

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH CỦA CAO CHIẾT TỪ LOÀI HẢI MIỀN *Xestospongia testudinaria*

Đến tòa soạn 17-06-2022

Tôn Nữ Liên Hương*, Lưu Vũ Phương
Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ
Email: tnlhuong@ctu.edu.vn

SUMMARY

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIMICROORGANISM ACTIVITIES FROM EXTRACTS OF THE SPONGE *Xestospongia testudinaria*

Among the sponge species collected in Southwestern Vietnam, *Xestospongia testudinaria* was relatively abundant but was less studied. Surveying the biological activities of sponges harvested at a depth of 10 m at Phu Quoc marine, Kien Giang province, gave lots of useful information. The extracts of this sponge species showed weak inhibition for bacterial and fungal strains ($MIC > 512 \mu\text{g/mL}$). The *n*-hexane extract exhibited two strains of Gram (-) bacteria including *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* with the values of IC_{50} from 482.46 ± 8.5 to $435.2 \pm 10.0 \mu\text{g/mL}$. In addition, these sponge extracts showed moderate antioxidant activity with the values of $EC_{50} < 300 \mu\text{g/mL}$, in the ABTS assay.

Key words: Antimicroorganism, antioxidant, *Xestospongia testudinaria*.

1. GIỚI THIỆU

Hải miên (phylum Porifera) là một trong những loài động vật có từ rất lâu đời. Hải miên có cấu tạo cơ thể đơn giản nhất trong tất cả các loài động vật đa bào, cơ thể bao gồm một lớp trung mô dạng thạch được kẹp giữa hai màng tế bào mỏng. Hải miên không có hệ thần kinh, hệ tiêu hóa, hệ tuần hoàn và không có khả năng vận động [1]. Vì thế, hầu hết sự sống của hải miên dựa vào việc duy trì một dòng nước ổn định chảy qua cơ thể để thu nhận thức ăn và oxy cũng như thải các chất cặn bã [2]. Chúng sinh trưởng rộng rãi trong đại dương và có khả năng chịu đựng nhiệt độ và áp suất cực lớn [3]. Chính vì môi trường sống khắc nghiệt, hải miên luôn phải sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp đặc biệt có khả năng chống lại các loài động vật ăn thịt và duy trì cơ thể ở độ sâu 10 m so với mực nước biển [2-3]. Cho đến nay, có khoảng 8000 loài Porifera khác nhau sống

trong các hệ sinh thái biển và hệ sinh thái nước ngọt. Kể từ khi bắt đầu khám phá các sản phẩm từ tự nhiên biển vào những năm 1970, việc nghiên cứu các chất chuyển hóa thứ cấp của hải miên *Xestospongia* (họ Petrosiidae), thường được gọi là bọt biển thùng, đã được nghiên cứu ở một số nước trên thế giới [4]. Chúng được biết đến là nguồn phong phú cung cấp các hợp chất hóa học chẳng hạn như: isoquinoline, quinolizidine, pyridoacridine alkaloid, quinone, sterol, acid polyacetylenic brom hóa và ester hóa [4]. Các nghiên cứu gần đây về thành phần hóa học và tác dụng dược lý của chi *Xestospongia* đặc biệt là hải miên *Xestospongia testudinaria* đã cho thấy các chất chiết xuất thô và các hợp chất phân lập từ hải miên này thể hiện các hoạt tính sinh học đáng kể, chẳng hạn như kháng viêm, kháng oxy hóa [5], điều hòa miễn dịch [6], gây độc tế bào, kháng khuẩn, diệt côn trùng, ức chế protease

HIV và các hoạt động chống co thắt cơ tim [7-8].

Trong các nghiên cứu đã công bố gần đây của Tôn Nữ Liên Hương và ctv vào năm 2019 - 2020, cao ethanol tổng của các loài hải miên thu tại vùng biển Phú Quốc này có khả năng gây độc trên dòng tế bào Hep-G2 gây ung thư gan ở người ($IC_{50} = 56,34 \mu\text{g/mL}$) [9]. Đặc biệt, các hợp chất sterol có mạch carbon 30C, oxime và tetillapyrone đã được phân lập, định danh và xác định các hoạt tính sinh học nổi trội thông qua các nghiên cứu so sánh từ loài hải miên *Xestospongia testudinaria* [10].

Nội dung bài báo này trình bày kết quả khảo sát sơ bộ khả năng oxi hoá và kháng vi sinh vật kiểm định nhằm cung cấp thêm chứng cứ khoa học về hoạt tính sinh học của loài hải miên *Xestospongia testudinaria* để khai thác, thu tại vùng biển Tây Nam Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP, PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện, vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Mẫu vật liệu

Hải miên thuộc chi *Xestospongia*, tên là loài *Xestospongia testudinaria*, được thu gom tại độ sâu 10 m vùng biển Kiên Giang, Việt Nam, ở tọa độ N 09°58'17.8" (E 104°01'34.4"), được định danh dựa trên đặc điểm hình thái giải phẫu của cấu trúc khung xương và trâm xương theo hướng dẫn của Hooper. Cấu trúc khung xương và thành phần gai xương được quan sát dưới kính hiển vi quang học ACCU-Scope EXC 350, với độ phóng đại từ 4-40 lần. Định danh bởi Tiến sĩ Thái Minh Quang - phòng Nguồn lợi thủy sinh, Viện Hải Dương Học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Mẫu tiêu bản số SP02-2018, lưu tại phòng thí nghiệm Hóa Hữu cơ 2, khoa Khoa học Tự Nhiên, trường Đại học Cần Thơ.



Hình 1. Mẫu hải miên *Xestospongia testudinaria*

2.1.2. Hóa chất và dụng cụ sử dụng điều chế cao chiết và thử nghiệm hoạt tính

Ethanol 96%, dichloromethane, *n*-hexane (Chemsol, Việt Nam) và dùng thử hoạt tính kháng oxy hóa: DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Wako, Japan), ABTS (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), Acid ascorbic (vitamine C), Acid gallic, $K_2S_2O_8$, DMSO (Dimethyl sulfoxide), methanol (Merck). Môi trường nuôi cấy: LB (Luria-Bertani), MHB (Mueller-Hinton Broth), MHA (Mueller-Hinton Agar), TSB (Tryptic Soy Broth), TSA (Tryptic Soy Agar), SDB (Sabourand-2% dextrose broth) và SA (Sabourand-4% dextrose agar). Kháng sinh Ampicillin, Cefotaxim và kháng nấm Nystatin. Bộ quay Heidolph, máy UV-Vis (Biotek), các dụng cụ phân tích vi sinh, micropipette và eppendorf.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Định danh khoa học mẫu nguyên liệu và chiết cao ethanol tổng, sau đó dùng phương pháp chiết lỏng lỏng để phân đoạn cao theo độ phân cực khác nhau, thực hiện tại khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

Thử nghiệm kháng oxy hoá được thực hiện tại khoa Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ.

Thử nghiệm kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện tại Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam.

2.2.1. Điều chế cao chiết

Mẫu hải miên *Xestospongia testudinaria* (300 g) sau khi thu về được rửa thật sạch để ráo, tiếp theo ngâm dầm, chiết với dung môi ethanol 96°, quá trình chiết được lặp lại 5 lần để chiết kiệt các hợp chất hữu cơ trong mẫu thí nghiệm, thu được cao ethanol tổng (cao EtOH tổng) có khối lượng 25 g. Dịch chiết sau khi cô quay thu hồi dung môi ethanol được sắc ký qua cột Diaion HP-20 để loại muối (dung môi gồm nước tinh khiết và ethanol). Tiếp theo gom các phân đoạn ethanol (đã loại muối) thực hiện chiết lỏng-lỏng lần lượt với các dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau và thu hồi dung môi từ các dung dịch thu được để có các cao chiết phân đoạn, gồm cao *n*-hexane (cao Hex) có khối lượng 4.3 g, cao dichloromethane (cao

DC) có khối lượng 1.5 g và cao ethanol:nước còn lại (EtOH-H₂O) có khối lượng 11.8 g [11].

2.2.2. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa

2.2.2.1. Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH

Khảo sát hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH, còn gọi là khả năng kháng oxy hóa, của các cao chiết hải miên, theo phương pháp của Sharma (2009) có hiệu chỉnh [12]. Hỗn hợp phản ứng gồm 40 µL DPPH (1 mg/mL) và 960 µL cao chiết ở nồng độ từ 250 đến 900 µg/mL (mỗi nồng độ lặp lại 3 lần). Hỗn hợp được ủ trong tối 60 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. Chất đối chứng được sử dụng là ascorbic acid (ở các nồng độ từ 1,...,15 µg/mL). Thử nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập để đảm bảo tính chính xác.

2.2.2.2. Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do ABTS^{•+}

Hoạt động loại bỏ gốc tự do ABTS^{•+} được xác định theo phương pháp của Nenadis (2004) có hiệu chỉnh [13]. Cho 10 µL dung dịch các cao chiết (nồng độ từ 200 đến 450 µg/mL) vào 990 µL dung dịch ABTS^{•+}. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 6 phút ở nhiệt độ phòng, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm. Chất đối chứng được sử dụng là gallic acid (ở các nồng độ khảo sát 5,...,30 µg/mL). Thử nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập để đảm bảo tính chính xác.

2.2.2.3. Thống kê phân tích số liệu

Kết quả được xử lý thống kê theo phương pháp phân tích Anova bằng phần mềm Minitab 16.0 và đồ thị được biểu diễn bằng phần mềm Microsoft Excel.

2.2.3. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định bằng phương pháp pha loãng nồng độ trên môi trường lỏng

Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), *Lactobacillus fermentum* (N4), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella enterica*, *Candida albicans* (ATCC 10231).

Cao chiết hải miên được pha loãng trong DMSO 100% và nước cất tiệt trùng ở các nồng độ: 4, 32, 128 và 512 µg/mL. Lấy 10 µL dung

dịch cao chiết cho vào đĩa 96 giếng, thêm 190 µL dung dịch vi khuẩn (nồng độ 5×10⁵ CFU/mL) và nấm (nồng độ 10³ CFU/mL), ủ ở 37°C trong 16 đến 24 giờ. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất mà ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật. Giá trị IC₅₀ được xác định thông qua % ức chế vi sinh vật phát triển và phần mềm máy tính Rawdata [14].

$$IC_{50} = High_{Conc} - \frac{(High_{Inh\%} - 50) \times (High_{Conc} - Low_{Conc})}{High_{Inh\%} - Low_{Inh\%}} \quad (1)$$

$$\% \text{ ức chế tế bào} = \frac{OD_{chứng (+)} - OD_{mẫu thử}}{OD_{chứng (+)} - OD_{chứng (-)}} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó: *High_{Conc}/Low_{Conc}*: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; *High_{Inh%}/Low_{Inh%}*: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp.

Chất tham chiếu:

- Kháng sinh Ampicillin cho các chủng vi khuẩn Gram (+) với các giá trị IC₅₀ trong khoảng 0.001-0.500 µg/mL; các giá trị MIC trong khoảng 0.004-1.200 µg/mL.

- Kháng sinh Cefotaxim cho các chủng vi khuẩn Gram (-) với các giá trị IC₅₀ trong khoảng 0.025-15.75 µg/mL; với giá trị MIC trong khoảng 0.05-19.5 µg/mL.

- Kháng nấm Nystatin cho chủng nấm *Candida* với giá trị IC₅₀ trong khoảng 2-2.5 µg/mL; với giá trị MIC trong khoảng 2.8-5.0 µg/mL.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thử hoạt tính kháng oxy hóa

3.1.1. Khảo sát khả năng làm sạch gốc tự do DPPH

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết hải miên được khảo sát dựa trên phần trăm kháng oxy hóa và được so sánh với chất chuẩn ascorbic acid (vitamine C) với EC₅₀ = 7.91 µg/mL và dựa vào phương trình đường chuẩn hồi quy tuyến tính $y = 6.0125x + 2.4229$ với hệ số tương quan $R^2 = 0.9963$.

Kết quả kháng oxy hóa của cao chiết hải miên *X. testudinaria* được trình bày trong **Bảng 1** cho thấy hiệu suất kháng oxy hóa của cao chiết tỉ lệ thuận với nồng độ và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nồng độ khảo sát.

Bảng 1. Khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH (%) theo từng nồng độ của các cao chiết

Cao chiết	Khả năng bắt giữ gốc tự do (%) theo nồng độ thử nghiệm						EC ₅₀ (µg/mL)
	250	350	450	500	800	900	
EtOH tổng	31.91±0.42 ^b	33.01±0.25 ^b	42.92±0.99 ^c	46.32±0.35 ^d	72.49±0.72 ^e	82.20±0.46 ^f	531.69
Hex	20.67±0.75 ^b	27.84±0.29 ^c	36.33±1.07 ^d	39.72±0.55 ^e	63.23±0.60 ^f	69.81±0.47 ^g	633.94
DC	30.45±0.58 ^b	32.14±3.57 ^b	44.16±0.84 ^c	49.57±0.46 ^d	67.57±0.71 ^e	83.59±3.92 ^f	516.23
EtOH-H ₂ O	26.73±0.96 ^b	33.90±0.35 ^c	43.93±0.31 ^d	49.95±0.50 ^e	79.24±0.40 ^f	82.65±0.53 ^g	515.68

Ghi chú: các mẫu tự theo sau các giá trị trong cùng một hàng khác nhau thì khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%

Cao chiết của hải miên *Xestospongia testudinaria* bắt giữ gốc tự do DPPH ở nồng độ cao, các giá trị EC₅₀ của cao đều lớn hơn 500 µg/mL, thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa yếu. Dựa theo giá trị EC₅₀ của bốn loại cao chiết trên, cao DC và cao EtOH-H₂O thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất với giá trị EC₅₀ lần lượt là 516,23 và 515,68 µg/mL, và cao có hoạt tính thấp nhất là cao Hex (IC₅₀ = 633.94 µg/mL).

Hải miên thuộc cùng một loài được thu hoạch ở các vị trí khác nhau thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa khác biệt nhau, điển hình hải miên *Xestospongia testudinaria* ở của vùng Indonesia cho hoạt tính kháng gốc tự do DPPH tốt nhất (IC₅₀ = 277,75 µg/mL) [15], hải miên *Xestospongia testudinaria* Việt Nam cho hiệu quả kháng gốc tự do DPPH tốt hơn so với mẫu thu tại Thái Lan. Mẫu của Thái Lan thử nghiệm với nồng độ 1000 µg/mL thì cao MeOH kháng 71,85% và cao EtOH-H₂O kháng 82,65% ở nồng độ 900 µg/mL [16].

Sự khác biệt về hoạt tính kháng oxy hóa là do chịu sự tác động bởi môi trường sống ở đáy biển, con đường trao đổi chất của vi sinh vật cộng sinh dẫn đến việc sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp khác nhau [17-18].

3.1.2. Khảo sát khả năng làm sạch gốc tự do ABTS^{•+}

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết hải miên được khảo sát dựa trên phần trăm kháng oxy hóa và được so sánh với chất chuẩn gallic acid với EC₅₀ = 18.79 µg/mL và dựa vào phương trình đường chuẩn hồi quy tuyến tính y = 2.7922x - 2.4575 (R² = 0.9953).

Các cao chiết hải miên *Xestospongia testudinaria* được tiến hành xác định khả năng trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} bằng cách xây dựng đồ thị giữa nồng độ cao chiết và hiệu suất trung hòa gốc tự do ABTS^{•+}. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng bắt giữ gốc tự do ABTS^{•+} (%) theo từng nồng độ của các cao chiết

Cao chiết	Khả năng bắt giữ gốc tự do (%) theo nồng độ thử nghiệm						EC ₅₀ (µg/mL)
	200	250	300	350	400	450	
EtOH tổng	37.95±0.61 ^b	47.89±0.73 ^c	53.46±0.29 ^d	66.87±0.08 ^e	67.62±0.50 ^e	80.12±0.15 ^f	275.43
Hex	25.39±0.13 ^b	38.47±0.13 ^c	50.78±0.19 ^d	61.99±0.16 ^e	68.15±0.25 ^f	78.50±0.07 ^g	299.75
DC	43.96±0.79 ^b	48.73±0.05 ^c	54.69±0.01 ^d	71.98±0.00 ^e	80.63±0.29 ^f	88.67±0.24 ^g	250.58
EtOH-H ₂ O	42.70±0.21 ^b	56.78±0.40 ^c	70.65±0.45 ^d	79.65±0.04 ^e	84.51±0.46 ^f	91.59±0.66 ^g	226.95

Ghi chú: các mẫu tự theo sau các giá trị trong cùng một hàng khác nhau thì khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%

Căn cứ vào Bảng 2, cao chiết EtOH-H₂O có hoạt tính trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} mạnh nhất với giá trị EC₅₀ = 226,95 µg/mL.

Theo Wisespongand, cao MeOH loài *Xestospongia testudinaria* (thu tại Thái Lan) có hoạt tính khử gốc tự do ABTS^{•+} yếu hơn so với cao chiết EtOH-H₂O khoảng 2 lần. Mẫu cao MeOH (nồng độ 1000 µg/mL) khử loại gốc tự do 99,32% còn cao EtOH-H₂O khử gốc tự do 91,59% tại nồng độ 450 µg/mL [16].

Rõ ràng, hải miên *Xestospongia testudinaria* thu tại biển Việt Nam thể hiện tiềm năng kháng oxy hóa tốt hơn rất nhiều so với hải miên trong

cùng loài nhưng của nghiên cứu ở các nơi khác.

3.2. Kết quả thử hoạt tính vi sinh vật kiểm định

Các cao chiết hải miên *Xestospongia testudinaria* được pha loãng và khảo sát độ nhạy cảm với các chủng vi khuẩn và nấm kiểm định. Hiệu quả ức chế các chủng vi sinh vật kiểm định được trình bày ở **Bảng 3**.

Bảng 3. Hiệu quả ức chế các chủng vi sinh vật kiểm định của các loại cao chiết

Cao chiết	Giá trị	Gram (+)				Gram (-)		Nấm men
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albican</i>
EtOH tổng	IC ₅₀	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
	MIC	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
Hex	IC ₅₀	482,46±8,5	>512	>512	>512	435,2±10,0	>512	>512
	MIC	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
DC	IC ₅₀	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
	MIC	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
EtOH-H ₂ O	IC ₅₀	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
	MIC	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512

Hầu hết cao của hải miên *Xestospongia testudinaria* có khả năng ức chế yếu đối với 6 dòng vi khuẩn và nấm *C. albican* (MIC > 512 µg/mL). Tuy nhiên, cao *n*-hexane có kết quả vượt trội, khi ức chế chủng vi khuẩn tụ cầu vàng Gram (+) *S. aureus* gây nhiễm trùng có mụn trên da, và chủng Gram (-) *E. coli* gây một số bệnh bất lợi về đường tiêu hóa với giá trị IC₅₀ lần lượt là 482,46 và 435,2 µg/mL. Theo nghiên cứu của Hartiadi và các cộng sự, các hợp chất phân lập được từ loài *Xestospongia* sp. cho hoạt tính kháng tốt vi khuẩn *P. aeruginosa*, (IC₅₀ từ 1,7 - 2,9 µM/mL) và chủng *M. intracellulare* (IC₅₀ < 24 µM/mL) [19].

Rõ ràng, giá trị IC₅₀ trong các nghiên cứu là khác nhau, khả năng ức chế của cao chiết thô chênh lệch so với trên chất tinh khiết, tác dụng ức chế thấp vì còn là hỗn hợp nhiều chất.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hoạt tính sinh học trên các cao chiết có độ phân cực khác nhau của loài hải miên *Xestospongia testudinaria* cho những kết quả bước đầu khá quan. Cao chiết của loài hải miên này thể hiện khả năng ức chế các chủng vi khuẩn (MIC > 512 µg/mL). Cao *n*-hexane ức chế 2 chủng vi khuẩn Gram (-) *Staphylococcus aureus* và *Symonella enterica* tốt hơn các chủng khác (IC₅₀ từ 482.46±8.5 đến 435.2±10.0 µg/mL). Ngoài ra, các cao chiết từ hải miên này cho hoạt tính kháng oxy hóa ở mức trung bình (EC₅₀ < 300 µg/mL) trong thử nghiệm ABTS.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Trường Đại học Cần Thơ cấp kinh phí thực hiện đề tài Sinh viên NCKH, mã số TSV2021-53, Bộ môn Hóa học, Khoa Khoa học tự nhiên đã hỗ trợ thiết bị nghiên cứu, TS. Thái Minh Quang (Viện Hải

Dương học Nha Trang) đã hỗ trợ định danh khoa học loài hải miên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Hooper, J. N. and Rob W.M. Van Soest, 2002. *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges. Systema Porifera..* Kluwer Academic Plenum Publishers, Springer, 1-7.

[2] Laport, M. S., Santos, O. C. S., & Muricy, G. (2009). Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(1), 86-105.

[3] Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2004). Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of natural products*, 67(8), 1216-1238.

[4] Zhou, X., Xu, T., Yang, X. W., Huang, R., Yang, B., Tang, L., & Liu, Y. (2010). Chemical and biological aspects of marine sponges of the genus *Xestospongia*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(9), 2201-2227.

[5] El-Shitany, N. A., Shaala, L. A., Abbas, A. T., Abdel-Dayem, U. A., Azhar, E. I., Ali, S. S., ... & Youssef, D. T. (2015). Evaluation of the anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects of the organic extract of the red sea marine sponge *Xestospongia testudinaria* against carrageenan induced rat paw inflammation. *PLoS One*, 10(9), e0138917.

[6] Cerqueira, F., Watanadilok, R., Sonchaeng, P., Kijjoa, A., Pinto, M., van Ufford, H. Q., ... & Nascimento, M. S. J. (2003). Clionasterol: A potent inhibitor of complement component C1. *Planta medica*, 69(02), 174-176.

[7] Edrada, R. A., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Müller, W. E. G., & Van Soest, R. W. (1996). Four new bioactive manzamine-type alkaloids from the Philippine marine sponge *Xestospongia ashmorica*. *Journal of natural products*, 59(11), 1056-1060.

[8] Nakamura, M., Kakuda, T., Qi, J., Hirata, M., Shintani, T., Yoshioka, Y., ... & Ojika, M. (2005). Novel relationship between the antifungal activity and cytotoxicity of marine-derived metabolite xestoquinone and its family. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 69(9), 1749-1752.

[9] Lien-Huong, T.N., Phung, N.T.K., & Khang V.N (2019). Hoạt tính gây độc tế bào từ chiết xuất ethanol của hải miên *Neopetrosia* sp., *Tạp chí Dược học*, 59(1): 31-35.

[10] Lien-Huong, T.N., Phuc, P. M., An D.V., Hang T. P., & Nhi, T.Y.C (2020). Phân lập định danh hợp chất oxime, tetillapyrone từ loài hải miên *Xestospongia testudinaria* vùng biển Kiên Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(5), 72-77.

[11] Phụng, N. K. P. (2007). Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

[12] Sharma, O. P. and T. K. Bhat (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry* 113(4): 1202-1205.

[13] 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.

[14] Hadacek, F., & Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical analysis*, 11(3), 137-147.

[15] Abdillah, S., Nurhayati, A. P. D., Nurhatika, S., Setiawan, E., & Heffen, W. L. (2013). Cytotoxic and antioxidant activities of marine sponge diversity at Pecaron Bay Pasir Putih Situbondo East Java, Indonesia. *Journal of pharmacy research*, 6(7), 685-689.

[16] Wisespongpan, P., Hongpadharakiree K., Kanthawong A. (2016). Free radical scavenging and ferrous chelating activities of Thai marine sponge extracts. *Burapha Science Journal* 21(2): 115-129.

[17] Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 295-347.

[18] Longeon, A., Copp, B. R., Roué, M., Dubois, J., Valentin, A., Petek, S., ... & Bourguet-Kondracki, M. L. (2010). New bioactive halenaquinone derivatives from South Pacific marine sponges of the genus *Xestospongia*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(16), 6006-6011.

[19] Hartiadi, L., Rebecca, J., Sheryl, S., & Crystalia, A. A. (2020). A Review on the Antimicrobial Properties of Giant Barrel Sponge-*Xestospongia* sp. *Indonesian Journal of Life Sciences* | ISSN: 2656-0682 (online), 2(2), 96-112.