

ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ CAO CHIẾT LÁ ĐUÔNG ĐUÔNG (*Sphaerocoryne affinis*) THU HÁI TẠI PHÚ QUỐC

Đến tòa soạn 16-10-2024

Huỳnh Kim Yến^{1*}, Nguyễn Trọng Tuấn², Trần Hoàng Lâm², Dương Thị Minh Thơ³,
Trương Thị Tú Trân¹, Nguyễn Thị Thu Hậu¹, Lê Bích Tuyền¹, Vũ Thị Yến¹,
Nguyễn Tiến Sĩ⁴

¹Trường Đại học Kiên Giang, ²Trường Đại học Cần Thơ,

³Trường THPT Trần Văn Bảy, ⁴Trường Đại học Bạc Liêu

*Email: hkyen@vnkgu.edu.vn

SUMMARY

EVALUATION OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES FROM (*Sphaerocoryne affinis*) LEAF EXTRACT FROM PHU QUOC

Sphaerocoryne affinis is a medicinal herb known to the people for its many uses. The studies results showed that the extract had the ability to resist bacterial strains causing disease in aquatic animals with minimum inhibitory concentration from 80 - 320 $\mu\text{g/mL}$. At the same time, the effectiveness against 2 fungal strains *Fusarium oxysporum* MT453296.1, *Lasiodiplodia theobromae* JX868613.1 causing diseases on plants was tested with antifungal efficiency of 85.40%; 92.32%. The extract concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ or more has the ability to prevent angiogenesis in the chorion of poultry embryos, which had the potential to support the treatment of cancer. The qualitative chemical composition of the plant containing alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, steroids and triterpenoids contributed to further confirming the results of the above biological activity evaluation of *Sphaerocoryne affinis* leaf extract.

Keywords: *Aeromonas*, extract, fungal, plants, *Sphaerocoryne affinis*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Đuông đuông (*S. affinis*) hay được gọi là Chùm đuông thuộc họ Annonaceae. Cây có chiều cao 8-12 m. Lá đơn mọc xen kẽ kích thước 2-4 cm x 4-8 cm. Trái nhỏ như trái mồng tơi, mọc thành từng chùm, hột to [1]. Ở Việt Nam, cây phân bố chủ yếu ở các rừng nhiệt đới như Tây Ninh, Phú Quốc. Ở Đông Nam Á, Đuông đuông được sử dụng để chữa nhiều bệnh khác nhau [2]. Trong y học cổ truyền Thái Lan, hoa của chúng được sử dụng như một loại thuốc giảm đau tim nhẹ và hạ sốt [3]. Ở Việt Nam, trái Đuông đuông đã được sử dụng để sản xuất nước

trái cây và đồ uống có cồn không chưng cất tại quy mô nhỏ [4]. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy trái và hoa Đuông đuông có hoạt tính chống oxy hóa, chống ung thư và kháng nấm [5]. Lá Đuông đuông được một số nghiên cứu đánh giá có chứa nhóm hợp chất chủ yếu như butenolide, flavonoid và glycoside [6].

Nhưng các nghiên cứu về hoạt tính sinh học chủ yếu sử dụng trái và hoa Đuông đuông. Do đó, lá Đuông đuông được chọn để đánh giá một số hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản, kháng nấm và khả năng chống tạo mạch trên màng đệm phổi gia cầm.

2. THỰC NGHIỆM

2.1 Nguyên liệu

Mẫu lá Đuồng đuông thu hái tại rừng Quốc gia Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang và được định danh bởi PGS.TS Đặng Minh Quân, Trường Đại học Cần Thơ. Các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas dhakensis*, *Edwardsiella ictaluri* được nuôi cấy trên môi trường trypto-casein soy agar (TSA) có nguồn gốc từ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, thành phố Hồ Chí Minh. Các chủng nấm *Fusarium oxysporum* MT453296.1, *Lasiodiplodia theobromae* JX868613.1 được phân lập từ Ốt bị nhiễm bệnh [7].

2.2 Hóa chất và thiết bị

Dung môi được sử dụng trong thí nghiệm gồm ethanol (70% và 96%), methanol (Việt Nam) và nước cất. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Trung Quốc), resazurin (Sigma, Mỹ), retinoic acid

(Nhật), FeCl_3 (Trung Quốc), H_2SO_4 (Trung Quốc), trichloroacetic acid (Đức).

2.3 Điều chế cao chiết ethanol

Lá Đuồng đuông được sấy khô theo tiêu chuẩn dược liệu và trữ trong túi PE. Bột lá Đuồng đuông (500 g) được chiết xuất trong ethanol 96%. Sau khi ngâm từ 24 đến 48 giờ, dung dịch được lọc qua giấy lọc (f20 mm). Dịch chiết được cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất thấp thu được cao chiết (5 lần $\times$ 24 giờ mỗi lần). Cao chiết được cô chân không sao cho độ ẩm nhỏ hơn 12% và bảo quản ở -4°C .

2.4 Định tính thành phần hóa học của cao chiết

Các hợp chất hóa học như alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, tannin, saponin được nhận biết bằng các loại thuốc thử. Các hợp chất hóa học của cao chiết được đánh giá bằng các phản ứng đặc trưng theo Yadav *et al.* (2011) thể hiện ở Bảng 1 [8].

Bảng 1. Định tính các nhóm hợp chất trong cao chiết

Tên nhóm hợp chất	Tên thuốc thử	Hiện tượng nhận diện
Alkaloid	Dragendorff (2-3 giọt)	Dung dịch có màu cam đến đỏ hoặc kết tủa nâu.
	Wagner	Dung dịch có hiện tượng tủa màu nâu.
	Shinoda	Dung dịch có màu vàng đến cam đỏ.
Flavonoid	H_2SO_4	Dung dịch có màu vàng đến cam có phát huỳnh quang (flavon và flavonol); màu đỏ hoặc xanh dương-đỏ (chalcon, aurone); màu cam đến đỏ (flavanon).
Steroid và Triterpenoid	Salkowski	Nếu hiện diện steroid thì dung dịch có màu đỏ, xanh tím.
	Rosenheim	Dung dịch sẽ chuyển sang màu xanh dương.
Tannin	Stiasny	Xuất hiện trầm hiện màu đỏ.
	$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_4$	Xuất hiện kết tủa.
Saponin	NaOH/HCl 0,1 N	Tạo bọt bền trong môi trường kiềm hoặc acid.
	Chì acetate	Dung dịch có hiện tượng kết tủa.

2.5 Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

- Phương pháp đục lỗ trên môi trường TSA: Cao chiết được pha loãng trong DMSO 10% với các nồng độ từ 40 - 640 $\mu\text{g/mL}$. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá Đuồng đuông được đánh giá

thông qua đường kính vòng vô khuẩn. Thể tích dịch vi khuẩn (100 μL) có mật số 10^6 CFU được trải trên môi trường TSA. Tiếp theo, trên bề mặt môi trường đục lỗ giếng nhỏ (đường kính 6 mm). Sau đó, dung dịch cao chiết (50 μL) pha loãng ở các nồng độ khác nhau được bơm vào các

giếng. Sau 24 giờ ủ mẫu ở nhiệt độ phòng, đường kính vô khuẩn được đo bằng đơn vị mm [9].

- Phương pháp pha loãng mẫu thử và sử dụng thuốc thử resazurin để đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu theo nghiên cứu của Sarkar *et al.* (2007) [10]. Thuốc thử resazurin được pha bằng cách hòa tan 270 mg resazurin trong 40 mL nước cất. Mẫu thử được pha loãng trong dung dịch DMSO 10% thành các nồng độ khảo sát khác nhau. Dịch vi khuẩn được nuôi cấy lỏng đạt mật số $1,2 \times 10^6$ CFU/mL. Mỗi giếng gồm 50 μ L môi trường Tryptocasein Soy Broth (TSB), 50 μ L dịch vi khuẩn và 50 μ L cao chiết lá Đuồng đuông được ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ.

Mẫu đối chứng chỉ chứa môi trường, dịch vi khuẩn và DMSO. Sau khi ủ, sự phát triển của vi khuẩn được đánh giá bằng cách thêm 50 μ L resazurin vào giếng. Các giếng có dung dịch đổi màu từ xanh hoặc tím (phụ thuộc vào màu của cao chiết pha trong DMSO 10%) sang hồng, chứng tỏ có sự phát triển của vi khuẩn. Nồng độ ức chế tối thiểu được xác định ở giếng không làm mất màu thuốc thử resazurin.

2.6 Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm

Đánh giá khả năng kháng nấm *F. oxysporum*, *L. theobromae* của cao chiết lá Đuồng đuông được thực hiện theo nghiên cứu của Gakuubi *et al.* (2017) [11]. Cao chiết được pha loãng thành dãy nồng độ: 0,6; 1,2; 2,5; 5; 10 mg/mL và thêm vào môi trường Potato D-glucose Agar (PDA) sau khi khử trùng. Trên bề mặt môi trường, lỗ nhỏ có kính thước 7 mm được tạo ngay giữa đĩa. Trên đĩa nấm đang phát triển, mẫu thạch có đường kính tương ứng trên đĩa môi trường được cấy vào tương ứng và ủ ở nhiệt độ 30°C. Tốc độ sinh trưởng của tơ nấm trên bề mặt môi trường (đường kính mm) ở nghiệm thức có cao chiết được so sánh với mẫu đối chứng

(đến khi tơ nấm nghiệm thức đối chứng phát triển kín đĩa thạch). Hiệu suất ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh được xác định dựa vào công thức sau:

Hiệu suất ức chế sự phát triển của nấm (%) = $(T_0 - T_1) / T_0 \times 100$.

Trong đó: T_0 là đường kính trung bình của tơ nấm phát triển ở mẫu đối chứng trên môi trường không có cao chiết (mm). T_1 là đường kính trung bình của tơ nấm phát triển ở nghiệm thức có cao chiết (mm).

2.7 Phương pháp đánh giá khả năng chống tạo mạch trên màng đệm phôi gia cầm

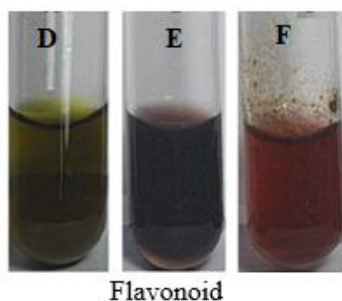
Trứng gia cầm đã thụ tinh ấp 5-7 ngày ở 37°C được mua tại lò ấp trứng, sau đó tiến hành kiểm tra khả năng sống. Vị trí phôi được kiểm tra bằng đèn soi trứng. Các phôi đã chết và không đạt được loại bỏ. Làm sạch trứng bằng ethanol 70% để tránh bị nhiễm khuẩn sau khi mở vỏ và loại bỏ các vết bẩn ngoài vỏ. Tiến hành hút khoảng 2-4 mL lòng trắng trứng và đặt trứng theo chiều ngang để lớp màng đệm không dính vào lớp vỏ. Mở vỏ trứng và đặt giấy lọc đường kính 3 mm đã được khử trùng bằng ethanol 70% lên mạch máu ở vị trí thích hợp. Tiêm 2 μ L cao ở nồng độ khảo sát lên mảnh giấy lọc và quan sát chụp hình, bọc kín trứng lại, giữ trong tủ ấp 37°C và ghi nhận kết quả sau 6 h [12]. Đối chứng âm được thực hiện với DMSO (1-5%). Đối chứng dương được thực hiện với retinoic acid.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả định tính nhóm hợp chất của cao chiết Đuồng đuông

Thành phần hóa học của cao chiết ethanol từ lá Đuồng đuông được đánh giá bằng các phản ứng hóa học đặc trưng. Cao chiết được pha loãng trong chloroform, methanol, ethanol có nồng độ 1 mg/mL. Kết quả định tính sơ bộ nhóm hợp chất trong cao chiết lá Đuồng đuông cho thấy

sự hiện diện của alkaloid, flavonoid, tannin, steroid và triterpenoid, saponin. Tuy nhiên, một số thuốc thử cho kết quả âm tính có thể do hàm lượng hợp chất trong cây quá ít, thuốc thử kém nhạy nên rất khó phát hiện hoặc có thể không có chứa hợp chất này (Hình 1).



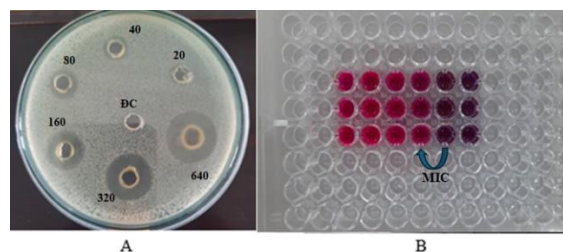
Hình 1. Định tính flavonoid (D: đối chứng; E: thuốc thử H_2SO_4 ; F: thuốc thử Shinoda)

Kết quả này tương tự với các nghiên cứu về phân lập nhóm hợp chất trước đó về loài cây này. Theo nghiên cứu của Hongnak *et al.* (2015) đã phân lập được 15 hợp chất từ hai cao phân đoạn dichloromethane và methanol từ rễ loài cây này gồm phân lập bốn triterpenoid, bốn heptene, sáu flavonoid và một terpenoid glycoside [1]. Năm 2016, Nguyen và Le đã nghiên cứu trái cây Đuông đuông rất giàu chất kháng oxy hóa bao gồm ascorbic acid và các hợp chất phenol [5]. Bên cạnh đó, Do và cộng sự (2022) cũng đã xác định được công thức hóa học của ba dẫn xuất flavonoid mới: meodorones A, B, C, cùng với bốn hợp chất đã biết tectochrysin, chrysin, onysilin và pinocembrin từ vỏ thân khô của cây Chùm đuông [13]. Nhiều nghiên cứu chứng minh, các hợp chất thứ cấp ở thực vật có khả năng kháng khuẩn và kháng nấm. Đồng thời, chúng được xem như là tác nhân hạn chế khả năng kháng thuốc của vi khuẩn [14].

3.2 Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết Đuông đuông

Đối chứng dương được sử dụng là Tetracyclin cho 4 chủng vi khuẩn gây bệnh

trên động vật thủy sản ở nồng độ từ 40 đến 160 $\mu\text{g/mL}$. Dimethyl sulfoxide 10% được sử dụng làm đối chứng âm. Kết quả chứng minh DMSO không ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn và không có hoạt tính trong thử nghiệm. Cao chiết Đuông đuông có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *A. hydrophila*, *A. dhakensis*, *E. ictaluri* và *S. agalactiae* dựa trên đường kính vòng kháng khuẩn trên môi trường thạch (Hình 2A). Khi nồng độ cao chiết tăng từ 40 $\mu\text{g/mL}$ đến 640 $\mu\text{g/mL}$ thì đường kính kháng khuẩn cũng tăng theo tỉ lệ thuận từ 1,2 mm đến 10,3 mm. Ngược lại, nồng độ cao chiết 20 $\mu\text{g/mL}$ không có hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản.



Hình 2. Vòng kháng khuẩn *A. hydrophila* trên môi trường thạch (A) và giá trị MIC (B) của cao chiết lá Đuông đuông

Hoạt tính kháng khuẩn ở các nồng độ cao chiết khác nhau được đánh giá dựa vào màu sắc của thuốc thử resazurin (Hình 2B). Khả năng kháng khuẩn của cao chiết từ lá Đuông đuông được đánh giá dựa trên khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh thể hiện qua giá trị MIC. Kết quả chứng minh cao chiết lá Đuông đuông có khả năng kháng tốt (nhạy) đối với hai chủng vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* và *E. ictaluri* gây bệnh trên động vật thủy sản với giá trị MIC lần lượt là 80 $\mu\text{g/mL}$; 160 $\mu\text{g/mL}$. Tuy nhiên, đối với chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *A. dhakensis* thì khả năng kháng thấp hơn với giá trị MIC lần lượt là 320 $\mu\text{g/mL}$; 640 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả kháng khuẩn của cao chiết thấp hơn đối chứng dương Tetracyclin với giá trị MIC lần lượt là 80

µg/mL (*E. ictaluri*); 160 µg/mL (*A. hydrophila*); 320 µg/mL (*A. dhakensis*). Nhiều nghiên cứu cho thấy, chiết xuất thực vật có khả năng tác động vào màng tế bào của vi khuẩn gây bệnh giống như tác động của kháng sinh. Đồng thời, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh có liên quan đến hàm lượng hoạt chất sinh học trong thực vật [15]. Điều này chứng minh, lá Đuông đuông có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học trong giúp chúng có khả năng kháng lại vi sinh vật gây bệnh. Hiện nay, ở nước ta chưa có nhiều công trình nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của cao chiết lá Đuông đuông, do đó kết quả này là cơ sở khoa học cho tiềm năng phát triển thuốc điều trị bệnh trên động vật thủy sản.

3.3 Đánh giá hoạt tính kháng nấm gây bệnh

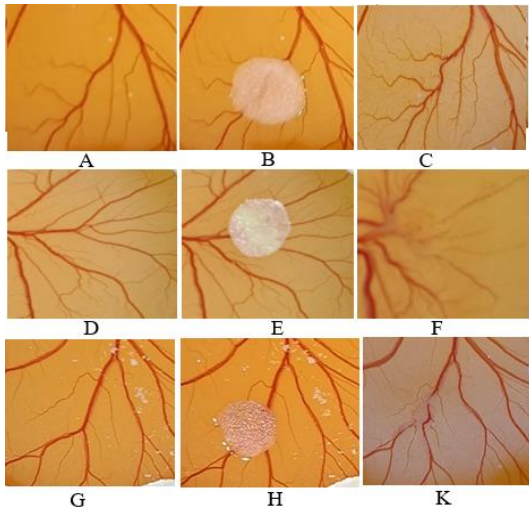
Kết quả cho thấy lá Đuông đuông có hoạt tính kháng nấm ở cả 2 loài nấm *Fusarium oxysporum* và *Lasiodiplodia theobromae*. Hiệu suất ức chế sự phát triển của chủng nấm bệnh *F. oxysporum* và *L. theobromae* được phân lập trên cây trồng được thể hiện ở Bảng 2. Cao chiết từ lá Đuông đuông cho thấy khả năng ức chế sự tăng trưởng sợi nấm trong khoảng nồng độ khảo sát từ 0,6 đến 10 mg/mL sau thời gian ủ 4 ngày. Kết quả chứng minh cao chiết lá Đuông đuông có khả năng kháng nấm tương đối cao sau 4 ngày ủ bệnh và tăng tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết.

Khi tăng nồng độ cao chiết từ 0,6 mg/mL lên 10 mg/mL thì hiệu suất kháng nấm cũng tăng từ $23,91 \pm 1,39\%$ đến $85,40 \pm 3,35\%$ đối với nấm *F. oxysporum*. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết tối ưu lá Đuông đuông đối với nấm *F. oxysporum* là 10 mg/mL. Hiệu suất ức chế sự phát triển của chủng nấm bệnh *L. theobromae* được phân lập trên cây trồng được thể hiện trong Bảng 2. Cao chiết lá Đuông đuông có khả năng ức chế sự tăng trưởng sợi tơ nấm ở nồng độ khảo sát từ 0,6 đến 10 mg/mL sau thời gian ủ 7 ngày. Cao chiết lá Đuông đuông thể hiện khả năng kháng nấm *L. theobromae* sau 7 ngày thí nghiệm. Khi nồng độ cao chiết tăng từ 0,6 mg/mL lên 10 mg/mL thì hiệu suất kháng nấm cũng tăng từ $32,47 \pm 0,41\%$ đến $92,32 \pm 2,14\%$ đối với nấm *L. theobromae*. Nồng độ ức chế tối thiểu đối với nấm *L. theobromae* là 5 mg/mL. Kết quả nghiên cứu này thấp hơn nghiên cứu của Mongkol và cộng sự (2016) đã chứng minh hợp chất benzoic acid từ hoa Đuông đuông có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *P. parasitica* đạt 93% ở nồng độ 1000 µg/mL [16]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới chứng minh khả năng kháng nấm của cao chiết có mối quan hệ mật thiết với hàm lượng polyphenol và flavonoid. Các hợp chất này có khả năng kháng oxi hóa làm giảm quá trình stress oxi hóa ở thực vật, giúp cho cây trồng tăng sức đề kháng với các mầm bệnh [17].

Bảng 2. Khả năng kháng nấm *F. oxysporum* của cao lá Đuông đuông

STT	Chủng nấm	Hiệu suất kháng nấm ở các nồng độ cao chiết (mg/mL)				
		0,6	1,2	2,5	5	10
1	<i>F. oxysporum</i>	23,91±1,39	45,35±2,97	61,69±0,69	85,40±3,35	100
2	<i>Ausetop-Fusarium</i>	58,20±5,78	83,84±3,52	92,72±1,16	100	100
3	<i>L. theobromae</i>	32,47±0,41	75,23±4,46	92,32±2,14	100	100
4	<i>Ausetop-Lasiodiplodia</i>	63,66±1,98	85,24±3,59	100	100	100

3.4 Kết quả hoạt tính khả năng chống tạo mạch trên màng đệm phôi gia cầm của cao chiết



Hình 3. Khả năng chống tạo mạch trên màng đệm phôi gia cầm của đối chứng âm (DMSO 5%), đối chứng dương (Retinoic acid 40 µg) và cao chiết lá Đuông đuông (200 µg)

Ghi chú: A, D, G là màng đệm ban đầu sau khi bóc vỏ trứng; B, E, H là màng đệm sau khi đặt giấy lọc tẩm DMSO 5%, Retinoic acid 40 µg, cao chiết lá Đuông đuông 200 µg; C, F, K là màng đệm sau 6h đặt giấy lọc tẩm DMSO 5%, Retinoic acid 40 µg, cao chiết lá Đuông đuông 200 µg.

Sự hình thành các mạch máu mới, là điều cần thiết cho sự phát triển, tiến triển và di căn của khối u. Khối u có khuynh hướng kích thích sự hình thành mạch máu mới mạnh hơn để cung cấp oxy, chất dinh dưỡng cho sự phát triển tăng sinh của các mô khối u và để hình thành các con đường để lan truyền tế bào ung thư [18]. Xét nghiệm màng đệm (chorioallantoic) phôi gia cầm đã được sử dụng rộng rãi như một mô hình để kiểm tra sự hình thành mạch máu và chống sự hình thành mạch máu [19]. Kết quả khảo sát khả năng chống tạo mạch trên màng đệm phôi gia cầm của cao chiết lá Đuông đuông (với nồng độ khảo sát là 50 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg), đối chứng dương retinoic acid (với nồng độ khảo sát là 20

µg, 30 µg, 40 µg) và so sánh với đối chứng âm là dung dịch DMSO 5% được thể hiện trong Hình 3. Kết quả cho thấy đối chứng âm DMSO 5% không thể hiện hoạt tính chống tạo mạch trên màng đệm phôi gia cầm. Các nghiệm thức đối chứng dương retinoic acid thể hiện hoạt tính chống tạo mạch rõ ở nồng độ 30 - 40 µg, còn lại nồng độ 20 µg không thể hiện rõ hoạt tính. Cao chiết lá Đuông đuông với hàm lượng 50 µg thể hiện khả năng ức chế hình thành mạch máu khá yếu, hàm lượng từ 100 µg trở lên có khả năng ức chế hình thành mạch máu khá tốt. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu trước đây cho thấy các hợp chất phân lập từ các bộ phận của cây Đuông đuông có khả năng gây độc các dòng tế bào ung thư KB, HepG-2, MCF-7 [1, 20].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy lá Đuông đuông (*Sphaerocoryne affinis*) có chứa nhóm hợp chất như flavonoid, alkaloid, tannin, steroid và triterpenoid, saponin. Ngoài ra, cao chiết còn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản và kháng nấm gây bệnh trên cây trồng. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng của chúng trong phát triển thuốc trong lĩnh vực nông nghiệp. Đồng thời, cao chiết có khả năng chống tạo mạch trên màng đệm phôi gia cầm ở nồng độ từ 100 µg làm tiền đề có các nghiên cứu sâu hơn trong phát triển thuốc điều trị ung thư.

LỜI CẢM ƠN: Chúng tôi xin cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo đã tài trợ nguồn kinh phí để thực hiện đề tài với mã số B2023-TKG-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hongnak S, Jongaramruang J, Khumkratok S, Siriphong P, Tip-pyang S, (2015). Chemical constituents and derivatization of melodorinol from the

- roots of *Melodorum fruticosum*. *Natural Product Communications*, **10**(4), 633-636.
- [2] Sakulnarmrat K, Konczak I, (2022). Encapsulation of *Melodorum fruticosum* Lour. anthocyanin-rich extract and its incorporation into model food. *LWT-Food Science and Technology*, **153**, 112546.
- [3] Jung JH, Pummangura S, Chaichantipyuth C, Patarapanich C, McLaughlin JL, (1990). Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry*, **29**, 1667-1670.
- [4] Tuchinda P, Udchachon J, Reutrakul V, Santisuk T, Taylor WC, Farnsworth NR, Kinghorn AD, (1991). Bioactive butenolides from *M. fruticosum*. *Phytochemistry*, **30**(8), 2685-2689.
- [5] Nguyen L, Le VVM, (2016). Effects of ultrasonic treatment of rumduol mash on the antioxidant level of fruit juice. *International Food Research Journal*, **23**(6), 2335-2340.
- [6] Chan HH, Hwang TL, Thang TD, Leu YL, Kuo PC, Nguyet BTM, Wu TS, (2013). Isolation and synthesis of melodamide A, a new anti-inflammatory phenolic amide from the leaves of *Melodorum fruticosum*. *Planta medica*, **79**, 288-294.
- [7] Huỳnh Kim Yến, Vũ Thị Yến, Ngô Thị Cẩm Tú, Nguyễn Công Hậu, Trần Thanh Mến, Nguyễn Trọng Tuấn, Nguyễn Thái Mỹ Linh, Triệu Phú Hậu, (2021). Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cao chiết ethanol cây Ngải cứu (*Artemisia vulgaris*). *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **26**(4A), 190-195.
- [8] Yadav RNS, Agarwala M, (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytotherapy*, **3**(12), 10-14.
- [9] 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.
- [10] Sarkar S, Jana AD, Samanta SK, Mostafa G, (2007). Facile synthesis of silver nano particles with highly efficient anti-microbial property. *Polyhedron*, **26**(15), 4419-4426.
- [11] Gakuubi MM, Maina AW, Wagacha JM, (2017). Antifungal activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* dehn against selected *Fusarium* spp.. *International journal of microbiology*, **2017**, 1-7.
- [12] Gamallo JPM, Espere G, Carillo DMC, Blanes DN, Abuda FG, Labarda HJ, Jumawan JC, (2016). Evaluation of antiangiogenic property of *Ocimum basilica* ethanolic leaf extract by using duck embryo chorioallantoic membrane (cam) assay and its morphometric analysis. *International Journal Herbal Medicine*, **4**(4), 22-26.
- [13] Do LTM, Sichaem J, (2022). New Flavonoid Derivatives from *Melodorum fruticosum* and Their α -Glucosidase Inhibitory and Cytotoxic Activities. *Molecules*, **27**, 4023-4031.
- [14] Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM, (2019). Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. *Frontiers in microbiology*, **10**, 911.
- [15] Kamel C, 2001. Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non-ruminants. *Recent advances in animal nutrition*, 135-150.
- [16] Mongkol R, Piapukiew J, Chavasiri W, (2016). Chemical constituents from *Melodorum fruticosum* Lour. flowers against plant pathogenic fungi. *Agriculture and Natural Resources*, **50**(4), 270-275.
- [17] Rongai D, Milano F, Sciò E, (2012). Inhibitory effect of plant extracts on conidial germination of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *American Journal of Plant Sciences*, **3**(12), 1693-1698.

- [18] Ribatti D, (2004). The first evidence of the tumor-induced angiogenesis *in vivo* by using the chorioallantoic membrane assay dated 1913. *Leukemia*, **18(8)**, 1350-1351.
- [19] Tufan AC, Satiroglu-Tufan NL, (2005). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. *Current cancer drug targets*, **5(4)**, 249-266.
- [20] Galle JB, Leti M, Kim S, Mandeau A, (2013). Unusual benzylated flavonoids from *Mitrella mesnyi* (Pierre) Bân. *Biochemical Systematics and Ecology*, **48**, 9-11.