

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.140

HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ LÁ CỐC TRẮNG (*Lumnitzera racemosa* Willd)

Huỳnh Kim Yến^{1,2}, Nguyễn Trọng Tuân¹, Trần Thanh Mến^{1*}, Phùng Thị Hằng¹, Nguyễn Hoàng Sơn¹, Trần Hoàng Lâm³, Trương Thị Tú Trân³ và Lê Trung Tín²

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Trường Đại học Kiên Giang

³Khoa Khoa học Thực phẩm và Sức khỏe, Trường Đại học Kiên Giang

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thanh Mến (email: ttmen@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/04/2021

Ngày nhận bài sửa: 29/05/2021

Ngày duyệt đăng: 29/10/2021

Title:

Antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extract of *Lumnitzera racemosa* Willd. leaves

Từ khóa:

ABTS, Cóc trắng, DPPH, kháng khuẩn, RP, TAC

Keywords:

ABTS, Anti-microbial, DPPH, *Lumnitzera racemosa*, RP, TAC

ABSTRACT

Lumnitzera racemosa Willd is a mangrove plant that grows wild in lots of mangrove forests with a great deal of precious medicinal properties. However, there have not been many studies on this species, especially in Vietnam. In this study, the phytochemical composition of ethanol extract of *L.racemosa* as well as antioxidant and antibacterial activities against pathogenic bacteria causing diseases in the aquaculture industry were performed. The research results showed that ethanol extract of *L.racemosa* contains polyphenol and flavonoid contents were determined 138.532 mg GAE/g and 182.014 mg QE/g, respectively. The results of antioxidant activity evaluation indicated that the ethanol extract of *L.racemosa* possessed the highest activity on three testing methods as ABTS^{•+} ($IC_{50}=20.461 \mu\text{g/mL}$), DPPH scavenging capacity ($IC_{50}=81.734 \mu\text{g/mL}$) và total antioxidant capacity ($OD_{0.5}=86.943 \mu\text{g/mL}$, followed by reduction capacity with the value of $OD_{0.5}=113.108 \mu\text{g/mL}$). Concerning antimicrobial activities, the ethanol extract of *L.racemosa* shown good inhibitory ability against *A.dhakensis*, *A.hydrophila*, *E.ictaluri*, *S. agalactiae* with antimicrobial diameters 3.87 mm, 4.93 mm, 4.93 mm, 5.73 mm, respectively.

TÓM TẮT

Cóc trắng hay còn gọi Cọc vàng (*Lumnitzera racemosa*) là một loài thực vật ngập mặn với nhiều dược tính quý. Tuy nhiên, các nghiên cứu về loài cây này không nhiều, đặc biệt ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, thành phần hóa học cũng như hoạt tính kháng oxy hóa in vitro và hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh trên thủy sản của cao chiết Cóc trắng đã được khảo sát. Kết quả cho thấy cao ethanol Cóc trắng có hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng được xác định lần lượt là 138,532 mg GAE/g; 182,014 mg QE/g. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa cho thấy cao ethanol Cóc trắng cho hoạt tính mạnh nhất trên phương pháp thử nghiệm là ABTS^{•+} ($IC_{50}=20,461 \mu\text{g/mL}$), DPPH ($IC_{50}=81,734 \mu\text{g/mL}$) và TAC ($OD_{0.5}= 86,943 \mu\text{g/mL}$), sau đó là năng lực khử sắt ($OD_{0.5}=113,108 \mu\text{g/mL}$). Cao chiết Cóc trắng thể hiện hoạt tính kháng đối với 4 dòng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas dhakensis*, *Edwardsiella ictaluri*, *Streptococcus agalactiae* với đường kính kháng khuẩn tương ứng 3,87 mm, 4,93 mm, 4,93 mm, 5,73 mm.

1. GIỚI THIỆU

Rừng ngập mặn gồm nhiều loài thực vật sống trong vùng bãi triều ven biển của khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Cây có những khả năng đặc biệt để có thể sinh tồn trong môi trường nước lợ, nơi có độ mặn cao, lượng oxy thấp, nước ngọt khan hiếm và có các cơ chế ảnh hưởng đến nhiều quá trình trao đổi chất của tế bào (Parida & Jha, 2010). Thực vật thuộc chi *Lumnitzera* bao gồm hơn 600 loài ở Châu Á và Châu Phi. Trong số đó, loài *L. racemosa* Willd. có thể cao đến 10 m, đường kính 0,3 m, rễ có khả năng đâm sâu vào lớp mùn dày, lá có thể ăn được. Theo kinh nghiệm nhân gian, nhựa của cây được sử dụng để điều trị ngứa da, mụn rộp và ghê (Tomlinson, 2016). Các thành phần hóa học của *L. racemosa* là các acid béo, flavonoid, tannin và triterpenoid. Các nghiên cứu được lý của các chất chiết xuất từ *L. racemosa* có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, hạ huyết áp, chống oxy hóa, bảo vệ gan và gây độc tế bào ung thư (Ravikumar & Gnanadesigan, 2011; Thao et al., 2015). Nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp như racelactone A, Botulin, methyl gallate, myricitrin, kaempferol và isoguaiacin đã được công bố trong cây Cóc trắng (*Lumnitzera racemosa*). Đặc biệt, hợp chất mới được phân lập racelactone A có thể chống lại các bệnh liên quan đến hình thành mạch hoặc các rối loạn do viêm, đặc biệt là để điều trị ung thư (Yu et al., 2018). Các kết quả đạt được cho thấy cây Cóc trắng là nguồn cung cấp các hoạt chất sinh học đa dạng trong hệ sinh thái rừng ngập mặn. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn gây bệnh trên thủy sản của lá cây Cóc trắng sẽ được đánh giá nhằm hạn chế việc sử dụng thuốc và hóa chất trong nuôi trồng thủy sản và bổ sung những thông tin sinh hóa của loài cây này, góp phần vào việc bảo tồn và phát triển bền vững của hệ sinh thái rừng vùng ven biển.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện, vật liệu thí nghiệm

Lá của cây Cóc trắng được thu hái tại tỉnh Kiên Giang. Đây là loài cây mọc hoang dại. Mẫu nguyên liệu được định danh bởi ThS. Phùng Thị Hằng, Bộ môn Sư phạm Sinh học, Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ và tham chiếu trong quyển “Cây cỏ Việt Nam” của Phạm Hoàng Hộ (2003).

Các chủng vi sinh vật *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas dhakensis*, *Edwardsiella ictaluri*, *Streptococcus agalactiae* được cung cấp từ Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản Nam Bộ, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, thành phố Hồ Chí Minh. Vi khuẩn được phục hồi trên môi trường trypto-casein soy broth (TSB).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều chế cao chiết

Điều chế cao chiết: Lá cây Cóc trắng sau khi thu về được rửa sạch, cắt nhỏ và phơi khô. Mẫu sau khi phơi khô đến khối lượng không đổi được cho vào trong túi vải và ngâm trong ethanol 99° trong 3 lần, mỗi lần ngâm 24 giờ. Dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, lọc qua giấy lọc và cô quay tách dung môi thu được cao chiết ethanol. Cao chiết này được bảo quản ở 4°C và được sử dụng cho các nghiên cứu đánh giá hoạt tính sinh học.

2.2.2. Định tính, định lượng các hợp chất tự nhiên

Cao chiết ethanol từ lá Cóc trắng được khảo sát thành phần hóa học bằng các phản ứng định tính đặc trưng theo Jasuja et al. (2013) có hiệu chỉnh, được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp định tính thành phần hóa học

Tên nhóm chất	Thuốc thử	Nhận diện
Alkaloid	Wagner	kết tủa nâu cam đến đỏ
Polyphenol	FeCl ₃ 10%	tủa màu xanh đen hoặc đỏ cam
Flavonoid	FeCl ₃ 5%	kết tủa xanh đen
Steroid và Triterpenoid	Liebermann-Burchard Rosenthaler	dung dịch đổi màu xanh dương, lục, cam hoặc đỏ dung dịch sẽ chuyển sang màu xanh lục hoặc tím
Saponin	Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₄	xuất hiện kết tủa
Tannin	Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₄	xuất hiện kết tủa
Glycoside	Fehling	xuất hiện kết tủa đỏ gạch sau khi đun cách thủy

Định lượng polyphenol (TPC): Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo phương pháp sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu (McDonald & Mascagni, 2001). Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL cao chiết và 0,1 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu

(0,5N), lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút. Sau đó 2,5 mL Na₂CO₃ bão hòa được thêm vào, rồi ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 765 nm. Kết quả được thể hiện bằng

đương lượng acid gallic trên gam cao chiết (mg GAE/g cao chiết).

Định lượng flavonoid (TFC): Hàm lượng flavonoid được xác định bằng phương pháp so màu vì nhôm clorua tạo phức với nhóm keton ở vị trí C-4; nhóm hydroxyl ở C-3 hoặc C-5 của flavon và flavonol (Bag et al., 2015). Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL cao chiết, 2 mL nước và 0,15 mL NaNO₂ 5% được lắc đều ở trong 6 phút. Sau đó, hỗn hợp trên được bổ sung 0,5 mL AlCl₃ 10% và để ở nhiệt độ phòng trong 6 phút. Sau 6 phút, hỗn hợp được thêm 2 mL NaOH 4% và 0,7 mL nước, ủ thêm 15 phút. Độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 510 nm. Kết quả được thể hiện bằng đương lượng quercetin trên gam cao chiết (mg QE/g cao chiết).

2.2.3. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa in vitro

Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): Khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết ethanol từ lá Cóc trắng được xác định theo phương pháp của Sharma and Bhat (2009). Hỗn hợp phản ứng gồm 100 µL DPPH (6x10⁻⁴ M) và 100 µL cao chiết ethanol của lá Cóc trắng (ở nồng độ cao chiết từ 12,5-150 µg/mL). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 60 phút và đo độ hấp thụ quang phổ của DPPH ở bước sóng 517 nm. Acid gallic được sử dụng như chất đối chứng dương cho các phương pháp kháng oxy hóa tiếp theo.

Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do ABTS^{•+}: Hoạt động loại bỏ gốc tự do được xác định bằng phương pháp khử màu ABTS^{•+} mô tả bởi Nenadis et al. (2004). Khi cho chất kháng oxy hóa vào dung dịch chứa ABTS^{•+}, các chất kháng oxy hóa sẽ khử ion ABTS^{•+} thành ABTS làm cho dung dịch mất màu xanh. Hỗn hợp phản ứng gồm 10 µL cao chiết (hoặc chất chuẩn) và 990 µL gốc tự do ABTS^{•+} được ủ trong vòng 06 phút ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp sau khi ủ được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm.

Khảo sát năng lực khử sắt (RP: reducing power): Năng lực khử sắt của cao chiết được xác định theo phương pháp của của Padma et al. (2013). Acid gallic được sử dụng như chất đối chứng dương. Thử nghiệm được tiến hành như sau: 500 µL cao chiết (hoặc chất chuẩn) ở các nồng độ khảo sát khác nhau được cho vào 500 µL đệm phosphate (0,2 M, pH 6,6-7,2), tiếp theo cho 500 µL K₃Fe(CN)₆ 1% vào hỗn hợp, giữ hỗn hợp 20 phút ở 50°C. Sau đó, 500 µL CCl₃COOH 10% được bổ sung, ly tâm 3000 vòng/10 phút. Năm trăm µL lớp trên cho vào

eppendorf, bổ sung 500 µL nước cất và 100 µL FeCl₃ 0,1%. Độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 700 nm.

Phương pháp phosphomolybdenum: Tổng chất kháng oxy hóa được xác định theo phương pháp của Prieto et al. (1999). Acid gallic được sử dụng như chất đối chứng dương. Thử nghiệm được tiến hành như sau: 100 µL mẫu thử ở các nồng độ khảo sát được cho vào 900 µL dung dịch A gồm có H₂SO₄ 0,6 M, sodium phosphate 28 mM, ammonium molybdate 4 mM. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 95°C trong 90 phút, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 695 nm.

2.2.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo mô tả của Oonmetta-Aree et al. (2006). Dung dịch vi khuẩn thử nghiệm (0,1 mL) có mật độ 10⁶ CFU/mL được trải đều trên bề mặt đĩa petri đã chứa sẵn môi trường TSB, để khô. Sau đó, giếng nhỏ có đường kính 6 mm được tạo thành bằng dụng cụ đục lỗ đã được vô trùng, tiếp theo thêm vào 50 µL mẫu thử ở nồng độ 10 mg/mL được pha trong DMSO 10% vào các giếng. Đĩa thạch được ủ trong 24 giờ, sau đó quan sát và ghi nhận kết quả. Đối chứng dương là tetracycline và đối chứng âm là DMSO 10%. Hoạt tính ức chế khuẩn được đánh giá bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi sinh vật bằng công thức: BK (mm) = D-d; trong đó D = đường kính vòng vô khuẩn và d = đường kính lỗ khoan thạch (6mm). Thí nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị bán kính trung bình.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn của các giá trị trung bình thực hiện trên Excel 2013. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp thống kê ANOVA một yếu tố ($\alpha = 5\%$) trên phần mềm Minitab 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định tính, định lượng các hợp chất tự nhiên

Kết quả định tính một số nhóm chất có trong cao ethanol của Cóc trắng được trình bày trong Bảng 2. Theo đó, thành phần hóa học của Cóc trắng tương tự với các nghiên cứu về thành phần hóa học của Anjaneyulu et al. (2003) cho thấy sự hiện diện của các nhóm hợp chất alkaloid, polyphenol, flavonoid, steroid, tannin và saponin.

Bảng 2. Kết quả định tính thành phần hóa học của cao chiết

Tên nhóm chất	Thuốc thử	Nhận diện
Alkaloid	Wagner	+
Polyphenol	FeCl ₃ 10%	+
Flavonoid	FeCl ₃ 5%	+
Steroid và Triterpenoid	Liebermann-Burchard Rosenthaler	+
Saponin	Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₄	+
Tannin	Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₄	+
Glycoside	Fehling	+

Ghi chú: (+) Hiện diện; (-) Không hiện diện

Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng, các hợp chất phenol và flavonoid có mối liên quan tuyến tính đến hoạt động kháng oxy hóa và thường xuất hiện trong nhiều loài thực vật (Chang et al., 2007). Kết quả định tính cho thấy cao ethanol được chiết từ lá cây Cóc trắng chứa nhiều hợp chất sinh học đầy tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm.

Hàm lượng polyphenol (TPC) với chất chuẩn là gallic acid trong dãy nồng độ từ 2 đến 20 µg/mL có

phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0759x + 0,0346$ ($R^2 = 0,9956$). Hàm lượng flavonoid toàn phần (TFC) từ chất chuẩn quercetin trong dãy nồng độ từ 20 đến 100 µg/mL với phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0067x - 0,0025$ ($R^2 = 0,997$). Trên cơ sở các đường chuẩn này, kết quả hàm lượng polyphenol và flavonoid được xác định và trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng phenol và flavonoid của cao chiết ethanol Cóc trắng

Phương pháp định lượng	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)
Cao chiết Cóc trắng	138,532 ± 1,474	182,014 ± 2,345

Theo kết quả được trình bày trong Bảng 3, hàm lượng polyphenol và flavonoid của cao chiết ethanol cây Cóc trắng lần lượt là 138,532 ± 1,474 mgGAE/g, 182,014 ± 2,345 mgQE/g, cao hơn trong nghiên cứu của Manjulatha et al. (2016) với hàm lượng TPC, TFC lần lượt 58,55 mg GAE/g, 20,23 mg QE/g. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn nghiên cứu của Paul and Ramasubbu (2017) với hàm lượng TPC, TFC là 476,37 mg GAE/g, 22,96 mg QE/g. Hơn nữa, polyphenol và flavonoid là những hợp chất chuyển hóa thứ cấp bậc hai quan trọng hiện diện nhiều trong các loài thực vật và được chứng minh sở hữu nhiều hoạt tính sinh học như kháng oxy hóa,

chống lão hóa, kháng khuẩn, kháng ung thư (Pourreza et al., 2013), điều này một lần nữa cho thấy tiềm năng hoạt tính sinh học của loài Cóc trắng.

3.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro*

3.2.1. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH

Để xác định khả năng trung hòa gốc tự do DPPH, cao ethanol Cóc trắng được pha loãng thành dãy nồng độ từ 12,5 - 150 µg/mL. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (%) và hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương acid gallic được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương acid gallic (µg/ml) của cao chiết

Nồng độ cao chiết (µg/mL)	Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (%)	Hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương (µg/ml)
12,5	5,907 ± 0,444 ^h	0,267 ± 0,045
25	18,646 ± 1,403 ^f	1,850 ± 0,172
37,5	24,848 ± 2,026 ^e	2,012 ± 0,195
50	35,098 ± 4,685 ^d	2,955 ± 0,459
75	48,261 ± 3,399 ^c	4,170 ± 0,299
100	65,416 ± 1,035 ^b	5,750 ± 0,095
150	84,132 ± 0,627 ^a	7,474 ± 0,061

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

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương acid gallic ($\mu\text{g/ml}$) của các cao chiết tăng từ $0,267 \pm 0,045$ lên $7,474 \pm 0,061 \mu\text{g/ml}$ với hiệu quả làm sạch gốc tự do DPPH tăng từ $5,907 \pm 0,444$ $84,132 \pm 0,627\%$. Hiệu quả kháng oxy hóa của cao chiết ethanol dựa trên hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH được tính tương đương $\mu\text{g/mL}$ acid gallic dựa vào đường chuẩn $y = 12,21x + 0,053$ ($R^2 = 0,9918$). Kết quả cao chiết ethanol Cóc trắng có giá trị $IC_{50} = 81,734 \pm 1,009 \mu\text{g/mL}$ thấp hơn 20,16 lần khi so với chất chuẩn là acid Gallic ($IC_{50} = 4,059 \pm 0,026 \mu\text{g/mL}$) và thấp hơn so với nghiên cứu của Paul and Ramasubbu (2017) có $IC_{50} = 38,89 \mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS^{•+}

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết Cóc trắng được khảo sát dựa trên hàm lượng chất kháng oxy

Bảng 5. Phương trình hồi quy tuyến tính hiệu suất trung hòa gốc tự do và IC_{50}

Mẫu	Phương trình hồi quy tuyến tính	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Acid gallic	$y = 90,13x + 5,005$ ($R^2 = 0,985$)	$0,500 \pm 0,001^b$
Cao chiết Cóc trắng	$y = 2,361x + 1,6999$ ($R^2 = 0,987$)	$20,461 \pm 0,5211^a$

Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị IC_{50} của Cóc trắng là $20,461 \pm 0,5211 \mu\text{g/mL}$ có khả năng trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} thấp hơn so với của acid gallic ($IC_{50} = 1,88 \pm 0,0062$) khác biệt ý nghĩa thống kê mức 5%, nhưng cao hơn so với nghiên cứu của Paul and Ramasubbu (2017) với giá trị IC_{50} là $44,38 \mu\text{g/mL}$.

hóa có trong cao chiết của cây, được tính tương đương $\mu\text{g/mL}$ acid gallic. Để xác định khả năng trung hòa gốc tự do ABTS^{•+}, cao chiết ethanol lá Cóc trắng được pha loãng thành dãy nồng độ từ 15-40 $\mu\text{g/mL}$. Hiệu quả trung hòa gốc tự do của cao chiết tăng từ $34,247 \pm 0,252 \%$ ở nồng độ 15 $\mu\text{g/mL}$ đến $91,723 \pm 0,022 \%$ ở nồng độ 40 $\mu\text{g/mL}$. Tương tự, hàm lượng chất kháng oxy hóa trong cao chiết cũng tăng từ $0,166 \pm 0,002$ lên $0,944 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$. Khả năng kháng oxy hóa cũng như hiệu quả trung hòa gốc tự do của cao chiết từ lá cây Cóc trắng được so sánh dựa vào giá trị IC_{50} . Giá trị IC_{50} của cao chiết được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính trình bày trong Bảng 5.

3.2.3. Hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử sắt (RP)

Hiệu quả khử sắt của cao chiết từ lá cây Cóc trắng dựa trên hàm lượng chất kháng oxy hóa có trong cao chiết, được tính tương đương $\mu\text{g/mL}$ acid gallic. Các kết quả nghiên cứu về hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử sắt của các cao chiết được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử sắt của cao chiết Cóc trắng

Nồng độ cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)	Hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử sắt (%)	Hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương ($\mu\text{g/ml}$)
30	$47,008 \pm 0,654^e$	$4,739 \pm 0,183$
50	$64,549 \pm 2,003^d$	$6,859 \pm 0,043$
70	$72,801 \pm 1,935^c$	$8,837 \pm 0,246$
80	$75,975 \pm 1,145^b$	$9,898 \pm 0,048$
90	$78,412 \pm 1,533^b$	$10,977 \pm 0,250$
100	$81,798 \pm 1,278^a$	$12,933 \pm 0,289$
110	$82,657 \pm 1,133^a$	$13,546 \pm 0,236$

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

Theo sự tăng dần nồng độ từ 30 đến 100 $\mu\text{g/mL}$ thì độ hấp thu quang phổ của các cao chiết cũng tăng dần. Điều đó chứng tỏ nồng độ của cao chiết tỉ lệ thuận với độ hấp thu quang phổ, nồng độ của cao chiết càng cao thì độ hấp thu quang phổ càng lớn và ngược lại. Cụ thể là ở cao chiết Cóc trắng, hàm lượng chất kháng oxy hóa tăng từ $4,739 \pm 0,183$ lên $13,546 \pm 0,236 \mu\text{g/ml}$ với hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử sắt tăng từ $47,008 \pm 0,654\%$ lên

$82,657 \pm 1,133\%$ ở nồng độ cao chiết từ 30-110 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả cho thấy năng lực khử của các cao chiết Cóc trắng với giá trị $OD_{0,5} = 113,108 \pm 0,094$ thấp hơn 10,81 lần so với chất chuẩn acid gallic ($OD_{0,5} = 10,460 \pm 0,113$) và thấp hơn nghiên cứu của Ravikumar and Gnanadesigan (2011) có giá trị $OD_{0,5} = 61,94$.

3.2.4. Hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử Phosphomolybdenum (TAC)

Hoạt tính kháng oxy hóa tổng của cao chiết được xác định dựa trên việc khử Mo (VI) thành Mo (V) bằng các hợp chất kháng oxy hóa và hình thành phức hợp phosphate/Mo (V) màu xanh trong phương

pháp phosphomolybdenum. Để xác định hoạt tính kháng oxy hóa tổng, cao chiết ethanol Cóc trắng được pha loãng thành dãy nồng độ từ 14-82 µg/mL. Hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử Phosphomolybdenum của cao chiết được so sánh dựa vào giá trị OD_{0,5} được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Năng lực Phosphomolybdenum của acid Gallic và cao chiết Cóc trắng

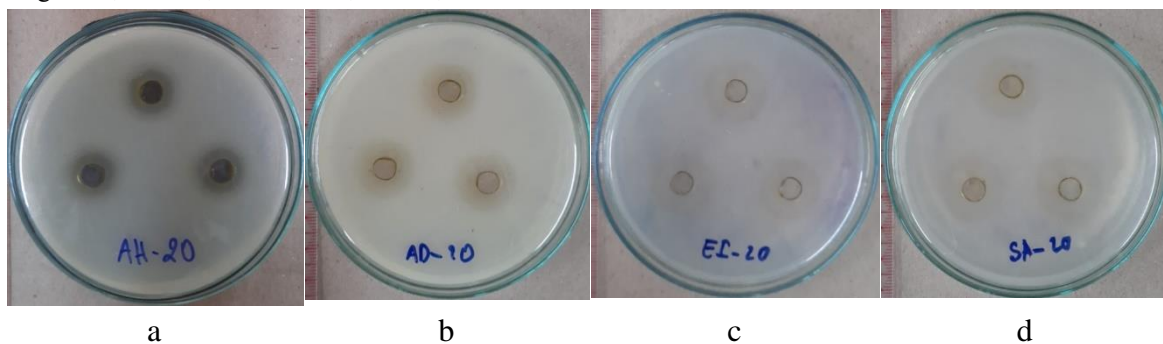
	Phương trình hồi quy tuyến tính	Giá trị OD _{0,5}
Acid gallic	y = 0,015x + 0,1206 (R ² = 0,9863)	24,910±0,463 ^b
Cao Cóc trắng	y = 0,006x - 0,021 (R ² = 0,964)	86,943 ± 0,587 ^a

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

Từ kết quả cho thấy khả năng khử phức Mo của cao chiết Cóc trắng có giá trị OD_{0,5} thấp hơn 3,5 lần khi so sánh với chất chuẩn acid gallic. Khi nồng độ cao chiết Cóc trắng tăng từ 14-82 µg/ml thì hàm lượng chất kháng oxy hóa cũng tăng từ 3,292 ± 0,086 lên 12,726 ± 0,217 µg/ml với hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử Phosphomolybdenum tăng từ 23,151 ± 3,388% lên 82,267 ± 0,467%.

3.3. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết Cóc trắng được xác định dựa trên khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn được tạo ra trên đĩa petri được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết Cóc trắng với các dòng vi khuẩn

a: *A. dhakensis*; b: *A. hydrophila*; c: *E. ictaluri*; d: *S. agalactiae*

Kết quả cho thấy cao chiết Cóc trắng có hoạt tính kháng đối với 4 dòng vi khuẩn *A. hydrophila*, *A. dhakensis*, *E. ictaluri*, *S. agalactiae* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 3,87 ± 0,15 mm; 4,93 ± 0,15 mm; 4,93 ± 0,40 mm; 5,73 ± 0,25 mm.

Sự xuất hiện vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch có thể do các chất có hoạt tính kháng khuẩn trong cao chiết khuếch tán từ giếng thạch sang mặt thạch xung quanh và ức chế sự phát triển của vi khuẩn.

Bảng 8. Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của cao chiết Cóc trắng ở các nồng độ (mg/ml) khác nhau

Nồng độ cao chiết (mg/ml)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. dhakensis</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>S. agalactiae</i>
10	3,87 ± 0,15	4,93 ± 0,40	4,93 ± 0,40	5,73 ± 0,25
0,5	2,56 ± 0,23	3,21 ± 0,11	3,52 ± 0,34	4,15 ± 0,18
0,25	1,98 ± 0,03	2,20 ± 0,16	2,91 ± 0,52	3,05 ± 0,32
0,125	0,91 ± 0,27	1,35 ± 0,02	1,02 ± 0,46	1,21 ± 0,53
0,0625	0	0	0	0
Tetracyclin	11,067±0,208	8,900±0,101	10,567±0,404	11,567±0,321

Kết quả Bảng 8 cho thấy cao chiết Cóc trắng có khả năng ức chế sự phát triển của cả 4 dòng vi khuẩn thử nghiệm ở nồng độ từ 0,125 – 10 mg/ml. Mức độ kháng phụ thuộc nồng độ của cao chiết sử dụng. Hiệu quả kháng cao nhất trên *S. agalactiae* và thấp nhất *A. hydrophila* nồng độ 10 mg/ml, hiệu quả kháng của cao chiết thấp hơn của tetracyclin mức 10 mg/ml, tương đương. Cao chiết không có khả năng ức chế vi khuẩn khi ở nồng độ 0,0625 mg/ml đối với 4 chủng vi khuẩn gây bệnh trên thủy sản.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol Cóc trắng thể hiện khả năng kháng oxy hóa cao khi được khảo sát bằng phương pháp DPPH, ABTS, RP và TAC có giá trị IC₅₀ hay OD_{0,5} lần lượt 81,734 ± 1,009 µg/mL, 20,461 ± 0,5211 µg/mL, 113,108 ± 0,094, 86,943 ± 0,587, thấp hơn 200 µg/ml. Kết quả này cũng phù hợp với việc định lượng được hai thành phần chính quan trọng có tác dụng kháng oxy hóa mạnh thường xuất hiện trong nhiều loài thực vật là hợp chất polyphenol, flavonoid với kết quả hàm lượng khá cao là 138,532 ± 1,474 mg GAE/g, 182,014 ± 2,345 mg QE/g. Ngoài ra, cao chiết Cóc trắng có khả năng ức chế 4 dòng vi khuẩn gây bệnh thường gặp trên động vật thủy sản. Kết quả nghiên cứu này cho thấy Cóc trắng là nguồn dược liệu tiềm năng ứng dụng trong phòng và điều trị bệnh trên động vật thủy sản và con người.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Ths. Nguyễn Thị Hiền, Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản Nam Bộ, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, TP.HCM đã cung cấp các chủng vi khuẩn cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anjaneyulu, A. S., Murthy, Y. L., Rao, V. L., & Sreedhar, K. (2003). A new aromatic ester from the mangrove plant *Lumnitzera racemosa* Willd. *Arkivoc*, 3, 25-30.

Bag, G., Devi, P. G., & Bhaigyabati, T. (2015). Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), 154-159.

Chang, H. C., Huang, G. J., Agrawal, D. C., Kuo, C. L., Wu, C. R., & Tsay, H. S. (2007). Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as "Gusuibu". *Botanical studies*, 48(4), 397-406.

Gnanadesigan, M., Anand, M., Ravikumar, S., Maruthupandy, M., Vijayakumar, V., Selvam, S., & Kumaraguru, A. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles by using mangrove plant extract and their potential mosquito larvicidal property. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(10), 799-803.

Jasuja, N. D., Sharma, S. K., Saxena, R., Choudhary, J., Sharma, R., & Joshi, S. C. (2013). Antibacterial, antioxidant and phytochemical investigation of *Thuja orientalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(25), 1886-1893.

Manjulatha, K., Gul, M. Z., Imam, N., Ghazi, I. A., & Setty, O. H. (2016). Phytochemical content and antioxidant potential of *Clerodendrum inerme* and its different parts-A comparative study. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 6(1), 65-77.

McDonald, A. J., & Mascagni, F. (2001). Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience*, 105(3), 681-693.

Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS*⁺ assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4669-4674.

Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1214-1220.

Padma, R., Parvathy, N., Renjith, V., Kalpana, P. R., & Rahate, P. (2013). Quantitative estimation of tannins, phenols, and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrica*. *Int J Res Pharm Sci*, 4(1), 73-77.

Parida, A. K., & Jha, B. (2010). Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. *Trees*, 24(2), 199-217.

Paul, T., & Ramasubbu, S. (2017). The antioxidant, anticancer and anticoagulant activities of *Acanthus ilicifolius* L. roots and *Lumnitzera racemosa* Willd. leaves, from southeast coast of India. *J. Appl. Pharm. Sci*, 7(3), 81-87.

Pourreza, N. (2013). Phenolic compounds as potential antioxidant. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*, 8(4), 149.

Phạm Hoàng Hộ. (2003). Cây Cỏ Việt Nam. NXB TP. Hồ Chí Minh. 137-144.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.

- Ravikumar, S., & Gnanadesigan, M. (2011). Hepatoprotective and antioxidant activity of a mangrove plant *Lumnitzera racemosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(5), 348-352.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Thao, N. P., Luyen, B. T. T., Diep, C. N., Tai, B. H., Kim, E. J., Kang, H. K., & Cuong, N. X. (2015). In vitro evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of constituents of the mangrove *Lumnitzera racemosa* Willd. *Archives of pharmacal research*, 38(4), 446-455.
- Tomlinson, P. B. (2016). *The botany of mangroves*: Cambridge University Press.
- Yu, S. Y., Wang, S. W., Hwang, T. L., Wei, B. L., Su, C. J., Chang, F. R., & Cheng, Y. B. (2018). Components from the leaves and twigs of mangrove *Lumnitzera racemosa* with anti-angiogenic and anti-inflammatory effects. *Marine drugs*, 16(11), 404.