agarwala (2011) có hiệu chỉnh. Tiến hành ghi nhận kết quả độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng 765 nm.

#### 2.3.3. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa

##### 2.3.3.1. Khả năng khử gốc tự do DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Khảo sát khả năng khử gốc tự do DPPH của hai nghiệm thức LE và LM được thực hiện theo phương pháp của Blois và cs. (1958). Dây nồng độ của hai nghiệm thức (20 đến 140 µg/mL) và vitamin C (2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/mL) được chuẩn bị bằng cách hòa tan với dung môi

methanol. Tại mỗi nồng độ, 1 mL dung dịch được sử dụng để gây phản ứng với 2 mL DPPH 0,1 mM. Mẫu trắng được thực hiện chỉ chứa methanol và DPPH. Sau 30 phút ủ tối, các mẫu được tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. Phần trăm ức chế gốc tự do được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế gốc tự do: DPPH (\%)} = [(A_0 - A)/A_0] \times 100\%$$

Trong đó:

A<sub>0</sub>: Độ hấp thụ của mẫu đối chứng (không chứa cao chiết).

A: Độ hấp thụ mẫu có chứa cao chiết hoặc vitamin C.

Từ phương trình đường chuẩn xây dựng được ta suy ra giá trị IC<sub>50</sub>.

**2.3.3.2. Khả năng khử gốc tự do hydrogen peroxide**

Khảo sát khả năng khử gốc tự do hydrogen peroxide của hai nghiệm thức cao chiết được thực hiện theo phương pháp của Rahate và cs. (2016) có hiệu chỉnh. Dãy nồng độ của các nghiệm thức cao chiết (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 µg/mL) và dãy nồng độ của vitamin C (2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/mL), kèm theo một mẫu đối chứng ở mỗi nồng độ (chuẩn bị tương tự mẫu nhưng không bổ sung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Tại mỗi nồng độ, 1 mL dung dịch (Cao chiết hoặc vitamin C đã hòa tan trong dung dịch đệm phosphate) được sử dụng để gây phản ứng với 2 mL dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM. Sau 30 phút ủ tối, các mẫu được tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 230 nm. Phần trăm ức chế gốc tự do được tính theo công thức:

Phần trăm ức chế gốc hydrogen peroxide (%):  $[(A_0 - A)/A_0] \times 100\%$

Trong đó:

A<sub>0</sub>: Độ hấp thụ của mẫu đối chứng (không chứa cao chiết).

A: Độ hấp thụ mẫu có chứa cao chiết hoặc vitamin C.

Từ phương trình đường chuẩn xây dựng được ta suy ra giá trị IC<sub>50</sub>.

**2.3.4. Khảo sát khả năng kháng khuẩn, kháng nấm**

**a. Chuẩn bị đĩa thạch nuôi cấy**

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn và nấm là môi trường LB (Luria-Bertani) bổ sung Agar và PDA (Potato Dextrose Agar). Môi trường được trải đều các chủng vi khuẩn *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* (mật số 10<sup>6</sup> tế bào/mL) sau khi để nguội và làm ráo. Đĩa tiếp tục được tạo các giếng đường kính 6 mm, sau đó bơm các nghiệm thức cao. Thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

**b. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm**

Bơm 20 mL dung dịch của các nghiệm thức cao (300 mg/mL) vào các giếng trong đĩa thạch cùng với đối chứng dương là ampicillin (5 mg/mL), nystatin (4 mg/mL) và đối chứng âm là DMSO (Dimethyl sulfoxide). Kết quả được theo dõi ít nhất sau 24 giờ nuôi ủ tại 37°C bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn (mm).

Tất cả các nghiệm thức trên đều được bố trí lặp lại 3 lần ngẫu nhiên.

**2.3.5 Phương pháp phân tích và xử lý số liệu**

Kết quả thực nghiệm được nhập liệu bằng Microsoft Excel 2010 và phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab version 16.2.0 (2010). Mỗi thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với ba lần lặp. Sau đó dùng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định Tukey để xác định và so sánh các giá trị trung bình.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Định tính một số hợp chất thực vật trong cao chiết**

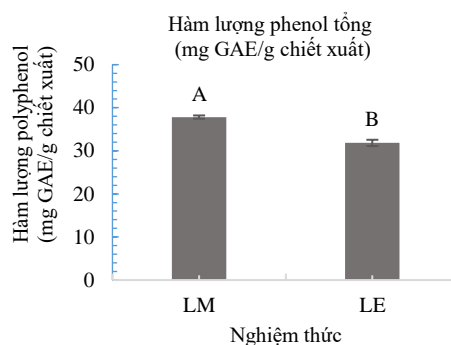
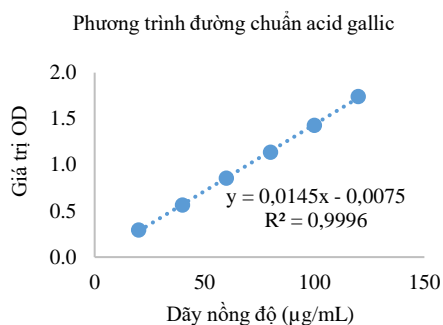
**Bảng 2.** Kết quả xác định các nhóm HCTV hiện diện trong cao chiết

Nghiệm thức	LM	LE
Phenols, tannin	+++	++
Flavonoid	+++	+++
Coumarine	+++	+++
Alkaloid	+++	++
Quinone	+	+
Saponine	+++	+++
Steroid	++	+

(+++) Xuất hiện nhiều kết tủa, (++) Lượng kết tủa trung bình, (+) Xuất hiện ít kết tủa

Từ kết quả Bảng 2, cả hai nghiệm thức cao chiết đều xuất hiện đầy đủ các nhóm hợp chất thực vật như: phenol, tannin, flavonoid, alkaloid, coumarin, quinone, steroid và saponin. Đầu tiên, ở thử nghiệm phenol, tannin, alkaloid và steroidsau khi phản ứng kết thúc, dựa vào màu sắc và kết tủa xuất hiện trong ống nghiệm, nghiệm thức LM cho thấy sự hiện diện các nhóm hợp chất thực vật nhiều hơn so với LE. Theo Zhang (2015), các dung môi khác nhau có sự khác biệt về độ phân cực, phân tán và tính thấm có thể sàng lọc được các chiết xuất hóa học thực vật

khác nhau, nên thành phần các hợp chất thực vật sẽ khác nhau trên cùng một đối tượng khác loại dung môi ly trích. Đối với các thử nghiệm: flavonoid, coumarine và saponinphản ứng kết thúc, dựa vào kết tủa và màu sắc xác định được cả hai nghiệm thức cao đều có sự hiện diện đồng đều các nhóm hợp chất. Theo Ezealisiji và Belema (2017), các bộ phận của loài *Annona muricata* hiện diện nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp như phenol, tannin, alkaloid, flavonoids. Ở đối tượng lá bình bát nước, dung môi methanol cho hiệu quả phân tách nhiều nhóm hợp chất hơn so với dung môi ethanol.



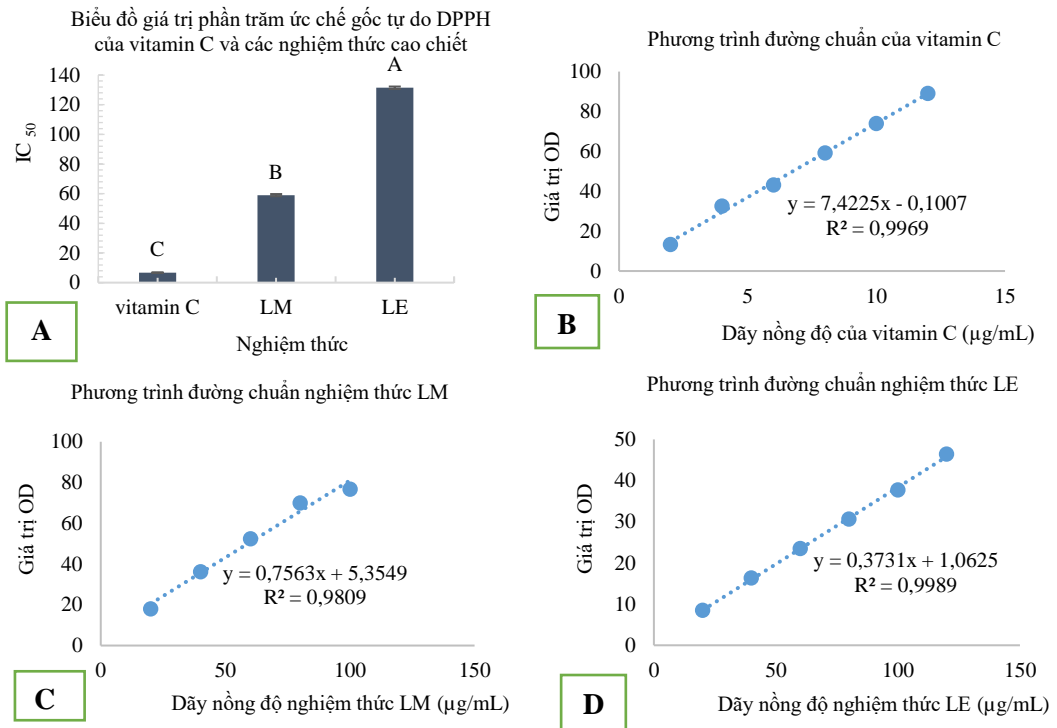
**Hình 1.** Phương trình đường chuẩn gallic acid và biểu đồ so sánh kết quả hàm lượng phenol tổng của hai nghiệm thức cao chiết

### 3.2. Định lượng hàm lượng phenol tổng

Hàm lượng phenol tổng ở hai nghiệm thức LM và LE cao lần lượt là 31,83 và 37,83 mg GAE/g chiết xuất. Nghiên cứu ở loài *Polygonum minus* (Norsyamimi Hassim và cs., 2014), cao chiết methanol 70% cho hàm lượng phenol tổng (11,3±0,06 mg GAE/g chiết xuất) cao hơn hàm lượng phenol tổng từ cao chiết ethanol 70% (8,2±0,07 mg GAE/g chiết xuất), cao chiết methanol 50% cho hàm lượng phenol tổng (10,0±0,06 mg GAE/g chiết xuất) cao hơn hàm lượng phenol tổng từ cao chiết ethanol 50% (7,6±0,08 mg GAE/g chiết xuất), cao chiết methanol 100% cho hàm

lượng phenol tổng (6,5±0,07 mg GAE/g chiết xuất) cao hơn hàm lượng phenol tổng từ cao chiết ethanol 100% (5,1 ± 0,04 mg GAE/g chiết xuất). Một nghiên cứu khác ở loài *Leea indica*, hàm lượng phenol tổng được chiết xuất trong methanol là cao nhất (65,20±0,15 mg GAE/g), tiếp theo là chiết xuất ethanol (60,97±0,23 mg GAE/g) (Ghagane và cs., 2017). Kết quả này cho thấy sự tương đồng khi ly trích lá bình bát nước với dung môi methanol, ngoài sự đa dạng về các nhóm hợp chất hiện diện thì hàm lượng các hợp chất thuộc nhóm polyphenol cũng nhiều hơn so với khi ly trích với dung môi ethanol.

3.2.1. Khả năng khử gốc tự do DPPH



**Hình 2.** (A) Biểu đồ giá trị phần trăm ức chế gốc tự do DPPH của hai nghiệm thức cao chiết và đối chứng đương vitamin C. (B), (C), (D) Phương trình đường chuẩn của LM, LE và vitamin C

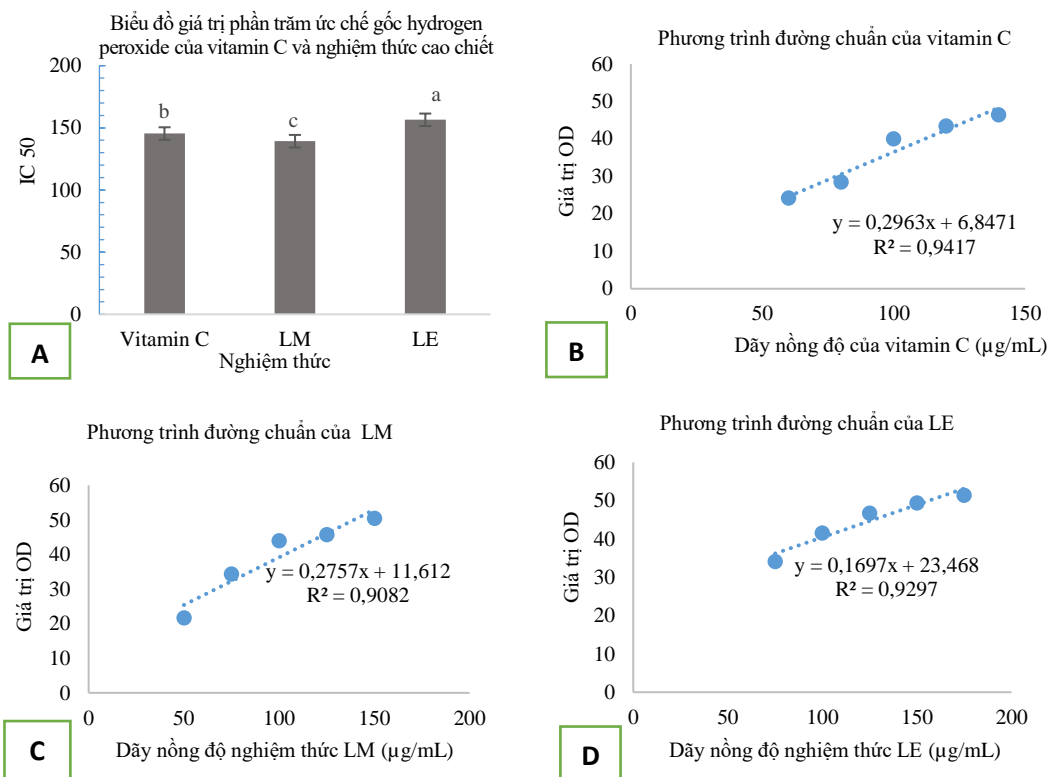
Khả năng khử gốc tự do DPPH của hai nghiệm thức cao chiết được thể hiện thông qua Hình 2 (A). Giá trị IC<sub>50</sub> là thước đo dùng để so sánh khả năng khử gốc tự do giữa hai mẫu cao với đối chứng vitamin C. Giá trị IC<sub>50</sub> càng nhỏ đồng nghĩa nồng độ gốc tự do bị loại đi 50% càng nhỏ và khi đó mẫu khảo sát có khả năng khử gốc tự do càng mạnh. Khi so sánh hai nghiệm thức cao với vitamin C, khả năng oxy hóa của cả hai yếu hơn nhiều so với vitamin C (6,750±0,047 µg/mL). Điều này là hợp lý vì vitamin C là chất kháng oxy hóa tinh khiết trong khi cao chiết lá bình bát là cao thô, chứa nhiều nhóm hợp chất khác nhau có thể tác dụng cộng gộp lẫn nhau hoặc gây ức chế nhau. Xét giữa các nghiệm thức cao chiết, ta thấy nghiệm thức LM có khả năng kháng oxy hóa mạnh hơn với giá trị IC<sub>50</sub> là 59,031 ± 0,753µg/mL, nghiệm thức LE yếu hơn với giá trị IC<sub>50</sub> là 131,454±

0,833µg/mL. Điều này phù hợp với kết quả định tính, nghiệm thức LM cho kết quả dương tính với các nhóm hợp chất như flavonoid, coumarin, phenol và tannin. Điều này càng thể hiện rõ ở thí nghiệm định lượng, hàm lượng phenol tổng ở nghiệm thức LM cao hơn so với nghiệm thức LE. Một chứng minh cụ thể rằng, phenol và các nhóm hợp chất có nguồn gốc từ thực vật có các hoạt động kháng oxy hóa đáng kể (Saskai và cs., 1996). Ở một nghiên cứu khác, lá của loài *Leea indica* được ly trích bằng các dung môi methanol, ethanol và nước. Kết quả cho thấy khả năng khử gốc tự do DPPH mạnh nhất ở nghiệm thức được ly trích bằng dung môi methanol, yếu nhất là nghiệm thức ly trích với nước. Kết quả này thể hiện sự tương quan giữa hàm lượng phenol tổng và khả năng kháng oxy hóa. Cụ thể dịch chiết từ dung môi methanol có hàm lượng phenol tổng là 65,20 mg GAE/g chiết

xuất và phần trăm ức chế là 57,11%. Dịch chiết từ ethanol có hàm lượng phenol tổng là 60,97 mg GAE/g chiết xuất và phần trăm ức chế là 43,87%. Dịch chiết từ nước có hàm lượng phenol tổng là 53,04 mg GAE/g chiết xuất và phần trăm ức chế là 33,76%, khả năng kháng oxy hóa của nghiệm thức được ly trích từ dung môi methanol mạnh hơn dung môi ethanol và mạnh hơn nước tỷ lệ thuận với hàm

lượng phenol tổng có trong từng nghiệm thức (Ghagane và cs., 2017). Như vậy, đối với thử nghiệm khử gốc tự do DPPH nghiệm thức lá bình bát nước ly trích với dung môi methanol cho hiệu quả tốt hơn so với dung môi ethanol.

### 3.2.2. Khả năng khử gốc tự do hydrogen peroxide



**Hình 3.** (A) Biểu đồ giá trị phần trăm ức chế gốc tự do hydrogen peroxide của hai nghiệm thức cao chiết và đối chứng vitamin C. (B), (C), (D) Phương trình đường chuẩn của vitamin C, LM và LE

Khả năng khử gốc tự do hydrogen peroxide của hai nghiệm thức cao chiết được thể hiện thông qua Hình 3 (A). Giá trị IC<sub>50</sub> là thước đo dùng để so sánh khả năng khử gốc tự do giữa hai mẫu cao với đối chứng vitamin C. Giá trị IC<sub>50</sub> càng nhỏ đồng nghĩa nồng độ gốc tự do bị loại đi 50% càng nhỏ và khi đó mẫu khảo sát có khả năng khử gốc tự do càng mạnh. So sánh giữa các nghiệm thức với nhau cho thấy nghiệm thức LM có khả năng kháng oxy hóa mạnh hơn với giá trị IC<sub>50</sub> là 139,2±0,8 µg/mL, nghiệm

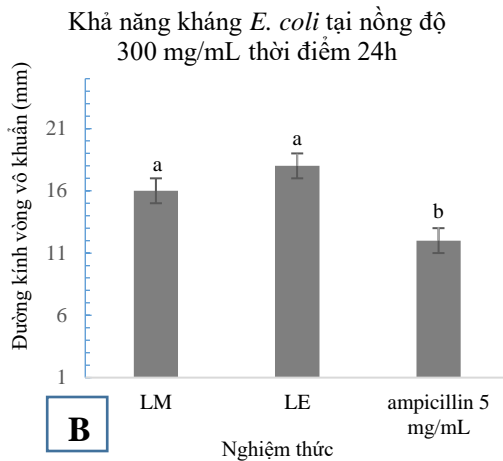
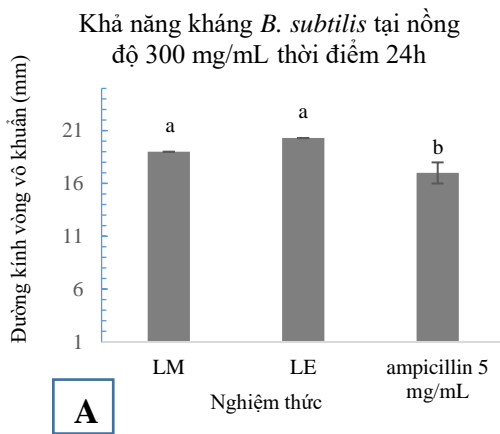
thức LE yếu hơn với giá trị IC<sub>50</sub> là 156,3±2,65 µg/mL. Nếu so sánh với vitamin C (145,6±0,8 µg/mL) giá trị IC<sub>50</sub> của nghiệm thức LM thấp hơn, cho thấy cao chiết lá bình bát nước ly trích với dung môi methanol có khả năng khử gốc hydrogen peroxide tốt hơn, trong khi đó giá trị này ở nghiệm thức LE cũng cho sự khác biệt không lớn so với vitamin C. Điều này có thể được giải thích là các dung môi khác nhau sẽ ly trích được các hợp chất thực vật khác nhau với hàm lượng khác nhau tùy thuộc

vào độ phân cực của nó, mà mỗi hợp chất thực vật có những công dụng riêng. Do đó, các chiết xuất khác nhau sẽ cho khả năng kháng oxy hóa khác nhau (Bello và cs., 2016). Ngoài ra, kết quả này cũng phù hợp với kết quả định tính, cao chiết LM ly trích được nhiều nhóm hợp chất có khả năng kháng oxy hóa như: flavonoid, coumarin, phenol và tannin. Polyphenol là thành phần giúp khử các gốc tự do bởi nhóm hydroxyl. Do đó, khi hàm lượng polyphenol tăng, hoạt tính kháng oxy hóa cũng tăng (Sahavà cs., 2016). Bên cạnh đó, hoạt động kháng oxy

hóa cũng có thể đến từ sự hiện diện của các chất chuyển hóa thứ cấp khác, chẳng hạn như các loại dầu dễ bay hơi, carotenoid và vitamin (Javanmardi và cs., 2003). Như vậy, việc khảo sát khả năng khử gốc tự do hydrogen peroxide cho thấy cao chiết lá bình bát nước được ly trích bởi dung môi methanol cho hiệu quả tốt hơn so với ethanol.

**3.3. Khả năng kháng khuẩn, kháng nấm**

**3.3.1. Khả năng kháng khuẩn**



**Hình 4.** Khả năng kháng hai dòng vi khuẩn *B. subtilis* (A), *E. coli*. (B) ở thời điểm 24 giờ

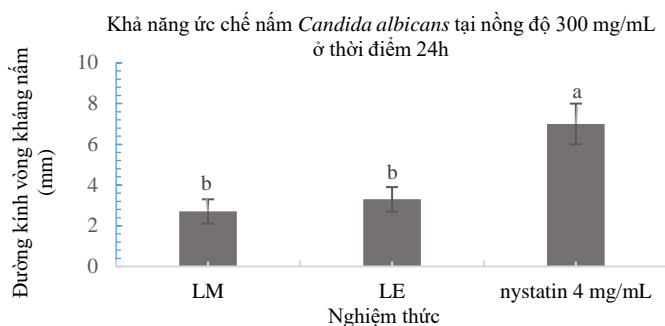
Đối với hai chủng vi khuẩn *B.subtilis* Hình 4 (A), *E. coli* Hình 4 (B), hiệu quả kháng của hai nghiệm thức tương đương nhau và vượt trội hơn so với ampicillin nồng độ 5mg/mL. Điều này có thể được lý giải là vì trong cả hai nghiệm thức đều tồn tại một lượng lớn phenol, tannin, flavonoid và saponin tạo thành một tổ hợp đa kháng, tác động lên các tế bào vi khuẩn theo nhiều cách khác nhau. Điển hình nhất là flavonoid. Hợp chất này có hoạt tính kháng khuẩn mạnh bao gồm các cơ chế như ức chế tổng hợp nucleic acid, ức chế chức năng màng tế bào và ức chế chuyển hóa năng lượng (Cushnie và Lamb, 2005). Đặc biệt, flavonoid có khả năng ức chế mạnh đối với *E. coli* thông qua việc tác động vào DNA

gyrase (Wu và cs., 2013). Saponin có thể thâm qua màng tế bào ty thể và gây rối loạn tế bào (Carraturo và cs., 2014). Trong khi ampicillin là đơn chất kháng, chỉ có thể gây ức chế hoạt động của enzyme transpeptidase, ngăn cản quá trình tổng hợp thành peptidoglycan của vi khuẩn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của El-Chaghaby và cs. (2014) về khả năng kháng *E. coli* của dịch ly trích lá măng cầu ta (*Annona squamosa* L.) bằng hai loại dung môi ethanol và methanol cho kết quả không có sự khác biệt, giá trị ĐKVKK lần lượt là 14 và 13 mm. Từ kết quả định tính còn thấy được ở cả hai nghiệm thức đều có sự hiện diện của hợp chất alkaloid, một chất thuộc nhóm isoquinoline (nhóm có hoạt tính sinh

học mạnh), có thể sử dụng như kháng sinh. Như vậy, thử nghiệm khả năng kháng hai dòng vi khuẩn *B. subtilis*, *E. Coli* cho thấy dịch ly trích của lá bình bát nước với hai loại

dung môi ethanol, methanol cho kết quả tương đương.

### 3.3.2. Khả năng kháng nấm



**Hình 5.** Khả năng kháng nấm *Candida albicans* tại nồng độ 300 mg/mL ở thời điểm 24 giờ

Hiệu quả kháng *C. albicans* của hai loại cao chiết thấp hơn so với kháng sinh nystatin 4 mg/mL, một phần vì nystatin là kháng sinh diệt nấm thương mại với cơ chế tương tác với sterol màng tế bào (Ergosterol trong nấm) tạo thành các kênh xuyên màng, làm thay đổi tính thấm của màng (Dixon và Walsh, 1996) dẫn đến sự mất các acid hữu cơ, nucleotide và các protein của màng bị phá hủy (Harold và Thomas, 1996). Mặt khác, vách tế bào của *C. albicans* gồm hai lớp: lớp bên ngoài giàu mannoprotein và lớp bên trong giàu  $\beta$ -glucan, chitin đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ hình thái tế bào, độ cứng của tế bào, sự trao đổi chất, trao đổi ion, tương tác hoặc đề kháng các tác nhân gây hại (Marcilla và cs., 1998) nên rất ít nhóm hợp chất có thể tác động. Tuy nhiên, các hợp chất flavonoid, quercetin, alkaloid, acetogenin, diterpenoid và saponin là những hợp chất có khả năng ức chế nấm *C. albicans* (Narasimharaju và cs., 2015). Khả năng kháng *C. albicans* của hai nghiệm thức cao chiết là như nhau. Điều này có thể suy đoán rằng khả năng kháng *C. albicans* của cao chiết không phụ thuộc vào dung môi. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Narasimharaju và cs. (2015) với cao chiết từ bột khô lá *Annona quamosa* khi ly trích trong dung môi methanol và chloroform.

Các hợp chất ly trích được trong hai loại dung môi cụ thể như sau: dung môi methanol gồm các hợp chất alkaloid, glycoside, flavonoid, tannin, phenol, saponin; dung môi chloroform gồm các hợp chất glycoside, flavonoid, tannin, phenol, steroid, đều có nồng độ ức chế tối thiểu đối với *Candida albicans* là 600  $\mu$ g/mL. Từ đó, có thể thấy hai dung môi khác nhau có thể ly trích được các hợp chất giống và khác nhau, tuy nhiên hiệu quả ức chế *C. albicans* của cao chiết từ hai loại dung môi ethanol và methanol là như nhau.

## 4. KẾT LUẬN

Lá bình bát nước (*Annona glabra* L.) khi ly trích với hai dung môi methanol và ethanol đều xuất hiện hầu hết các hợp chất thực vật thuộc nhóm polyphenol. Hàm lượng các hợp chất khi ly trích từ dung môi methanol cho hiệu quả tốt hơn so với dung môi ethanol. Nghiệm thức có sự hiện diện các hợp chất càng nhiều thì khả năng kháng oxy hóa càng mạnh. Khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của hai nghiệm thức cao chiết là tương đương nhau, cao hơn ampicillin ở thí nghiệm kháng khuẩn và thấp hơn nystatin ở thí nghiệm kháng nấm. Nghiên cứu này là một trong các tiền đề nhằm đánh giá hoạt



tính sinh học của lá bình bát nước ở Cần Thơ, Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Park, Y. S., Jung, S. T., Kang, S. G., Heo, B. G., & Gorinstein, S. (2008). Antioxidant properties of durian fruit as influenced by ripening. *LWT-food Science and Technology*, 41(10), 2118-2125.
- Bello, A. M., Babagana, K., & Lawani, C. E. (2016). Relative Solvent-Based Antioxidant Potentials of Baphia Nitida Leaf Extracts. *Journal of Biomedical Science*, 1(1), 34-39.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Carraturo, A., Raieta, K., Tedesco, I., Kim, J., & Russo, G. L. (2014). Antibacterial activity of phenolic compounds derived from *Ginkgo biloba* SarcoTestas against foodborne pathogens. *British Microbiology Research Journal*, 4(1), 18-27.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
- Dixon, D. M., & Walsh, T. J. (1996). *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch.
- Doughari, J. H. (2012). Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In *Phytochemicals-A global perspective of their role in nutrition and health*. Nigeria: Modibbo Adama University of Technology.
- El-Chaghaby, G. A., Ahmad, A. F., & Ramis, E. S. (2014). Evaluation of the antioxidant and antibacterial properties of various solvents extracts of *Annona squamosa* L. leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(2), 227-233.
- Ezealisiji, K. M., & Tamuno-Eli, B. (2017). Comparative evaluation of the phenolic and antioxidant properties of the leaves, root, stem bark, and root bark of *Annona muricata* (Annonaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2), 274-278.
- Ghagane, S. C., Puranik, S. I., Kumbar, V. M., Nerli, R. B., Jalalpure, S. S., Hiremath, M. B., ... & Aladakatti, R. (2017). In vitro antioxidant and anticancer activity of *Leea indica* leaf extracts on human prostate cancer cell lines. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 79-87.
- Hamid, R. A., Foong, C. P., Ahmad, Z., & Hussain, M. K. (2012). Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(3), 630-641.
- Harold, C. N., & Thomas, D. G. (1996). *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch.
- Iqbal, E., Salim, K. A., & Lim, L. B. (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University - Science*, 27(3), 224-232.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food chemistry*, 83(4), 547-550.
- Kumoro, A. C., Hasan, M., & Singh, H. (2009). Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves. *Scienceasia*, 35(3), 306-309.
- Marcilla, A., Valentin, E., Santandreu, R. (1998). The cell wall structure: Developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *International Microbiology*, 1(2), 107-116.
- Moghadamtousi, S., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H., & Kadir, H. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625-15658.

- Narasimharaju, K., Nagarasanakote, V. T., Nagepally, V. J., Ramaiah, N., Sathyanarayana, S., & Bharat, K. (2015). Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. Leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 795-802.
- Hassim, N., Markom, M., Anuar, N., Dewi, K. H., Baharum, S. N., & Mohd, N. N. (2015). Antioxidant and antibacterial assays on *Polygonum minus* extracts: different extraction methods. *International Journal of Chemical Engineering*.
- Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W., & Gibbons, S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65(24), 3249-3254.
- Padmaja, V., Thankamany, V., Hara, N., Fujimoto, Y., & Hisham, A. (1995). Biological activities of *Annona glabra*. *Journal of ethnopharmacology*, 48(1), 21-24.
- Pimenta, L. P. S., Pinto, G. B., Takahashi, J. A., Silva, L. G. F., & Boaventura, M. A. D. (2003). Biological screening of Annonaceus Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, 10, 209-212.
- Padma, R., Parvathy, N. G., Renjith, V., Kalpana, P. R., & Rahate, P. (2013). Quantitative estimation of tannins, phenols, and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrica*. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 73-77.
- Saha, S., and Verma, R. J. (2016). Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Terminalia chebula Retzius* fruits. *Journal of Taibah University for Science*, 10(6), 805-812.
- Siebra, C. A., Nardin, J. M., Florão, A., Rocha, F. H., Bastos, D. Z., Oliveira, B. H., & Weffort-Santos, A. M. (2009). Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 19(1), 82-88.
- Simeón, S., Ríos, J. L., Villar, A. (1990). Antimicrobial activity of *Annona cherimolia* stem bark alkaloids. *Pharmazie*, 45(6), 442-443.
- Solomon-Wisdom, G. O., Ugoh, S. C., & Mohammed, B. (2014). Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Annona muricata* (L) leaf extract. *American Journal of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 01-07.
- Wu, X. Z., Cheng, A. X., Sun, L. M., & Lou, H. X. (2008). Effect of plagiocin E, an antifungal macrocyclic bis (bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(12), 1478-1485.
- Yadav, R. N. S., & Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytochemistry*, 3(12), 10-14.
- Walnut, A. A. O. (2015). Effects of extraction solvents on phytochemicals and antioxidant activities of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts Qiang Zhang. *European Journal of Food Science and Technology*, 3(5), 15-21.

## BIOCHEMICAL TESTING, ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF THE POND APPLE (*Annona glabra* L.) LEAF EXTRACTS

Luong Phong Du\*, Do Thi Phuong Dung, Nguyen Duc Do

**\*Corresponding Author:**

**Luong Phong Du**

**Email:**

dum0517016@gstudent.ctu.edu.vn

Biotech Research and  
Development Institute, Can Tho  
University

*Received:* December 21<sup>st</sup>, 2018

*Accepted:* February 12<sup>th</sup>, 2019

**Keywords:** Antifungal,  
antimicrobial, Antioxidant, Pond  
Apple (*Annona glabra* L.)  
extracts, Total phenolics content

### ABSTRACT

The objective of this study was to partially evaluate on activities of antioxidant, antimicrobial and antifungal of Pond Apple (*Annona glabra* L.) leaves extracted from methanol and ethanol. The leaf extracts were presented some phytochemicals such as phenolics, tannins, flavonoids, alkaloids, carotenoids, triterpenoids, steroids, quinones and saponins. The total phenolics content was the highest in methanol leaf extract (LM) and the lowest in ethanol leaf extract (LE) with 37.828 and 31.828 mg gallic acid equivalents g<sup>-1</sup> of extract, respectively. The most effective antioxidant activity was LM, in which the IC<sub>50</sub> value of DPPH free radical scavenging capacity was 59.03 µg/mL. On the other hand, LE was the least effective with IC<sub>50</sub> value at 131.47 µg/mL. With the methods of scavenging hydrogen peroxide, LM demonstrated the highest antioxidant activity with the lowest IC<sub>50</sub> value (139.27 µg/mL), LE (IC<sub>50</sub> value = 156.45 µg/mL) was the lowest antioxidant efficacy. In addition, the efficacy against *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* was superior to the 5 mg/mL ampicillin and 4 µg/mL nystatin. There was a correlation between the content of bioactive compounds and antioxidant, antimicrobial, antifungal activities of different solvent polarities. Furthermore, these results indicated that the Pond Apple could be used in potentially dietary applications to reduce oxidative stress and human diseases.