

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT TRÁI BỤP GIẤM (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Nguyễn Văn Ấy^{1*}, Trần Nguyễn Phương Lam², Trần Trường Tánh², Nguyễn Vĩ Khang³ và Lê Thị Diễm Ái⁴

¹Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Lớp Sinh học Ứng dụng khóa 43, Trường Đại học Cần Thơ

³Lớp Sinh học Ứng dụng khóa 44, Trường Đại học Cần Thơ

⁴Trường Cao đẳng Cộng đồng Hậu Giang

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Văn Ấy (email: nvay@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The experiment was conducted to investigate the content of some common compounds present in the ethanolic flesh extract of *Hibiscus sabdariffa* L., the antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the flesh ethanolic extract. By spectroscopic method, the content of total phenolic and flavonoid compounds in the extract was determined at 378.09 and 1473.00 mg/g DW, respectively. Besides, the antioxidant capacity was also investigated based on ability to neutralize DPPH free radicals ($EC_{50}= 465.75 \mu\text{g/mL}$) and reduce iron ($EC_{50}= 259.24 \mu\text{g/mL}$). At the same time, the resistance to bacterial strains of the extract also showed resistance to *Bacillus subtilis*, *B. cereus* ATCC10876, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Listeria innocua* ATCC33090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella* sp. and *Escherichia coli* ATCC25922 with minimal inhibitory concentrations (MIC) ranging from about 16 to 32 mg/mL. Resistance to *Aspergillus niger* ATCC6275 was also recorded with high concentration of the ethanolic flesh extract as well.

TÓM TẮT

Thí nghiệm được thực hiện nhằm khảo sát hàm lượng của một số hợp chất phổ biến có trong dịch cao chiết trái bụp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.), khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn và kháng nấm của dịch cao chiết. Bằng phương pháp quang phổ, hàm lượng các hợp chất phenolic tổng và flavonoid tổng có trong cao chiết từ trái bụp giấm được xác định lần lượt là 378,09 và 1473,00 mg/g TLK, cho thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa hàm lượng hai hợp chất. Khả năng kháng oxy hóa cũng được khảo sát dựa vào khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) ($EC_{50}= 465,75 \mu\text{g/mL}$) và khử sắt ($EC_{50}= 259,24 \mu\text{g/mL}$). Đồng thời, cao chiết từ trái bụp giấm cho thấy khả năng kháng các chủng vi sinh vật *Bacillus subtilis*, *B. cereus* ATCC10876, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Listeria innocua* ATCC33090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella* sp. và *Escherichia coli* ATCC25922 với nồng độ ức chế tối thiểu dao động từ khoảng 16 - 32 mg/mL. Ngoài ra khả năng kháng chủng nấm mốc *Aspergillus niger* ATCC6275 cũng ghi nhận được kết quả tương tự.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 10/06/2022

Ngày duyệt đăng: 13/06/2022

Title:

Investigation of the biological activities of ethanolic flesh extracts of *Hibiscus sabdariffa* L.

Từ khóa:

Cao chiết, dược chất, hoạt tính sinh học, trái bụp giấm

Keywords:

Biological activity, ethanolic extracts, *Hibiscus sabdariffa* L., phytochemicals

1. GIỚI THIỆU

Với khí hậu nhiệt đới gió mùa, Việt Nam trở thành quốc gia sở hữu nguồn tài nguyên thực vật phong phú, với hơn 12.000 loài thực vật bậc cao chứa các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học (Giang, 2017). Bụp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.) thuộc họ Malvaceae, có nguồn gốc ở Tây Phi, được trồng phổ biến ở các nước Trung Đông và ở hầu hết các nước nhiệt đới như Indonesia, Thái Lan, Ấn Độ, Bangladesh, Malaysia và Philippines (Khởi et al., 2013). Loài cây này không đòi hỏi nhiều kỹ thuật chăm sóc, phân bón, ... nên được xem là loài thực vật sạch tinh khiết và có giá trị dược liệu. Nhiều bộ phận như hạt, lá, quả và rễ được sử dụng trong các loại thực phẩm khác nhau: pha chế đồ uống thảo mộc, đồ uống lạnh và ấm, mứt và thạch (Abu - Tarboush et al., 1997). Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, búp giấm là nguồn dược phẩm sử dụng trong điều trị cao huyết áp (Chewonarin et al., 1999) tác dụng lợi tiểu, lợi mật, tiêu sốt làm giảm độ nhớt của máu và kích thích nhu động ruột, nhuận tràng, làm giảm cholesterol trong máu, chống xơ vữa động mạch, giảm sự đọng lipid ở gan và bảo vệ tế bào gan (Chi, 2005). Búp giấm mang đặc tính có lợi cho sức khỏe là nhờ hàm lượng polyphenol (các hợp chất flavonoid, tannin, quercetin, anthocyanin, saponin, terpenoids hay phenolic) (Peredo-Pozos et al., 2020) do mỗi hợp chất đều có hoạt tính sinh học khác nhau.

Hàm lượng các chất dự trữ phụ thuộc nhiều vào bộ phận, điều kiện sinh lý cũng như các giai đoạn phát triển của cây. Có nhiều nghiên cứu về tiềm năng khai thác cây búp giấm khác nhau như: đặc tính sinh học, tiềm năng sử dụng của cây (Vaidya, 2000; Mahadevan et al., 2009; Lim et al., 2014), hay khảo sát thành phần dinh dưỡng và dược chất trong hạt búp giấm (Osman et al., 1975; Salama & Ibrahim, 1979; Rao, 1996; Qi et al., 2005; Nzikou et al., 2011) hay hoạt tính sinh học (Salami & Anthony, 2020, Hoseini et al., 2021). Tuy nhiên, cho đến nay các nghiên cứu về trái búp giấm còn hạn chế, nhất là ở nước ta. Do đó, việc nghiên cứu các cơ sở khoa học để phát hiện, khai thác, sử dụng có hiệu quả cũng như bảo tồn và phát triển bền vững nguồn tài nguyên thực vật chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học của trái búp giấm là một trong những vấn đề cần được quan tâm và nghiên cứu.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và thiết bị

Cây búp giấm (*H. sabdariffa* L.) được trồng tại nhà lưới; mẫu trái được thu hoạch, xử lý và lưu trữ

tại phòng thí nghiệm Sinh lý Thực vật, khoa Nông nghiệp, trường Đại học Cần Thơ.

Thiết bị: Máy quang phổ UV-VIS, bể rửa siêu âm (Branson 3150), máy ly tâm (Rotina 35 và Biogues), cô quay chân không (Laborota L4000), máy đánh sóng siêu âm, nồi hấp thanh trùng, tủ cấy vi sinh (ESCO), tủ cấy vi nấm, tủ sấy, máy đo pH (Lab 850) ...

Mẫu vi khuẩn và nấm: *Bacillus subtilis*, *B. cereus* ATCC10876, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Listeria innocua* ATCC33090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella* sp. và nấm mốc *Aspergillus niger* ATCC6275.

2.2. Hóa chất

Hóa chất dùng trong định lượng các hợp chất: thuốc thử Follin-Ciocalteu, gallic acid, NaNO₂, quercetin (Merck); Ethanol, Na₂CO₃ (Trung Quốc).

Hóa chất dùng trong kháng oxy hóa: DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), gallic acid (Merck); methanol, Na₂HPO₄.12H₂O, NaH₂PO₄.2H₂O, K₃Fe(CN)₆, Cl₃CCOOH, FeCl₃... (Trung Quốc).

Hóa chất dùng trong kháng khuẩn: agar, NaCl, pepton, yeast extract...(Merck)

Hóa chất dùng trong kháng nấm: agar, D-Glucose (Merck).

Đối chứng: DMSO (Dimethyl sulfoxide: đối chứng âm), Tetracycline và Ketoconazole (đối chứng dương) (Merck).

2.3. Chuẩn bị dịch cao chiết

Sau khi thu hoạch, trái búp giấm được tách lấy phần thịt, làm sạch và để ráo ở nhiệt độ phòng (Hình 1). Sau đó, ta tiến hành sấy ở nhiệt độ ≤ 40°C bằng tủ sấy đến khi khối lượng không đổi. Mẫu được nghiền thành bột có kích thước hạt đồng nhất để tiến hành thí nghiệm. Sau đó, mẫu bột được ngâm trong ethanol tuyệt đối trong bình tam giác 1000 mL với thời gian 15 ngày. Mẫu được siêu âm 30 phút/lần/ngày. Sau đó, hỗn hợp được lọc bằng giấy lọc. Dịch lọc được cô quay chân không ở nhiệt độ 45°C đến khi thể tích không đổi. Mẫu tiếp tục được đông khô để loại bỏ hoàn toàn nước. Cao chiết trái búp giấm được bảo quản ở -20°C để tiến hành thí nghiệm.



Hình 1. Phần thịt trái búp giấm sau khi tách khỏi trái

2.4. Xác định hàm lượng phenolic tổng

Hàm lượng phenolic tổng được xác định thông qua phương pháp Folin-Ciocalteu (Yadav & Agarwala, 2011). Dựa vào phản ứng oxy hóa, các hợp chất polyphenol bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu, gallic acid được dùng làm chất chuẩn.

Đường chuẩn được xây dựng bằng gallic acid có nồng độ: 20, 40, 60, 80 và 100 $\mu\text{g/mL}$. Mẫu dịch cao chiết trái búp giấm được pha loãng ở nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$ để phân tích.

Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch gallic acid (nồng độ 20, 40, 60, 80 và 100 $\mu\text{g/mL}$) vào 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và để phản ứng trong 5 phút. Sau đó, 2 mL được thêm vào dung dịch Na_2CO_3 7,5%. Sau 30 phút phản ứng, độ hấp thụ được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 765 nM. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị OD được ghi nhận và vẽ đường thẳng tuyến tính để xác định hàm lượng phenolic tổng trong mẫu cao chiết. Các mẫu cao chiết được tiến hành tương tự với gallic acid. Thí nghiệm lặp lại 3 lần/mẫu.

2.5. Xác định hàm lượng flavonoid tổng

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định theo mô tả của Bhaigyabati et al. (2014) có hiệu chỉnh với chất chuẩn là quercetin ở các nồng độ 50, 100, 150, 200 và 250 $\mu\text{g/mL}$. Mẫu dịch cao chiết trái búp giấm được pha loãng với nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$ bằng ethanol để phân tích.

Cho lần lượt từng nồng độ của dung dịch quercetin vào hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL quercetin và 1 mL nước cất, thêm tiếp 0,2 mL NaNO_2 5% và để phản ứng trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được cho thêm 0,2 mL AlCl_3 10% để phản ứng trong 5 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm vào 2 mL NaOH 1 M và 0,6 mL nước cất, lắc đều và tiến hành xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 510 nM. Mỗi nồng độ quercetin được lặp lại 3 lần. Kết quả OD được ghi nhận và tiến hành vẽ

đường thẳng tuyến tính để xác định hàm lượng flavonoid trong các mẫu cao trình. Các mẫu cao chiết được tiến hành tương tự với quercetin. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.6. Khả năng kháng oxy hóa

2.6.1. Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của cao chiết trái búp giấm

Gallic acid được sử dụng làm chất chuẩn ở nồng độ từ 1-10 $\mu\text{g/mL}$. Đồng thời, cao chiết được pha loãng thành dãy nồng độ: 200, 400, 600, 800 và 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Mẫu thử: 500 μL dung dịch DPPH được tiến hành hút vào các eppendorf, sau đó, cho thêm vào 500 μL dung dịch gallic acid (nồng độ từ 1-10 $\mu\text{g/mL}$). Hỗn hợp được ủ trong tối 30 phút và đo OD ở bước sóng 517 nM (Saifeldin, 2008). Mỗi nồng độ gallic acid được lặp lại 3 lần. Kết quả đo OD được ghi nhận, tính toán và vẽ đường chuẩn. Đối với mẫu cao chiết được tiến hành tương tự như cách dựng đường chuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Mẫu trắng: Hút 500 μL DPPH cho vào giếng, sau đó thêm vào 500 μL methanol. OD được đo ở bước sóng 517 nM, với lặp lại 3 lần. Kết quả đo OD được ghi nhận và vẽ đồ thị. Phần trăm DPPH bị ức chế được tính theo công thức của Mishra et al. (2012) như sau:

$$\text{EC (\%)} = \frac{\text{A}_{\text{blank}} - \text{A}_{\text{mẫu}}}{\text{A}_{\text{blank}}} \times 100$$

Trong đó: EC: Khả năng ức chế DPPH (%)

A_{blank} : Giá trị mật độ quang của mẫu trắng

$\text{A}_{\text{mẫu}}$: Giá trị mật độ quang của mẫu cao chiết

Đường chuẩn được xây dựng với phần trăm ức chế DPPH thu được ở các nồng độ khác nhau. Từ đó, ta tính được giá trị EC_{50} (nồng độ cao chiết và gallic acid).

2.6.2. Khảo sát khả năng khử sắt của cao chiết trái búp giấm

Khả năng khử sắt của cao chiết được thực hiện theo phương pháp của Oyaizu (Lý và ctv. (2021) và có hiệu chỉnh. Trong đó, chất chuẩn gallic acid được có nồng độ lần lượt là 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 $\mu\text{g/mL}$. Đồng thời, cao chiết cũng được pha thành các nồng độ: 100, 200, 300, 400 và 500 $\mu\text{g/mL}$.

Mẫu thử: Hỗn hợp phản ứng gồm 0,4 mL chất đối chứng gallic acid, 0,4 mL đệm phosphate 0,2 M pH 6,6 và 0,4 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%. Hỗn hợp được tiến hành ủ ở nhiệt độ 50°C và trong thời gian 20 phút. Sau đó, hỗn hợp được thêm 0,4 mL Cl_3CCOOH và ly tâm 3000 vòng/phút ở nhiệt độ

phòng trong 10 phút. 0,5 mL phần trên của hỗn hợp được lấy nhẹ nhàng, rồi thêm 0,5 mL nước cất và 0,1 mL FeCl₃ 0,1% vào eppendorf, lắc đều. Mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Độ hấp thu được đo ở bước sóng 700 nM, ghi nhận kết quả, tính toán và vẽ đường chuẩn. Đối với mẫu cao chiết, tiến hành tương tự như đường chuẩn. Thí nghiệm lặp lại 3 lần/nồng độ chất chuẩn.

Mẫu trắng: Được thực hiện tương tự, 0,4 mL mẫu thử nghiệm được thay bằng 0,4 mL methanol. Nồng độ mẫu được tính từ đồ thị giá trị OD theo nồng độ tại độ hấp thu 0,5 (EC₅₀). Lặp lại 3 lần tương ứng với 5 nồng độ và đo độ hấp thu ở bước sóng 700 nM.

Xây dựng đường chuẩn với phân trăm khử sắt thu được ở các nồng độ khác nhau. Từ đó, ta tính được giá trị EC₅₀ (nồng độ cao chiết và gallic acid).

2.7. Phương pháp kháng vi sinh vật

2.7.1. Phương pháp kháng khuẩn

Quy trình kháng khuẩn được thực hiện dựa trên phương pháp của Trang (2019), quy trình có hiệu chỉnh. Môi trường LB Broth powder, pH=7,2 được sử dụng và đĩa petri được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Thí nghiệm được thực hiện trên 7 loài vi khuẩn *B. subtilis*, *B. cereus* ATCC10876, *S. aureus* ATCC25923, *L. innocua* ATCC33090, *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* ATCC25922 và *Salmonella* sp.. Đối chứng dương là tetracyclin 0,5 µg/mL, pha loãng bằng dung môi DMSO 5% và đối chứng âm là DMSO 5%. Mẫu thí nghiệm: nồng độ cao chiết là 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 mg/mL, sử dụng dung môi DMSO 5% để pha loãng.

Các mẫu dịch vi sinh vật được nuôi ở giai đoạn quân bình (stationary phase). Sau đó, mẫu dịch được thu hoạch và pha loãng để đạt nồng độ 1x10⁶ bào tử/ml trong các thử nghiệm. Thể tích sử dụng của mỗi loại vi sinh vật là 1ml/đĩa petri thử nghiệm.

Thí nghiệm kháng khuẩn được tiến hành bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Dịch nuôi vi khuẩn sau khi đạt nồng độ mong muốn, ta sẽ tiến hành trải một lớp khuẩn mỏng lên đĩa môi trường. Sau khi lớp khuẩn khô, ta dùng đầu côn vô trùng khoan 5 giếng trên đĩa môi trường, kích thước đầu côn là 9 mM. 50 µL các nồng độ của dung dịch thí nghiệm được tiến hành rút và lần lượt bơm vào các giếng. Mỗi loại vi khuẩn khảo sát là 1 đĩa bao gồm 3 giếng với 3 nồng độ dịch cao chiết và 1 giếng đối chứng dương. Sau đó, các đĩa sẽ được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Tiến hành lấy chỉ tiêu và tính toán kết quả. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.7.2. Phương pháp kháng nấm

Quy trình kháng nấm được thực hiện dựa trên phương pháp của Trang và ctv. (2020), quy trình có hiệu chỉnh. Môi trường PDA và đĩa petri được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

Thí nghiệm được thực hiện trên loài vi nấm *A. niger* ATCC6275 bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch tương tự thí nghiệm kháng khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đối chứng dương là ketoconazole 0,5 µg/mL và đối chứng âm là DMSO 5%. Mẫu thí nghiệm: Dây nồng độ cao chiết được sử dụng là 32, 64, 128, 256, 512, 1024 mg/mL và dung môi DMSO 5% được sử dụng để pha loãng.

2.8. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2019 và phần mềm SPSS 22.0, phân tích phương sai, so sánh các giá trị trung bình bằng phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5% hoặc 1%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng số trong trái búp giấm

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng phenolic và flavonoid tổng số có trong thịt trái Búp giấm Bảng 1). Trong đó, hàm lượng flavonoid cao hơn hàm lượng phenol tổng số được thể hiện ở Bảng 1 (lần lượt là 1473,00 mg/g TLK và 328,09 mg/g TLK). Kết quả nghiên cứu có sự tương quan nhất định với các nghiên cứu trước đây về sự chênh lệch hàm lượng giữa các hợp chất khác nhau. Thịt của trái búp giấm là nguồn nguyên liệu rất giàu flavonoid và nhiều hợp chất phytochemical (Alara et al., 2020). Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Anh et al. (2016) khi chiết xuất thịt trái búp giấm bằng dung môi methanol cho thấy hàm lượng phenolic tổng số thấp hơn hàm lượng flavonoid tổng số. Từ đó, có thể thấy rằng, thịt trái búp giấm rất giàu flavonoid, đặc biệt là quercetin và anthocyanin (Anh et al., 2016). Flavonoid là nhóm chất chống oxy hóa chính. Trong đó, quercetin, myricetin và proanthocyanidins, dẫn xuất epigallocatechin và catechin loại epigallocatechin-gallate là những flavonoid được tìm thấy trong *H. sabdariffa* (Chien-Ning et al., 2009). Anthocyanin (delphinidin 3-O-sambubioside và cyanidin 3-O-sambubioside) là một trong những flavonoid có sự hiện diện và hoạt tính lớn nhất (Mahadevan et al., 2009). Từ những kết quả trên cho thấy, trái *H. sabdariffa* là một nguồn chất chống oxy hóa tự nhiên tiềm năng (Fitrotunnisa et al., 2019).

Nhu cầu tiêu thụ *H. sabdariffa* (Roselle) trên toàn thế giới rất cao do nó sở hữu các đặc tính có lợi cho sức khỏe của con người nhờ vào hàm lượng polyphenol (các hợp chất flavonoid, tannin, phenolic...) (Peredo-Pozos et al., 2020), là nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp phổ biến của thực vật. Việc nghiên cứu về chỉ số các hợp chất này sẽ giúp ích cho công tác nghiên cứu và trích ly các hợp chất thực vật có hiệu quả, phù hợp với mục đích để đạt hiệu quả cao nhất.

3.2. Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết trái bụp giấm

Khả năng kháng gốc tự do DPPH và khử sắt của cao chiết trái bụp giấm được thể hiện ở Bảng 1. Từ các giá trị EC₅₀ được trình bày trong bảng cho thấy khả năng kháng gốc tự do DPPH và khử sắt của cao chiết khảo sát thấp hơn so với gallic acid. Khả năng kháng gốc tự do DPPH của cao chiết trái bụp giấm (EC₅₀ = 465,75 µg/mL) thấp hơn so với gallic acid (EC₅₀ = 6,76 µg/mL) được dùng khảo sát là 68,898 lần. Khả năng khử sắt của cao chiết (EC₅₀ = 259,24 µg/mL) thấp hơn so với acid gallic (EC₅₀ = 1,79 µg/mL) được dùng khảo sát là 144,83 lần.

Qua hai chỉ tiêu khảo sát về khả năng ức chế gốc tự do (DPPH và khử sắt), kết quả cho thấy khả năng

kháng gốc oxy hóa của cao chiết trái bụp giấm và gallic acid tăng dần theo nồng độ. Hàm lượng của các hợp chất polyphenol liên quan mật thiết đến hoạt động chống oxy hóa, hoạt động chống oxy hóa với chiết xuất còn cho thấy khả năng khử cao nhất (Al-Hashimi, 2012). Tính kháng oxy hóa của một chất sẽ phụ thuộc vào số lượng gốc nhóm hydroxyl do tác dụng thu dọn các gốc tự do của chúng. Chẳng hạn như đặc điểm chung của hợp chất polyphenol là trong phân tử có vòng thơm (vòng benzen) chứa một hay hai, ba hoặc nhiều nhóm hydroxyl (OH) gắn trực tiếp vào vòng benzen. Tùy thuộc vào số lượng và vị trí tương hỗ của các nhóm OH với bộ khung hóa học mà các tính chất lý hóa học hoặc hoạt tính sinh học thay đổi. Bên cạnh đó, sự hiện diện của liên kết đôi C=C và nhóm carbonyl trong phân tử sẽ tạo sự liên hợp giúp bền vững hóa các gốc tự do, từ đó giúp làm tăng hoạt tính kháng oxy hóa của hợp chất. Do đó, khi nồng độ chất chống oxy hóa càng cao, số lượng các gốc nhóm hydroxyl sẽ càng cao thì hoạt động khử gốc tự do càng mạnh (Marzoug et al., 2011). Tuy nhiên, khả năng ức chế gốc tự do của cao chiết trái bụp giấm thấp hơn gallic acid. Ngoài ra, gallic acid là một sản phẩm được thương mại hóa có độ tinh sạch cao, được biết đến với khả năng kháng oxy hóa mạnh nên hiệu quả ức chế gốc tự do cao hơn cao chiết trái bụp giấm.

Bảng 1. Thành phần một số hợp chất hóa học và hoạt tính sinh học của cao chiết trái bụp giấm

Loại mẫu	Phenolic tổng số (mg/g TLK) ⁽¹⁾	Flavonoid tổng số (mg/g TLK) ⁽²⁾	Kháng DPPH (µg/mL)	Khử sắt (µg/mL)
Trái bụp giấm	328,09 ± 0,05	1473,00 ± 0,07		
Cao chiết trái bụp giấm			6,76 ⁽³⁾	1,79 ⁽⁵⁾
Gallic acid			465,75 ⁽⁴⁾	259,24 ⁽⁶⁾

⁽¹⁾: Giá trị được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của gallic acid ($y = 0,0105x + 0,0254$; $R^2 = 0,9982$)

⁽²⁾: Giá trị được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của quercetin ($y = 0,001x + 0,0095$; $R^2 = 0,9942$)

⁽³⁾: Giá trị EC₅₀ của gallic acid được xác định dựa vào phương trình tuyến tính $y = 6,6355x + 4,8464$ ($R^2 = 0,9818$)

⁽⁴⁾: Giá trị EC₅₀ của cao chiết trái bụp giấm được xác định dựa vào phương trình $y = 0,0877x + 9,1538$ ($R^2 = 0,9635$)

⁽⁵⁾: Giá trị EC₅₀ của gallic acid được xác định dựa vào phương trình $y = 28,424x - 0,7856$ ($R^2 = 0,9978$)

⁽⁶⁾: Giá trị EC₅₀ của cao chiết trái bụp giấm được xác định dựa vào phương trình $y = 0,1924x + 0,1215$ ($R^2 = 0,9871$)

3.3. Khả năng kháng vi sinh vật của cao chiết trái bụp giấm

3.3.1. Khả năng kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn thể hiện hoạt tính sinh học của các hợp chất có trong cao chiết trái bụp giấm (*H. sabdariffa* L.). Khả năng ức chế vi khuẩn được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch với 7 loài vi khuẩn: *B. cereus* ATCC10876, *B. subtilis*, *S. aureus* ATCC25923, *L. innocua* ATCC33090, *P. aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella* sp., *E. coli* ATCC25922.

Từ Bảng 2, đường kính vòng kháng khuẩn tỉ lệ thuận với nồng độ cao chiết được sử dụng, đồng nghĩa với khả năng kháng khuẩn tăng khi nồng độ cao chiết tăng. Các vùng ức chế đĩa, nếu vòng vô khuẩn ≥ 7 mM trên mẫu dịch chiết thô được thử nghiệm được coi là hoạt động kháng khuẩn tốt, ngược lại vi khuẩn kháng với dịch chiết thô nếu vòng vô khuẩn < 7 mM (Nascimento et al., 2000). Các kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy, khả năng ức chế sự phát triển của tất cả các vi khuẩn Gram dương và Gram âm đã được thử nghiệm, tạo ra các vùng kháng rõ ràng (Hình 2) so với các kết quả dùng

kháng sinh, khác biệt có ý nghĩa 1%. Hoạt động kháng khuẩn của cao chiết tương tác tốt đối với các chủng Gram dương *B. cereus* ATCC10876 (7,89 mM), tiếp theo là *S. aureus* ATCC25923 (7,81 mM), *L. innocua* ATCC33090 (7,77 mM), *B. subtilis* (7,49 mM). Đối với các chủng Gram âm kết quả lần lượt là *P. aeruginosa* ATCC27853 (7,61), tiếp theo là *Salmonella* sp. (7,56 mM) và cuối cùng là *E. coli* ATCC25922 (7,44 mM).

Tương tự, một số nghiên cứu trước đây đã được báo cáo về các chiết xuất từ thịt trái cây *H. sabdariffa* sử dụng các dung môi, nồng độ, và các chủng vi khuẩn khác nhau thì kết quả trên cho thấy sự tương đồng nhất định. Các nghiên cứu như ức chế sự phát triển của *S. aureus* kháng methicillin, ức chế

S. aureus (Alaa, 2012), vi khuẩn phân lập từ nước thải *P. aeruginosa* (Khalaphallah & Soliman, 2014). Nghiên cứu chiết xuất trong nước-methanol của *H. sabdariffa* khô cho thấy tác dụng ức chế *in vitro* đối với các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* (Chao & Yin, 2009). Dịch chiết methanol của thịt trái ức chế *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 10876, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Abdallah, 2016). Đối với vi khuẩn *B. subtilis* và *L. innocua* vẫn chưa có nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của cao chiết trái bụp giấm (Chao & Yin, 2009). Từ kết quả trên cho thấy cao chiết trái bụp giấm có khả năng kháng khuẩn ở nhiều nồng độ đối với tất cả các chủng vi khuẩn trong thí nghiệm, tuy nhiên nồng độ kháng còn cao và đường kính kháng thấp.

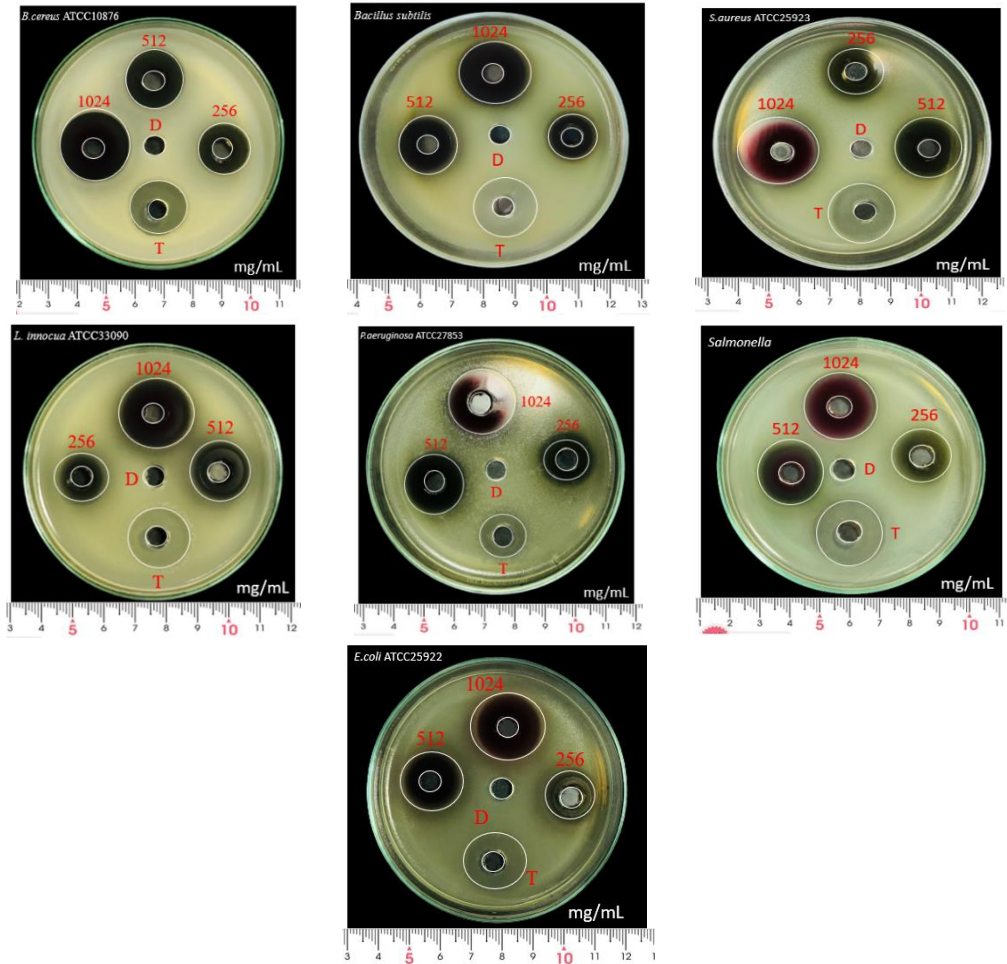
Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết trái bụp giấm

Nồng độ thí nghiệm (mg/mL)	Đường kính vòng vô khuẩn (mM)						
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E. coli</i>
16	1,78 ^g	-	1,44 ^g	1,90 ^g	-	1,56 ^g	-
32	3,33 ^f	1,56 ^f	3,99 ^f	3,01 ^f	1,78 ^f	2,78 ^f	1,48 ^f
64	5,33 ^e	3,33 ^e	5,64 ^e	4,03 ^e	3,83 ^e	4,57 ^e	2,74 ^e
128	7,89 ^d	5,56 ^d	6,56 ^d	5,33 ^d	6,08 ^d	6,37 ^d	4,67 ^d
256	10,22 ^c	7,49 ^c	7,81 ^c	7,77 ^c	7,61 ^c	7,56 ^c	7,44 ^c
512	12,56 ^b	11,48 ^b	12,47 ^b	11,80 ^b	10,98 ^b	12,79 ^b	11,58 ^b
1024	16,78 ^a	16,44 ^a	18,70 ^a	16,48 ^a	15,91 ^a	15,74 ^a	15,77 ^a
Tetracycline (0,5 mg/mL)	9,67^c	11,77^b	12,73^b	11,53^b	6,13^d	12,57^b	11,80^b
F	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	4,45	4,48	3,34	3,35	2,81	4,24	2,88

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt có ý nghĩa 1%

Khả năng kháng vi sinh vật của chiết xuất từ thực vật không chỉ phụ thuộc vào một hoạt chất chính mà còn là sự hoạt động kết hợp của những hợp chất khác nhau (Sunayana et al., 2003). Theo các nghiên cứu đã công bố, trái bụp giấm còn có rất nhiều hợp chất khác ngoài phenolic, tannin, flavonoid như terpenoid, alkaloid, cardenolides (Mahadevan et al., 2009). Các hoạt chất này có vai trò quan trọng trong việc giúp thực vật kháng lại nhiều vi sinh vật, các động vật ăn cỏ và các loài côn trùng theo nhiều cơ chế khác nhau tùy theo hợp chất. Các flavonoid có khả năng kháng khuẩn do chúng có khả năng tạo phức với các protein ngoại bào và thành tế bào vi khuẩn, gây phá vỡ màng tế bào của chúng. Nhìn chung, các thành phần kháng khuẩn của chiết xuất

thực vật sẽ tương tác với các enzyme hoặc protein của màng tế bào vi khuẩn gây ra sự phân tán của các dòng proton, ảnh hưởng tính thấm thấu hoặc ức chế enzyme sinh tổng hợp amino acid của vi khuẩn. Từ đó, các hợp chất thực vật thứ cấp có trong thịt trái bụp giấm hoàn toàn có khả năng kháng khuẩn và có thể sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh do vi khuẩn gây ra. Trong đề tài này, dung môi ethanol tuyệt đối được sử dụng để trích cao chiết, có thể dung môi chưa tách được tất cả các thành phần có trong trái bụp giấm. Do đó, kết quả kháng khuẩn có sự chênh lệch nhất định so với các nghiên cứu sử dụng phương pháp khác. Tuy nhiên, nồng độ kháng khuẩn của trái bụp giấm cũng nằm ở mức khá cao (mg/mL).

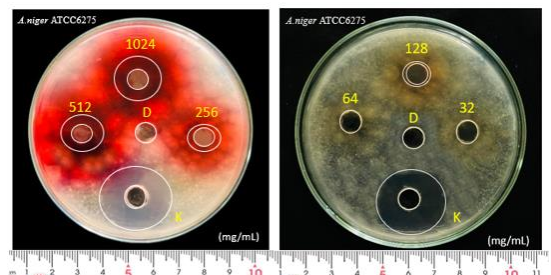


Hình 2. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết trái bưởi giấm, đối chứng tetracycline 0,5 mg/mL (T) và đối chứng DMSO 5% (D) trên 7 chủng vi khuẩn

3.3.2. Khả năng kháng nấm

Tương tự như hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính kháng nấm của cao chiết trái bưởi giấm (Bảng 3 và Hình 3). Khả năng ức chế vi nấm được khảo sát trong thí nghiệm này bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch với chủng nấm mốc *A. niger* ATCC6275. Cao chiết ở nồng độ 1024 mg/mL cho kết quả kháng nấm cao nhất, với đường kính vòng vô nấm đo được là 5,78 mM (Bảng 5). Ở các nồng độ cao chiết còn lại, đường kính vòng kháng nấm *A. niger* tăng tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết của cao chiết trái bưởi giấm, kết quả có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Điểm tương đồng của nghiên cứu trên với các nghiên cứu đã công bố trước đó chính là chiết xuất bưởi giấm có đặc tính kháng khuẩn và kháng nấm (Serifat & Anthony, 2020). Chiết xuất từ thịt trái bưởi giấm có tác dụng ức chế quá trình trao đổi chất trên con đường sinh tổng hợp aflatoxin của *A. parasiticus* CBS 9217 và *A. flavus* SQU 21 và có thể

được sử dụng như một chất kiểm soát sinh học hiệu quả và các chất bảo quản sinh học không độc hại trong công nghiệp thực phẩm chống lại sự ô nhiễm aflatoxin (El-Nagerabi et al., 2012).



Hình 3. Hoạt tính kháng vi nấm của cao chiết trái bưởi giấm, đối chứng ketoconazole 0,5 mg/mL (T) và DMSO 5% (D) trên *A. niger* ATCC6275

Bảng 3. Khả năng kháng nấm của cao chiết trái búp giấm

Nồng độ cao chiết (mg/mL)	Đường kính vòng vô khuẩn (mM)
128	1,27 ^c
256	2,81 ^d
512	4,47 ^c
1024	5,78 ^b
Ketoconazole (0,5 mg/mL)	20,63^a
F	**
CV (%)	3,56

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt có ý nghĩa 1%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdallah, E. M. (2016). Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5(2), 186-191. <https://doi.org/10.5455/jice.20160320022623>

Abu-Tarboush, H. M., Ahmed, S. A. B., & Al Kahtani, H. A. (1997). Some nutritional and functional properties of karkade (*Hibiscus sabdariffa*) seed products. *Cereal Chemistry*, 74(3), 352-355. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.3.352>

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Obanijesu, E. O., Alara, J. A., & Abdul Mudalip, S. K. (2020). Extract-rich in flavonoids from *Hibiscus sabdariffa* calyces: Optimizing microwave-assisted extraction method and characterization through LC-Q-TOF-MS analysis. *Journal of Food Process Engineering*, 43(2), 133-139. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13339>

Al-Hashimi, A. G. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *African Journal of Food Science*, 6(21), 506-511.

Anh, D. T. H., Hoang, L. H., Kitsamone, S., Uy, N. T., & Huy, N. Q. (2016). In vitro Antibacterial Activity of Quercetin Containing Extract from *Hibiscus Sabdariffa* L. Calyxes. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 32(1), 147-152.

Bhaigyabati, T. H., Devi, P. G., & Bag, G. C. (2014). Total flavonoid content and antioxidant activity of aqueous rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur valley. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 970-976.

Chao, C. Y., & Yin, M. C. (2009). Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết trái búp giấm có hàm lượng flavonoid và phenolic tổng số cao, lần lượt là lần lượt là 1473,00 mg/g TLK và 328,09 mg/g TLK.

Cao chiết trái búp giấm có khả năng kháng các gốc oxy hóa và kháng đa dạng các các chủng vi sinh vật được khảo sát. Từ đó, kết quả của nghiên cứu này cho thấy búp giấm có tiềm năng rất lớn trong công tác nghiên cứu và ứng dụng vào các sản phẩm sinh học trong tương lai.

juice. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(2), 201-206. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0187>

Chewonarin, T., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., Vinitketkumnuen, U., & Ohnishi, Y. (1999). Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine in F344 rats. *Food and chemical toxicology*, 37(6), 591-601. [https://doi.org/10.1016/S02786915\(99\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S02786915(99)00041-1)

Chi, V.V. (2005). *Từ điển cây thuốc Việt Nam - tập 2*. Nhà xuất bản Y học.

Định, P. K., Tuấn, N. T., & Trang, Đ.T. X (2019). Hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ gan của cao chiết Lá Gáo Trắng (*Neolamarckia cadamba* (ROXB.) BOSSER). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(5A), 24-31. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2019.124>

El-Nagerabi, S. A., Al-Bahry, S. N., Elshafie, A. E., & AlHilali, S. (2012). Effect of *Hibiscus sabdariffa* extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains. *Food Control*, 25(1), 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.033>

Ferreira I. C., Baptista P., Vilas-Boas M. & Barros L., (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food chemistry*, 100(4), 1511-1516.

Fitrotunnisa, Q., Arsianti, A., Tejaputri, N. A., & Qorina, F. (2019). Antioxidative activity and phytochemistry profile of *Hibiscus sabdariffa* herb extracts. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(Special Issue 6), 29-32. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s6.33532>

- Giang, P. T. (2017). *Đa dạng sinh học và tiềm năng to lớn của cây thuốc Việt Nam*. Viện Nghiên cứu phát triển y dược cổ truyền Việt Nam.
- Hoseini, S. M., Hoseinifar, S. H., & Doan, H. V. (2021). Growth performance and hematological and antioxidant characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets supplemented with Roselle, *Hibiscus sabdariffa*. *Aquaculture*, 530, 735-827. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735827>
- Huang, C. N., Chan, K. C., Lin, W. T., Su, S. L., Wang, C. J., & Peng, C. H. (2009). Hibiscus sabdariffa Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration Induced by High Glucose A Mechanism Involves Connective Tissue Growth Factor Signals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3073-3079. <https://doi.org/10.1021/jf803911n>
- Khalaphallah, R., & Soliman, W. S. (2014). Effect of henna and roselle extracts on pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4): 292-296. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60575-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60575-2)
- Khôi, N. M., Thuận, N. V. & Luật, N. Q. (2013). *Kỹ thuật trồng cây thuốc*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp – Hà Nội.
- Lan, T. N. P., Khanh, H. Q., Nhựt, V. M., Hưng, L. P., Phúc, M. V., Hữu, B. V., Công, N. T., Công, L. T., & Sơn, N. T. (2020). Tối ưu hóa hiệu suất trích ly tinh dầu Bưởi của thiết bị trích ly dạng pilot. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(5A), 10-19. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.107>
- Lim, T. K., (2014). *Hibiscus sabdariffa*, Edible Medicinal and Non Medicinal Plants, 324-370. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8748-2_23
- Lý, B. T. K., Oanh, N. T. M., Thương, N. T. L., & Chi, H.T. (2021). Đánh giá hoạt tính sinh học của chao chiết Nghệ Trắng (*Curcuma aromatica* Salisb). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm Tp. Hồ Chí Minh*, 18(6), 1028-1040. [https://doi.org/10.54607/hcmue.js.18.6.2869\(2021\)](https://doi.org/10.54607/hcmue.js.18.6.2869(2021))
- Mahadevan, N., Shivali, & Kamboj, P. (2009). *Hibiscus sabdariffa* Linn. – An overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 8(1), 77-83.
- Marzoug, H. N. B., Romdhane, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., Abderraba, M. & Bouajila, J. (2011). Eucalyptus oleosa essential oils: chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules*, 16(2), 1695-1709. <https://doi.org/10.3390/molecules16021695>
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 31(4), 247-256. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>
- Nzikou, J. M., Bouanga-Kalou, G., Matos, L., Ganongo-Po, F. B., Mboungou-Mboussi, P. S., Moutoula, F. E., Panyoo-Akdowa, E., Silou, T. H., & Desobry, S., (2011). Characteristics and nutritional evaluation of seed oil from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Congo-Brazzaville. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(2), 141-146.
- Osman A., Younes M., & Mokhtar A.. (1975). Chemical Examination of Local Plants. XIII. Elucidation of the Structure of a New Glycoside from the Leaves of Egyptian *Hibiscus sabdariffa*. *Australian Journal of Chemistry*, 28(1), 217 – 220. <https://doi.org/10.1071/CH9750217>
- Peredo-Pozos, G. I., Ruiz-López, M. A., Zamora Natera, J. F., Álvarez Moya, C., Barrientos Ramírez, L., Reynoso Silva, M., & Vargas Radillo, J. J. (2020). Antioxidant capacity and antigenotoxic effect of Hibiscus sabdariffa L. extracts obtained with ultrasound-assisted extraction process. *Applied Sciences*, 10(2), 560. <https://doi.org/10.3390/app10020560>
- Rao, P. U. (1996). Nutrient composition and biological evaluation of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 49, 27-34. <https://doi.org/10.1007/BF01092519>
- Salama, R. B., & Ibrahim, S. A.. (1979). Ergosterol in *Hibiscus sabdariffa* Seed Oil. *Planta Med*, 36(7), 221-222. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097275>
- Salami, S. O., & Anthony J. A. (2020). Assessment of Antimicrobial Activities and Toxicological Effects of Green and Red Cultivars of Roselle - *Hibiscus sabdariffa* L. *European Journal of Medicinal Plants*, 31(15), 11-22. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2020/v31i1530320>
- Serifat, O. S., & Anthony, J. A. (2020). Assessment of Antimicrobial Activities and Toxicological Effects of Green and Red Cultivars of Roselle - *Hibiscus sabdariffa* L. *European Journal of Medicinal Plants*, 31(15), 11-22. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2020/v31i1530320>
- Sunayana, V., Vadivukkarasi, P., Rajendran, A., Xavier, T. F. & Natarajan, E. (2003). Antibacterial potential of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. *A study in vitro*. *J Swamy Bot Club*, 20, 55-58.

- Trang, Đ. T. X. (2019). *Giáo trình Thực tập Thử nghiệm sinh học*. Khoa Khoa học Tự nhiên, Nhà xuất bản Trường Đại học Cần Thơ.
- Trang, Đ. T. X., Linh, T. C., Hậu, L. B., Huân, P. N. K., & Hằng, P. T. H. (2020). Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng nấm của một số cao chiết thuộc họ gừng (Zingiberaceae) và họ Củ Nâu (Dioscoreaceae). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(5A), 52-59.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.111>
- Vaidya, K. R. (2000). Natural cross-pollination in roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 23(3) 667-669.
<https://doi.org/10.1590/S141547572000000300027>
- Yadav, R., & Agarwala, M. (2011). *Phytochemical analysis of some medicinal plants*. *Journal of phytology*, 3(12), 10-14.
- Qi, Y., Chin, K. L., Malekian, F., Berhane, M., Gager, J. (2005)(2005). Biological Characteristics, Nutritional and Medicinal Value of Roselle, *Hibiscus Sabdariffa*, *Circular – Urban Forestry Natural Resources and Environment*, 604, 1-2.
- Yin, M. C., & Chao, C. Y. (2008). Anti-Campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. *International journal of food microbiology*, 127(1-2), 73-77.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.002>