

SO SÁNH HOẠT ĐỘNG CHỐNG OXY HOÁ VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CAO CHIẾT LÁ TRẦU (*Piper betle* L.) TƯƠI VÀ KHÔ

Võ Thị Phước*, Nguyễn Thị Tâm, Chế Thị Cẩm Hà

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này để xác định các thành phần hợp chất có khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn trong lá Trầu tươi và khô. Chiết xuất từ lá Trầu tươi và khô được nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng trung hòa gốc tự do DPPH *in vitro*. Hoạt động chống oxy hóa ở lá Trầu khô thể hiện $IC_{50} = 3,21$ mg/ml cao hơn đáng kể so với lá Trầu tươi $IC_{50} = 22,97$ mg/ml. Hoạt động kháng khuẩn của cao chiết lá Trầu tươi và khô tương tự nhau trên 3 chủng *Salmonella typhi*, *Bacillus pumilus* và *Staphylococcus aureus*. Tuy nhiên, đối với chủng *Escherichia coli*, cao chiết lá Trầu tươi thể hiện khả năng kháng khuẩn cao hơn hẳn lá Trầu khô. Do đó hoạt động chống oxy hóa và kháng khuẩn của lá Trầu có liên quan nhiều đến tình trạng tươi và khô của lá.

Từ khóa: DPPH, GC-MS, kháng khuẩn, lá Trầu (*Piper betle* L.), lá khô và lá tươi.

MỞ ĐẦU

Các nghiên cứu đã cho thấy trên 80 bệnh lý khác nhau có nguyên nhân liên quan đến gốc tự do. Cây Trầu không (*Piper betle* L.) là một loại thảo mộc truyền thống thuộc họ Piperaceae được nhiều quốc gia sử dụng do chứa các chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng như vitamin C, vitamin A, chất khoáng, riboflavin, thiamine, carbohydrate, tri-terpinoid, steroid, alkaloid, amino axit, tannin, tinh dầu, phenolic, flavonoid,... [17]. Theo Rintu *et al.* (2015), chiết xuất lá Trầu thể hiện tiềm năng chống oxy hóa thông qua hoạt động bắt gốc tự do DPPH, superoxide, nitric oxide [1]. Các chất chống oxy hóa được chứng minh làm chậm và ức chế quá trình oxy hóa các thành phần phân tử tế bào, ngăn ngừa tổn thương đối với lipid, protein và carbohydrate. Do đó, mức độ hoạt động của các chất phytochemical khác nhau rất quan trọng để đánh giá tiềm năng của chúng đối với lợi ích và sức khỏe con người. Suryasnata Das *et al.* (2019) đã nghiên cứu về ảnh hưởng của các kĩ thuật chiết xuất Soxhlet, sonication và maceration sử dụng aceton làm dung môi cho kết quả tổng hàm lượng phenolic và flavonoid khác nhau, hàm lượng eugenol và eugenol acetate khác nhau, do đó khả năng thu dọn gốc tự do DPPH cũng khác nhau [2]. Theo Fawad Ali Bangash *et al.* (2012) nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* của chiết xuất ethanol, ether dầu hỏa và chloroform của lá Trầu không trên các chủng *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*,... kết quả báo cáo chiết xuất ethanol thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tối ưu nhất chống lại gần như tất cả các chủng thử nghiệm trong khi đó chiết xuất ether dầu hỏa cho hiệu quả kháng khuẩn kém nhất [3].

Từ các nghiên cứu thấy rằng phương thức chiết xuất đóng một vai trò quan trọng đối với số lượng, loại phytochemical và hoạt động sinh học của cao chiết. Với mục đích nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng của lá khô và tươi bằng cách phân tích sự thay đổi của các chất phytochemical chính được tìm thấy trong lá là 2,5-Dimethylbenzoic acid, Chavicol acetate và Eugenol. Kết quả chỉ ra rằng hàm lượng của các hợp chất chênh lệch đáng kể giữa lá tươi và khô của lá Trầu không (*Piper betle* L.).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Lá Trầu tươi (*Piper betle* L.) được thu hái tại thị xã Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Các chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* được cung cấp bởi Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Huế.

Bào chế cao chiết

Mẫu Trầu sau khi thu hái rửa sạch sau đó rửa lại bằng nước cất, để ráo ở nhiệt độ phòng. Để tạo cao chiết từ lá Trầu tươi, mẫu lá được nghiền nhỏ, cho vào bình ủ với dung môi ethanol 70% theo tỉ lệ 1:10 và ủ 5 giờ ở nhiệt độ 50°C. Để tạo cao chiết từ lá Trầu khô, mẫu lá sau khi để ráo tiếp tục sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 40°C, nghiền thành bột mịn, sau đó ủ theo tỉ lệ 150 g bột: 500 ml ethanol tuyệt đối trong 7 ngày, thỉnh thoảng khuấy. Lấy mẫu lọc và cô cạn dịch lọc ở nhiệt độ 40–50°C đến khi thu được một dịch cô đặc màu nâu đen sẫm. Bảo quản mẫu ở 4°C.



Hình 1. Mẫu lá Trầu thu nhận

Phân tích thành phần hóa học của cao chiết lá tươi và lá khô bằng kỹ thuật GCMS

Thành phần hóa học của cao chiết được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ trên máy GC-MS của hãng Agilent GC 7890A nối ghép khối phổ MS 5975C. Cột sử dụng trong phân tích là cột mao quản DB-XLB (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Cao chiết được pha với dung môi dichloromethane ở nồng độ 3%, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 µm sau đó đưa vào máy với các điều kiện phân tích tối ưu được thể hiện chi tiết ở bảng 1.

Bảng 1. Các điều kiện trong quá trình phân tích thành phần cao chiết lá Trà bằng GC-MS

Điều kiện sắc kí			Điều kiện khối phổ
Chương trình nhiệt độ	Injector	Khí mang	
Nhiệt độ đầu vào: 250°C Chương trình nhiệt độ lò GC: Nhiệt độ ban đầu 40°C, tăng lên 140°C với tốc độ 20°C/phút, giữ 5 phút. Tiếp tục tăng lên 270°C với tốc độ 4°C/phút	Tỉ lệ chia dòng: 100:1	Loại khí: Heli Chế độ đẳng dòng: tốc độ 1 mL/phút	Nhiệt độ nguồn cấp ion: 230°C Thế ion hóa: 70 eV Dòng phát xạ: 40 mA Khối quét: 35-450 amu

Xác định khả năng trung hòa gốc tự do DPPH

Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết lá Trà được xác định thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH được phát triển bởi Marsden Blois (1958) và Jahan *et al.* (2010) có hiệu chỉnh. Phân tích này dựa trên sự thay đổi màu của dung dịch DPPH từ màu tím sang màu vàng cam.

Dung dịch DPPH nồng độ 100 µM được chuẩn bị trong dung dịch methanol. Pha loãng mẫu cao chiết ở các nồng độ khác nhau (5-25 µg/ml). Hỗn hợp bao gồm 1,5 ml DPPH 100 µM và 1,5 ml dịch mẫu được lắc đều sau đó ủ trong tối ở nhiệt độ phòng 30 phút. Độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 517 nm. Acid ascorbic được sử dụng làm đối chứng dương.

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức: $I\% = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$. Trong đó: I%: phần trăm ức chế hay hiệu suất chống oxy hóa; A_0 : giá trị mật độ quang của mẫu đối chứng (không chứa cao chiết); A: giá trị mật độ quang của mẫu thử (cao chiết và acid ascorbic). Hoạt tính chống oxy hóa của mỗi mẫu được biểu thị theo IC_{50} (nồng độ của mẫu thử có thể bắt được 50% gốc tự do DPPH). IC_{50} càng thấp, khả năng chống oxy hóa càng cao và ngược lại.

Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn

Các chủng *Escherichia coli*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* được cung cấp bởi Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Huế. Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Các chủng vi khuẩn kiểm định được cấy rìa trên môi trường Himedia Laboratories Pvt. Ltd- Ấn, pH 7. Ủ ở 37°C trong 24 giờ để chọn các khuẩn lạc vi khuẩn đặc trưng không bị nhiễm. Cấy chuyển qua môi trường thạch nghiêng, ủ ở 37°C, khuẩn lạc phát triển đồng nhất được dùng làm nguyên liệu cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

Huyền dịch vi khuẩn với thể tích 100 µL được trải đều trên bề mặt đĩa thạch đến khi khô. Dùng ống đong vô trùng tạo các giếng trên đĩa (3 giếng/đĩa) với đường kính 9 mm. Sau đó, bổ sung vào mỗi giếng 100 µL dung dịch cao chiết ở các nồng độ 10, 25, 50, 100 mg/mL pha loãng với nước cất vô trùng. Đường kính vòng kháng khuẩn được đo sau 6 giờ ủ mẫu ở 4°C và 24 giờ ủ mẫu ở 37°C. Dung dịch cao chiết có tác động kháng khuẩn sẽ cho vòng ức chế xung quanh giếng chứa mẫu thử. Mẫu chứng âm là DMSO 10%. Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn (ĐK) theo công thức: $ĐK (mm) = D - d$. Trong đó: D là đường kính vòng kháng khuẩn, d là đường kính lỗ đục.

Xử lý số liệu

Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (mean ± SD). Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để xử lý số liệu và vẽ đồ thị. Giá trị $p < 0,05$ chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp thống kê ANOVA một yếu tố.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận cao chiết lá Trà

Lá Trà tươi và lá Trà khô được chiết xuất ở quy mô phòng thí nghiệm theo phương pháp chưng cất để tạo cao chiết. Hai cao chiết sau khi thu đều ở trạng thái cô đặc, có màu nâu đen, mùi cay nồng của Trà. Cao chiết lá Trà khô dễ tan trong nước hơn so với cao chiết lá Trà tươi. Cả 2 cao chiết đều tan dễ trong cồn. Kết quả bào chế cao

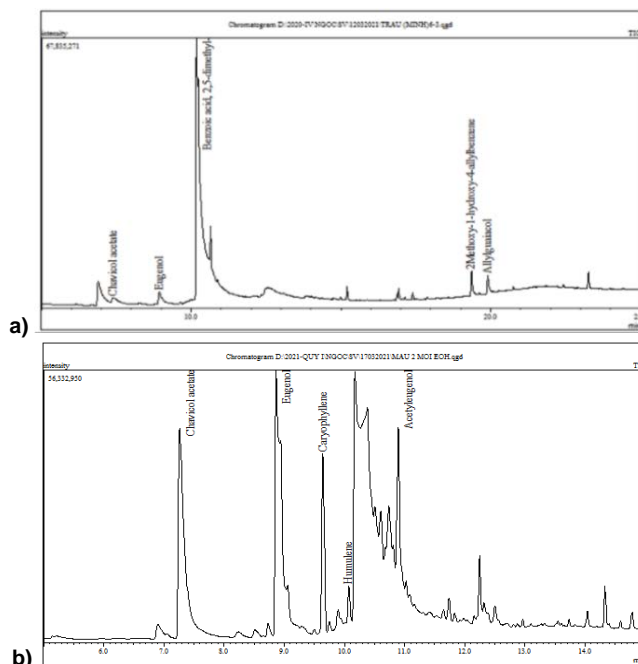
chiết cho thấy, hiệu suất thu hồi cao chiết từ lá Tràu khô (8,89%) cao hơn so với sử dụng lá Tràu tươi (4,95%) (bảng 2).

Bảng 2. Hiệu suất thu hồi của các loại cao chiết

Cao chiết	Khối lượng (g)		Hiệu suất thu hồi (%)
	Nguyên liệu	Cao chiết	
Tươi	200	9,90	4,95
Khô	100	8,89	8,89

Phân tích thành phần hóa học của cao chiết bằng GC-MS

Hai cao chiết lá Tràu tươi và lá Tràu khô được xác định thành phần hóa học bằng phương pháp GC-MS. Kết quả phân tích sắc kí đồ GC-MS được thể hiện ở hình 2 và bảng 3.



Hình 2. Sắc kí đồ GC-MS a) Cao chiết lá Tràu tươi; b) Cao chiết lá Tràu khô

Kết quả cho thấy GC-MS xác định được mỗi cao chiết đều có 5 phytochemical, tuy nhiên giữa 2 cao chiết có sự khác nhau về thành phần và hàm lượng.

Đối với cao chiết từ lá Tràu tươi, thành phần hóa học xác định được gồm 2,5-Dimethylbenzoic acid (89,58%), 2-Methoxy-1-hydroxy-4-allylbenzene (3,18%), Eugenol (2,89%), Allylguaiacol (2,85%) và Chavicol acetate (1,49%). Chất 2,5-Dimethyl benzoic acid là cấu tử chính được xác định trong cao chiết này với hàm lượng rất lớn chiếm 89,58%, các cấu tử còn lại được xác định với hàm lượng nhỏ từ 1-3%.

Theo nghiên cứu của Pratiwi và Muderawan (2016), phân tích GC-MS của dịch chiết lá *P. betle* thu hái từ Denpasar, Indonesia chứa 31 hợp chất với các thành phần chính gồm eugenol (25,03%), 2,5-dimethyl benzoic acid (12,08%) [4]. Trong nghiên cứu mới nhất của Selvaraj Ganesh Kumar *et al.* (2022), phân tích GC-MS cao chiết methanol từ lá *P. betle* cho thấy các hợp chất hoạt động chính là acid 2,5-dimethylbenzoic, acid 3,5-dimethylbenzoic, methionine,... [5]. Từ đó cho thấy cao chiết từ lá Tràu tươi trong nghiên cứu của chúng tôi đều thể hiện thành phần các hợp chất tương tự các kết quả nghiên cứu trên thế giới và chỉ khác nhau về hàm lượng các hợp chất.

Đối với cao chiết từ lá Tràu khô, 2 hợp chất chính được xác định là Chavicol acetate (37,34%) và Eugenol (37,56%). Caryophyllene (12,71%), Acetyl Eugenol (10,17%) và Humulene (2,22%) chiếm hàm lượng thấp.

Có sự khác biệt lớn giữa hàm lượng và thành phần cao chiết từ lá Tràu tươi và khô, cụ thể 2 hợp chất Chavicol acetate (37,34%) và Eugenol (37,56%) ở lá Tràu khô nhưng chỉ chiếm hàm lượng nhỏ (1,49%-2,89%) ở lá Tràu tươi. Trong khi đó, hợp chất 2,5-Dimethylbenzoic acid có hàm lượng lớn chiếm (89,58%) ở cao chiết lá Tràu tươi nhưng không xuất hiện trong thành phần hóa học của cao chiết lá Tràu khô.

Kết quả GC-MS từ cao chiết lá Tràu khô của chúng tôi tương tự với nghiên cứu của Suliantari *et al.* (2008), phân tích các thành phần của dịch chiết lá *P. betle* bằng GC-MS có chứa các thành phần như chavicol, eugenol, caryophyllene, cykene và chalcone [6]. Sự hiện diện của caryophyllene, eugenol và acetyleugenol trong chiết xuất ethanol từ lá *P. betle* cũng được xác nhận bằng phân tích mật độ HPTLC và GCMS trong nghiên cứu của Annegowda *et al.* (2013) [7].

Bảng 3. Thành phần hóa học của cao chiết lá Tràu tươi và lá Tràu khô

STT	Cao chiết lá Tràu tươi		Cao chiết lá Tràu khô	
	Thành phần hóa học	%	Thành phần hóa học	%
1	2,5-Dimethylbenzoic acid	89,58	Eugenol	37,56
2	2-Methoxy-1-hydroxy-4-allylbenzene	3,18	Chavicol acetate	37,34
3	Eugenol	2,89	Caryophyllene	12,71
4	Allylguaiacol	2,85	Acetyleugenol	10,17
5	Chavicol acetate	1,49	Humulene	2,22

Nhìn chung, kết quả phân tích GC-MS từ cao chiết lá Tràu tươi và lá Tràu khô của chúng tôi xác định được các thành phần hóa học tương tự các nghiên cứu trước đây. Theo Suyasnata *et al.* (2016) nghiên cứu về thành phần hóa học của lá Tràu ở các khu vực khác nhau của Odisha đã báo cáo trong lá Tràu chứa các thành phần như eugenol, caryophyllene, acetyleugenol, humulene, cadinene, 2-aminocarbonylbenzoic acid,...[8]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng thành phần hóa học trong cao chiết lá Tràu khô có eugenol chiếm 35,12% và chavicol acetate chiếm 37,34%. Trong khi đó cao chiết lá Tràu tươi có 2,5-Dimethylbenzoic acid chiếm 89,58%. Sự khác biệt này có thể do quá trình sấy khô tác dụng nhiệt lên sản phẩm, điều này dẫn đến sự suy thoái một số chất phytochemical cụ thể là 2,5-dimethylbenzoic acid, đồng thời cũng tạo điều kiện tối ưu để hình thành hợp chất eugenol, chavicol acetate trong lá khô.

Khả năng kháng oxy hóa

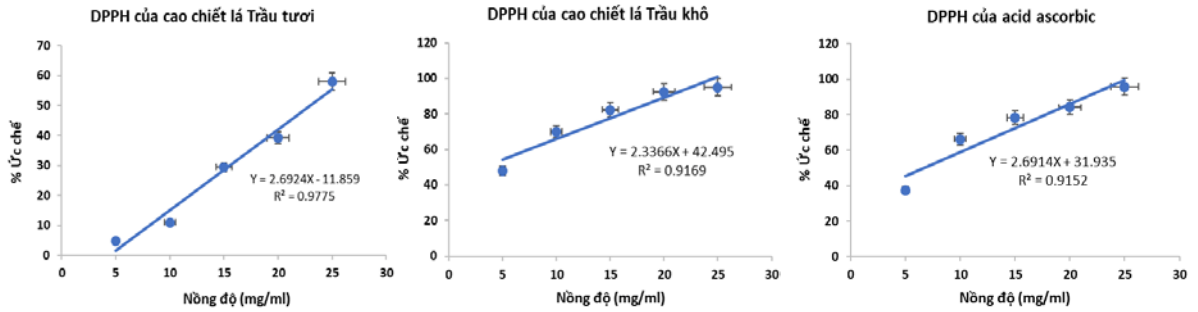
Hiệu quả chống oxy hóa của cao chiết từ lá Tràu tươi và lá Tràu khô được xác định dựa vào hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH. DDPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) là gốc tự do bền màu tím, có điện tử chưa ghép đôi trên nguyên tử nito tạo thành hệ thống liên hợp điện tử. Electron tự do của phân tử nito trong DDPH, khi bắt cặp với gốc hydro từ chất chống oxy hóa sẽ bị khử thành 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H), làm mất đi màu tím đặc trưng của gốc tự do DDPH trong dung dịch methanol. Sự biến đổi màu này tương ứng với lượng electron đã kết hợp với DPPH.

Xây dựng đường chuẩn $y = ax + b$ với phần trăm ức chế DPPH ở các nồng độ khác nhau. Từ đó, tính giá trị IC_{50} của acid ascorbic hay cao chiết. Với mục đích so sánh, axit ascorbic được lựa chọn để khảo sát khả năng chống oxy hóa của cao chiết lá Tràu tươi và lá Tràu khô. Acid ascorbic là một chất chống oxy hóa quan trọng. Nếu thiếu nó có thể dẫn đến sự chậm trễ trong việc chữa lành vết thương và thất bại trong việc liền xương, khả năng chữa bệnh của acid ascorbic được cho là do hoạt động thu dọn gốc tự do [9].

Kết quả khảo sát khả năng chống oxy hóa bằng thử nghiệm loại bỏ gốc DPPH được thể hiện ở bảng 4 và hình 3. Kết quả thử nghiệm cho thấy, khả năng làm sạch gốc tự do tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết, nồng độ cao chiết càng cao thì khả năng làm sạch gốc tự do càng lớn và ngược lại. Tuy nhiên, tỉ lệ ức chế DPPH của cao chiết lá Tràu khô cao hơn đáng kể so với cao chiết lá Tràu tươi ở giá trị IC_{50} lần lượt là 3,21 mg/ml và 22,97 mg/ml. Có thể thấy rằng khả năng chống oxy hóa của cao chiết lá Tràu khô mạnh hơn 7 lần so với cao chiết lá Tràu tươi. Điều này là hoàn toàn phù hợp khi ở tất cả nồng độ, phần trăm bắt gốc tự do của mẫu lá Tràu khô đều cao hơn. Hơn thế nữa, giá trị IC_{50} của cao chiết lá Tràu khô thấp hơn đối chứng dương acid ascorbic (3,21 mg/ml so với 6,71 mg/ml) chứng tỏ rằng cao chiết toàn phần của dịch chiết ethanol từ lá Tràu khô có khả năng chống oxy hóa mạnh. Khả năng này có thể do trong thành phần hóa học của cao chiết lá Tràu khô có chứa các thành phần chống oxy hóa tốt đã được báo cáo như eugenol, acetyleugenol, caryophyllene [10], [11], [12].

Bảng 4. Tỉ lệ ức chế DPPH của cao chiết lá Tràu tươi và lá Tràu khô so với acid ascorbic

Nồng độ (mg/ml)	Tỉ lệ ức chế (%)		
	Cao chiết lá tươi	Cao chiết lá khô	Acid ascorbic
5	4,83 ± 0,59	47,92 ± 1,74	37,38 ± 0,56
10	10,99 ± 0,47	69,9 ± 1,55	66,15 ± 0,85
15	29,51 ± 0,88	82,37 ± 0,84	78,23 ± 0,99
20	39,31 ± 1,24	92,47 ± 0,75	84,06 ± 0,72
25	57,99 ± 1,10	95,04 ± 1,05	95,71 ± 0,87
IC_{50}	3,21 mg/ml	22,97 mg/ml	6,71 mg/ml



Hình 3. Tác dụng chống oxy hóa của cao chiết lá Trà tươi và lá Trà khô so với acis ascorbic bằng xét nghiệm loại bỏ gốc DPPH. Dữ liệu đại diện cho giá trị trung bình ± SE của 3 thí nghiệm độc lập

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá Trà tươi và lá Trà khô

Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá Trà tươi và lá Trà khô trên các chủng vi khuẩn vi khuẩn Gram (+): *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus* và vi khuẩn Gram (-): *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) ở các nồng độ khác nhau của cao chiết lá Trà tươi và lá Trà khô

Chủng vi khuẩn	Dịch chiết	Nồng độ (mg/ml)			
		10	25	50	100
<i>Escherichia coli</i>	Lá tươi	2,5 ± 0,6	4,9 ± 0,4	7,3 ± 1,1	11,3 ± 1,2
	Lá khô	1,2 ± 0,2	2,4 ± 0,8	5,8 ± 0,9	8,3 ± 0,6
<i>Salmonella typhi</i>	Lá tươi	1,8 ± 0,7	3,2 ± 0,9	5,9 ± 0,8	9,2 ± 1,2
	Lá khô	2,3 ± 0,6	3,7 ± 0,8	6,6 ± 0,8	9,9 ± 0,9
<i>Bacillus pumilus</i>	Lá tươi	2,4 ± 0,7	6,8 ± 1,3	8,5 ± 0,9	11,4 ± 1,1
	Lá khô	3,3 ± 0,4	7,2 ± 0,8	7,5 ± 0,7	11 ± 0,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lá tươi	3,6 ± 0,5	9,5 ± 0,3	18,8 ± 1,4	23,2 ± 1,8
	Lá khô	0,5 ± 0,7	12,0 ± 1,4	20,5 ± 0,7	24 ± 2,8

Kết quả thử nghiệm cho thấy, cả 2 cao chiết lá Trà tươi và lá Trà khô đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên tất cả các chủng thử nghiệm và nồng độ cao chiết thử nghiệm. Cao chiết lá Trà tươi thể hiện hoạt tính kháng khuẩn *E. coli* hiệu quả hơn so với cao chiết lá Trà khô. Khả năng kháng khuẩn của lá Trà tươi và khô tương tự nhau trên 3 chủng *Salmonella typhi*, *B. pumilus* và *S. aureus*. Đặc biệt, 2 cao chiết thể hiện hoạt tính kháng khuẩn hiệu quả đối với chủng Gram dương *Staphylococcus aureus*. Đây là một mầm bệnh chính ở người, gây ra một loạt các bệnh nhiễm trùng lâm sàng, nguyên nhân hàng đầu của nhiễm khuẩn huyết và viêm nội tâm mạc nhiễm khuẩn cũng như các bệnh nhiễm trùng liên quan đến xương, da và mô mềm, màng phổi [13].

Kết quả kháng các chủng vi khuẩn của cao chiết từ lá Trà của chúng tôi tương tự các báo cáo trước đây. Nghiên cứu của Suliantari *et al.* (2008) về hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất lá Trà không đối với mầm bệnh từ thực phẩm, sử dụng ba loại dung môi (nước, ethanol và etyl acetate) cho kết quả chiết xuất lá Trà không bằng ethanol thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất chống lại *S. aureus* và *E. coli* [6]. Theo nghiên cứu của Nejad và cộng sự (2017) eugenol cũng được xác nhận chống lại các mầm bệnh khác nhau như *E. coli*, *B. cereus*, *Helicobacter pylori*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* [14]. Nhóm tác giả Fawad Ali Bangash (2012) nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* của chiết xuất ethanol, ether dầu hỏa và cloroform của lá Trà không đã báo cáo chiết xuất ethanol cho thấy hoạt động tối ưu nhất chống lại gần như tất cả các chủng thử nghiệm *B. subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* [3]. Nghiên cứu mới nhất về hoạt động kháng khuẩn của lá Trà (FU Ermawati *et al.*, 2021) cũng báo cáo khả năng kháng khuẩn chống lại *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *P. aeruginosa* [15]. Qua đó, có thể thấy khả năng kháng khuẩn ở Trà không rất mạnh, có khả năng kháng nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh.

KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy, tình trạng của lá, tươi hay khô ảnh hưởng đến thành phần hóa học, hoạt động chống oxy hóa và kháng khuẩn của lá Trà không. Cao chiết từ lá Trà khô thể hiện hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH (IC₅₀ = 22,97 mg/ml) cao hơn 7 lần so với cao chiết từ lá Trà tươi (IC₅₀ = 3,21 mg/ml). Cao chiết lá Trà tươi và cao chiết lá

Trầu khô thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tương tự nhau trên 3 chủng *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhi*. Riêng đối với chủng *Escherichia coli*, hiệu quả kháng khuẩn của cao chiết lá Trầu tươi với đường kính vòng kháng khuẩn ($11,3 \pm 1,2$ mm) cao hơn cao chiết lá Trầu khô ($8,3 \pm 0,6$ mm) ở cùng nồng độ cao chiết 100 mg/ml. Các kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của cao chiết lá Trầu trong dược phẩm, mỹ phẩm. Kết quả so sánh giữa lá Trầu tươi và khô trong nghiên cứu này có thể làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về tác dụng bảo vệ sức khỏe của lá Trầu như điều trị viêm loét, chữa lành vết thương, ức chế tế bào ung thư...

Lời cảm ơn: Võ Thị Phước được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2021.ThS.40.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Rintu, M. Shinjini, M. Kaustab, P. Pramathadhip, P. Umesh, and E. Banerjee, "Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of different varieties of Piper leaf extracts (*Piper betle* L.)," *Nutrition and Food Sciences*, Vol. 5, 2015.
- [2] S. Das, A. Ray, N. Nasim, S. Nayak, and S. Mohanty, "Effect of different extraction techniques on total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant activity of betelvine and quantification of its phenolic constituents by validated HPTLC method," *3 Biotech*, Vol. 9, No. 1, pp. 1-8, 2019.
- [3] F. A. Bangash *et al.*, "In-vitro antibacterial activity of *Piper betel* leaf extracts," *Journal of applied pharmacy*, Vol. 3, No. 4, pp. 639-46, 2012.
- [4] N. P. R. K. Pratiwi and I. W. Muderawan, "Analisis kandungan kimia ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dengan GC-MS," in *Prosiding Seminar Nasional MIPA*, pp. 304-310, 2016.
- [5] G. K. Selvaraj, J. J. Wilson, N. Kanagaraj, E. Subashini, and S. Thangavel, "Enhanced antifungal activity of *Piper betle* against candidiasis infection causing *Candida Albicans* and In silico analysis with its virulent protein," *Biomedical and Biotechnology Research Journal*, Vol. 6, No. 1, pp. 73-80, 2022.
- [6] B. Jenie and A. Apriantono, "Antibacterial activity of green sirih (*Piper betle* L) extract towards food pathogens," *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, Vol. 19, No. 1, 2008.
- [7] H. Annegowda *et al.*, "TLC–bioautography-guided isolation, HPTLC and GC–MS-assisted analysis of bioactives of *Piper betle* leaf extract obtained from various extraction techniques: In vitro evaluation of phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities," *Food Analytical Methods*, Vol. 6, No. 3, pp. 715-726, 2013.
- [8] S. Das, R. Parida, I. S. Sandeep, B. Kar, S. Nayak, and S. J. B. Mohanty, "Chemical composition and antioxidant activity of some important betel vine landraces," Vol. 71, No. 2, pp. 128-132, 2016.
- [9] J. A. Molnar, M. J. Underdown, and W. A. Clark, "Nutrition and chronic wounds," *Advances in wound care*, Vol. 3, No. 11, pp. 663-681, 2014.
- [10] A. B. Vanin *et al.*, "Antimicrobial and antioxidant activities of clove essential oil and eugenyl acetate produced by enzymatic esterification," *Applied Biochemistry Biotechnology*, Vol. 174, No. 4, pp. 1286-1298, 2014.
- [11] İ. Gülçin, "Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study," *Journal of medicinal food*, Vol. 14, No. 9, pp. 975-985, 2011.
- [12] L. F. S. Gushiken *et al.*, "Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model," *Oxidative medicine cellular longevity*, Vol. 2022, 2022.
- [13] S. Y. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler Jr, "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management," *Clinical microbiology reviews*, Vol. 28, No. 3, pp. 603-661, 2015.
- [14] S. M. Nejad, H. Özgüneş, and N. Başaran, "Pharmacological and toxicological properties of eugenol," *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 14, No. 2, pp. 201-206, 2017.
- [15] F. Ermawati, R. Sari, N. Putri, L. Rohmawati, D. Kusumawati, and Z. Supardi, "Antimicrobial activity analysis of *Piper betle* Linn leaves extract from Nganjuk, Sidoarjo and Batu against *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*," in *Journal of Physics: Conference Series*, 2021, Vol. 1951, No. 1, pp. 012004, 2021.

COMPARATIVE STUDY OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FRESH AND DRIED LEAVES EXTRACTS OF *Piper betle* L.

Vo Thi Phuoc*, Nguyen Thi Tam, Che Thi Cam Ha

University of Sciences, Hue University

SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect on total antioxidant and antibacterial activity in fresh and dried leaves extracts of *Piper betle* L. Extracts of fresh and dried betel leaves were studied for their antioxidant activity through DPPH free radical scavenging *in vitro*. The antioxidant activity was exhibited significantly higher in dry leaves ($IC_{50} = 3,21$ mg/ml) than fresh one ($IC_{50} = 22,97$ mg/ml). The antibacterial activities of fresh and dried betel

* Author for correspondence: Tel: 0935290952; Email: vothiphuoc@husc.edu.vn

leaf extracts were similar on three strains of *Salmonella typhi*, *Bacillus pumilus* and *Staphylococcus aureus*. However, for *Escherichia coli* strain, fresh betel leaf extract showed higher antibacterial ability than dried betel leaf. Hence the antioxidant and antibacterial activity of *Piper betle* L. is highly correlated to the dry and fresh condition.

Keywords: DPPH, GC-MS, antibacterial, *Piper betle* L. leaves, fresh and dried leaves.