

Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết lá trà không (*Piper betle* L.) thu nhận bằng phương pháp chiết siêu âm

Hoàng Thùy Dương¹, Nguyễn Kim Thanh Kiều², Ngô Hồng Loan¹, Phan Thị Kim Ngân¹,
Lâm Hoàng Anh Thư¹, Phạm Tiến Dũng¹, Ngô Võ Kế Thành¹, Nguyễn Hữu Tuyền^{1*}

¹Trung tâm Nghiên cứu Triển khai Khu Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 2/8/2021; ngày chuyển phản biện 5/8/2021; ngày nhận phản biện 1/9/2021; ngày chấp nhận đăng 8/9/2021

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, cao chiết lá trà không trong 3 loại dung môi (nước, ethanol 70 và 96%) được thu nhận bằng phương pháp sử dụng sóng siêu âm. Hoạt chất sinh học của cao chiết được xác định qua hàm lượng phenolic và flavonoid tổng. Khả năng kháng oxy hóa được đánh giá qua phản ứng trung hòa gốc tự do ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)]. Hoạt tính kháng vi khuẩn, nấm bệnh được đánh giá thông qua phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và đồng nuôi cấy. Kết quả cho thấy, cao chiết lá trà không với dung môi ethanol 96% cho kết quả kháng oxy hóa và vi khuẩn tốt nhất. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng đạt lần lượt là 386,34 mg GAE/g cao chiết và 55,07 mg QE/g cao chiết. Khả năng trung hòa 50% gốc tự do ABTS⁺ (IC₅₀) ghi nhận ở nồng độ 47,18 µg/ml. Nồng độ diệt nấm và vi khuẩn tối thiểu của cao chiết từ ethanol 96% trên *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* có giá trị lần lượt là 1000, 500, 500, 250 µg/ml. Các kết quả này cho thấy, cao chiết lá trà không trong ethanol 96% với sự hỗ trợ của sóng siêu âm có tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm.

Từ khóa: hoạt tính kháng oxy hoá, hoạt tính kháng vi khuẩn, lá trà không, sóng siêu âm.

Chỉ số phân loại: 2.4

Đặt vấn đề

Hiện nay, ly trích và ứng dụng các hoạt chất từ nguồn dược liệu thiên nhiên đang được nhiều nhà khoa học quan tâm. Dược phẩm với nguồn gốc từ thảo dược được sử dụng ngày càng phổ biến để thay thế các loại thuốc hóa học tổng hợp. Việt Nam có khí hậu nhiệt đới gió mùa với thảm thực vật đa dạng và phong phú, bao gồm nhiều nguồn dược liệu với số lượng lớn. Trong đó, cây trà không đang được nghiên cứu và tìm hiểu như một nguồn dược liệu có nhiều công dụng. Thành phần hoạt chất sinh học từ lá trà không rất đa dạng với 12 hợp chất polyphenol, bao gồm 1 hợp chất phenylpropanoid, 5 hợp chất cinnamoyl và 6 dẫn xuất flavonoid. Hydroxychavicol là hợp chất chính được tìm thấy trong cả 2 cách chiết xuất lá trà không bằng nước và ethanol. Một số nhóm chất chuyển hóa đã được tìm thấy trong lá trà không như các hợp chất phenolic, cụ thể là phenylpropanoid, flavonoid... [1, 2]. Các hợp chất này có khả năng kháng oxy hóa cao và tác dụng kháng sinh mạnh đối với một số vi khuẩn, nấm [3]. Ở khu vực Đông Nam Á, lá trà không được xem như một loài thực vật có công hiệu trong việc chữa trị các bệnh sâu răng và nha chu [4]. Đặc biệt trong y học cổ truyền Việt Nam, lá trà không được sử dụng với mục đích giúp chắc răng, chữa viêm mủ chân răng và trị sâu răng.

Các phương pháp ly trích hoạt chất truyền thống thông thường như chưng cất, đun hay ngâm chiết trong dung môi thường được sử dụng để ly trích các hoạt chất từ thực vật. Các kỹ thuật chiết xuất này thường cho hiệu suất thấp, sản phẩm thu được chất lượng không cao, thời gian thu nhận dài, cần lượng lớn dung môi cho quá trình chiết xuất dẫn đến gây ô nhiễm môi trường. Công nghệ chiết xuất, ly trích hiện nay được phát triển nhằm khắc phục các nhược điểm của các phương pháp truyền thống. Một số kỹ thuật được sử dụng phổ biến như: chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm, vi sóng, dung môi dưới áp lực, siêu tới hạn CO₂. Trong đó, phương pháp chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm được sử dụng nhiều nhất nhờ thao tác đơn giản, chi phí thấp và dễ thực hiện trên quy mô lớn [5-7].

Ở Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về quy trình ly trích và ứng dụng các hợp chất từ nhiều nguồn thực vật. Tuy nhiên, đa số các nghiên cứu đều sử dụng các phương pháp chiết xuất truyền thống, chưa có nhiều nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật chiết xuất hiện đại, chiết xuất xanh. Đặc biệt, trên đối tượng lá trà không, một nguồn thảo dược phổ biến và phong phú nhưng các nghiên cứu về phương pháp ly trích hoạt chất còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm bổ sung thêm cơ sở dữ liệu về phương pháp ly trích hoạt chất từ lá trà không bản địa.

*Tác giả liên hệ: Email: tuyen.nguyenhuu@shtplabs.org

Evaluation of bioactivities of ultrasound-assisted extraction of betel leaves (*Piper betle* L.)

Thuy Duong Hoang¹, Kim Thanh Kieu Nguyen²,
Hong Loan Ngo¹, Thi Kim Ngan Phan¹,
Hoang Anh Thu Lam¹, Tien Dung Pham¹,
Vo Ke Thanh Ngo¹, Huu Tuyen Nguyen^{1*}

¹Saigon Hi-Tech Park Research Laboratories

²Nong Lam University Ho Chi Minh city

Received 2 August 2021; accepted 8 September 2021

Abstract:

In this study, the betel leaf extracts were obtained by using an ultrasound-assisted extraction method with different solvents (70% ethanol, 96% ethanol, and water). The biological compounds of the extracts were examined using different biochemical assays, namely total phenolic content, total flavonoid content. ABTS⁺ radical cation decolorization was using to determine the antioxidant activity. The antibacterial activity of the betel leaf extracts was determined using the agar diffusion and co-culture method. The obtained results of this study indicated that the betel leaf extract from the ethanol 96% was considerably more effective than other extracts in both antioxidant and antibacterial activity. The total phenolic and flavonoid content was 386.34 mg GAE/g extract and 55.07 mg QE/g extract, respectively. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of ABTS⁺ scavenging activity was 47.18 µg/ml. The betel leaf extract from the ethanol 96% showed more effectiveness in antibacterial than in antifungal. The minimum inhibitory concentrations of the 96% ethanol betel leaf extract on *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* were 1000, 500, 500, 250 µg/ml, respectively. Results showed that the 96% ethanol ultrasound-assisted betel leaf extract has a potential application in pharmaceuticals and cosmetics.

Keywords: antibacterial, antioxidant, *Piper betle* L., ultrasound-assisted extraction.

Classification number: 2.4

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Lá trầu không tươi (*Piper betle* L.) được thu nhận tại Lái Thiêu, Thuận An, Bình Dương. Lá trầu không tươi được xử lý sơ bộ, rửa sạch và loại bỏ bụi bẩn trước khi tiến hành thí nghiệm.

Các chủng vi khuẩn, nấm bệnh (*S. mutans* - ATCC 700069, *S. pyogenes* - ATCC 49399, *C. diphtheriae* - ATCC 13812 và *C. albicans* - ATCC 18404) được lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Trung tâm Nghiên cứu Triển khai Khu Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh.

Phương pháp ly trích hoạt chất từ lá trầu không

Mẫu lá trầu không tươi sau khi xử lý sơ bộ được đông khô ở -51°C, trong điều kiện chân không từ 24 đến 48 giờ. Sau đông khô, nghiền nhỏ mẫu lá trầu không thành dạng bột. Cân 10 g bột lá, bổ sung 200 ml dung môi (nước cất, ethanol 70 và 96%). Hỗn hợp sau khi chuẩn bị được đặt trong hệ thống siêu âm dạng thanh Q1375 (Qsonica, Mỹ). Tiến hành đánh siêu âm với 70% công suất máy, sau 30 phút, lọc và thu nhận dịch chiết bằng giấy lọc Whatman. Loại bỏ dung môi bằng cách đun cách thủy ở 70°C và thu nhận cao chiết. Cao chiết được bảo quản ở 4°C trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp xác định hàm lượng phenolic và flavonoid tổng

Hàm lượng phenolic tổng được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu có sửa đổi [8]. Dung dịch DMSO được sử dụng để pha loãng và chuẩn bị dãy nồng độ các loại cao chiết. Lần lượt cho 0,5 ml dịch chiết lá trầu không vào 2,5 ml dung dịch thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, lắc đều và để phản ứng trong 4 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục bổ sung 2 ml dung dịch Na₂CO₃ 2% vào hỗn hợp dung dịch trên. Sau 120 phút phản ứng, tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm (OD₇₆₅). Gallic acid được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Hàm lượng phenolic tổng trong mẫu cao chiết lá trầu không được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic acid.

Hàm lượng flavonoid tổng được xác định bằng phương pháp so màu AlCl₃ có sửa đổi [9]. Dung dịch DMSO được sử dụng để pha loãng và chuẩn bị dãy nồng độ các loại cao chiết. Lần lượt cho 0,5 ml dịch chiết lá trầu không vào 1,5 ml dung dịch ethanol 95%, để yên trong 5 phút, sau đó tiếp tục thêm 0,1 ml dung dịch AlCl₃ 10% và lắc đều. Sau 6 phút phản ứng, thêm 0,1 ml CH₃COOK 1 M và 2,8 ml nước cất lắc đều và để ổn định ở nhiệt độ phòng. Sau 30 phút, tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 415 nm (OD₄₁₅). Quercetin được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm

lượng flavonoid tổng trong cao chiết lá trà không được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

Phương pháp xác định khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺

ABTS⁺ là một gốc tự do bền, phát huỳnh quang màu xanh và có bước sóng hấp thụ đặc trưng là 734 nm [10]. Gốc tự do ABTS⁺ được tạo ra bằng cách ủ dung dịch ABTS⁺ 7 mM với dung dịch K₂S₂O₈ 2,45 mM theo tỷ lệ 1:1 (v/v) trong đệm PBS 12-16 giờ, tránh sáng, ở nhiệt độ phòng. Sau đó, điều chỉnh giá trị OD₇₃₄ của dung dịch ABTS⁺ về mức 0,7±0,02. Phản ứng được tiến hành bằng cách thêm 100 µl cao chiết lá trà không ở các nồng độ khác nhau vào 3 ml dung dịch ABTS⁺. Ủ tối 30 phút ở 25°C, sau đó tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 734 nm. Phần trăm bắt gốc tự do được tính theo công thức sau:

$$H(\%) = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

trong đó: A là giá trị OD₇₃₄ của mẫu đối chứng; B là giá trị OD₇₃₄ của mẫu.

Phương pháp xác định hoạt tính kháng vi khuẩn

Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch: chủng vi khuẩn, nấm bệnh được trải đều trên đĩa thạch chứa môi trường dinh dưỡng thích hợp ở nồng độ 10⁶ tế bào/ml. Dùng ống đục vô trùng (đường kính 5 mm) tạo các giếng trên đĩa (5 giếng/đĩa). Sau đó, bổ sung vào các giếng thạch 50 µl dịch chiết lá trà không (LT-H₂O, LT-Et70, LT-Et96) ở nồng độ 50 mg/ml. Đối chứng âm với dung dịch DMSO. Đối chứng dương với các loại kháng sinh khác nhau cho từng loại vi khuẩn, nấm. Ủ các đĩa ở 37°C, sau 24 giờ quan sát và ghi nhận kết quả.

Phương pháp đồng nuôi cấy: chọn loại cao chiết lá trà không có hoạt tính kháng vi khuẩn tốt nhất để khảo sát. Dây nồng độ cao chiết lá trà không được pha loãng bậc 2 từ nồng độ gốc 2000 µg/ml trong môi trường nuôi cấy lỏng thích hợp. Chuẩn bị các hỗn dịch vi khuẩn, nấm với nồng độ 10⁶ tế bào/ml. Bổ sung 100 µl dịch nấm và vi khuẩn vào các ống nghiệm chứa dịch chiết lá trà không với nồng độ khác nhau đã chuẩn bị (nồng độ cuối đạt 10⁵ tế bào/ml). Ủ các nghiệm thức ở 37°C. Sau 24 giờ, hút 100 µl hỗn dịch trải đều trên các đĩa thạch chứa môi trường thích hợp. Ủ các đĩa ở 37°C, sau 24 giờ đếm và ghi nhận số lượng khuẩn lạc trên các đĩa nghiệm thức.

Kết quả và bàn luận

Thu nhận cao chiết lá trà không

Kết quả nghiên cứu cho thấy, ly trích trong dung môi nước cho hiệu suất thu hồi cao chiết nhiều nhất (12,67%) so

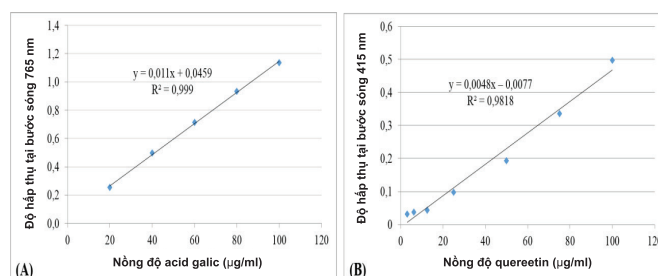
với khi sử dụng dung môi ethanol 70 và 96%, lần lượt đạt 11 và 10,67% (bảng 1).

Bảng 1. Hiệu suất thu hồi các loại cao chiết.

Cao chiết lá trà không	Khối lượng nguyên liệu (g)	Khối lượng cao chiết (g)	Hiệu suất thu nhận (%)
LT-H ₂ O	10	1,267	12,67
LT-Et70	10	1,100	11,00
LT-Et96	10	1,067	10,67

Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng trong cao chiết

Polyphenol là các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên được chứng minh có khả năng kháng oxy hóa hiệu quả. Trong đó, nhóm hợp chất flavanoid có số lượng lớn và được nghiên cứu nhiều nhất trong các hợp chất polyphenol. Trong nghiên cứu này, dựa vào đường chuẩn gallic acid và quercetin cho thấy, hàm lượng phenolic tổng trên mẫu LT-Et96 cao nhất (386,343 mg GAE/g cao chiết), tiếp đến là LT-Et70 (382,327 mg GAE/g cao chiết) và thấp nhất là LT-H₂O (67,423 mg GAE/g cao chiết). Tương tự đối với hàm lượng flavonoid tổng, mẫu LT-Et96 có giá trị (55,073 mg QE/g cao chiết) cao hơn so với kết quả ghi nhận ở LT-Et70 (14,863 mg QE/g cao chiết) và LT-H₂O (5,287 mg QE/g cao chiết) (hình 1, bảng 2).



Hình 1. Mối tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ acid gallic (A) và quercetin (B).

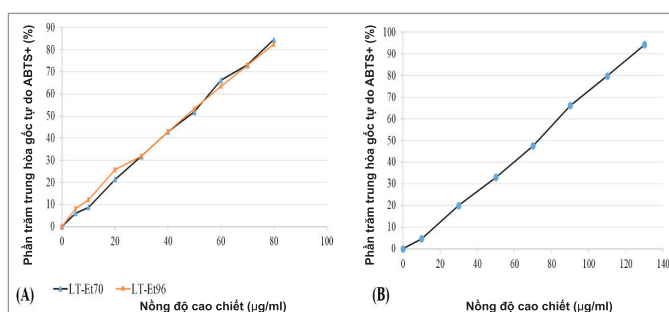
Bảng 2. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng trong các mẫu cao chiết.

Cao chiết	Hàm lượng phenolic tổng (mg GAE/g)	Hàm lượng flavonoid tổng (mg QE/g)
LT-Et96	386,343	55,073
LT-Et70	382,327	14,863
LT-H ₂ O	67,423	5,287

Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺

Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺ là một trong những phương pháp để đánh giá khả năng kháng oxy hóa của các hoạt chất sinh học từ chiết xuất thực vật. Chuẩn bị các dây nồng độ cao chiết 0-80 µg/ml (với cao chiết trong ethanol) và 0-130 µg/ml (với cao chiết trong nước). Phần

trăm ức chế được dựng đường chuẩn và tính giá trị IC_{50} dựa vào đường chuẩn. Theo kết quả hình 2, giá trị IC_{50} trên mẫu LT-H₂O đạt 74,58 μ g/ml cao hơn so với LT-Et70 (47,13 μ g/ml) và LT-Et96 (47,18 μ g/ml). Điều này chứng minh khả năng trung hoà gốc tự do ABTS⁺ của mẫu LT-H₂O kém hơn so với hai mẫu còn lại. Kết quả cho thấy, khả năng kháng oxy hoá có sự tương đồng với hàm lượng phenolic và flavonoid tổng trong các mẫu cao chiết lá trà không được khảo sát. Khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu LT-Et96 đạt kết quả tốt nhất trong ba loại cao chiết.



Hình 2. Phân trăm trung hòa gốc tự do ABTS⁺. (A) Cao chiết trong ethanol; (B) Cao chiết trong H₂O.

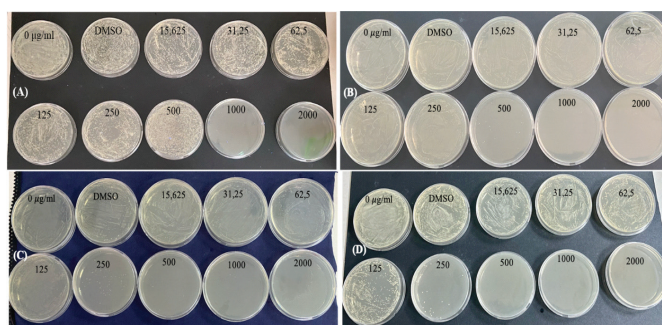
Khả năng kháng vi khuẩn của cao chiết lá trà không

Bước đầu khảo sát khả năng kháng vi khuẩn, nấm bệnh của các loại cao chiết bằng phương pháp khuếch tán qua thạch cho thấy, cao chiết lá trà không với ethanol 96% cho hiệu quả cao nhất. Kết quả được thể hiện qua bán kính vòng ức chế vi khuẩn, nấm bệnh cao gấp 2-6 lần so với 2 mẫu cao chiết ethanol 70% và H₂O (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả kháng vi khuẩn, nấm bệnh của các loại cao chiết khảo sát bằng phương pháp khuếch tán qua thạch.

Cao chiết lá trà không	Bán kính vòng ức chế vi khuẩn, nấm bệnh (mm)			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>C. diphtheriae</i>
LT-H ₂ O	0,33	4,67	3,33	8,33
LT-Et70	3,33	8,67	4,67	10,33
LT-Et96	5,67	8,67	6,67	13,00

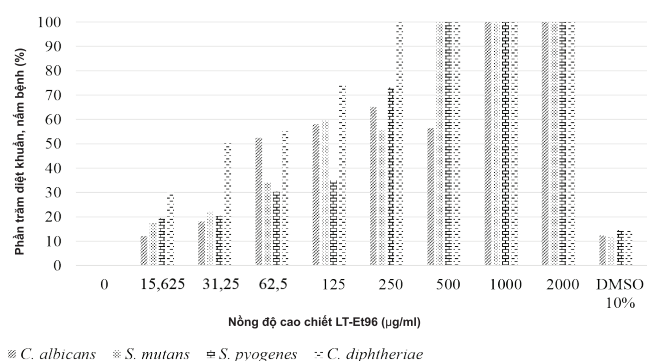
Dựa trên kết quả khảo sát hiệu quả kháng vi khuẩn và nấm bệnh, cao chiết lá trà không với dung môi ethanol 96% được chọn để xác định nồng độ diệt vi khuẩn, nấm tối thiểu (MBC, MFC) trên các tác nhân gây bệnh thử nghiệm. Kết quả ở hình 3 và bảng 4 cho thấy, cao chiết LT-Et96 có hiệu quả diệt vi khuẩn tốt hơn nấm. MFC, MBC là điểm giá trị mà tại đó ghi nhận khả năng diệt 99,9% vi khuẩn và nấm bệnh [11]. Giá trị MFC, MBC của cao chiết LT-Et96 ghi nhận được trên các tác nhân *C. albicans*, *S. mutans*, *S. pyogenes* và *C. diphtheriae* lần lượt là 1000, 500, 500 và 250 μ g/ml (hình 4).



Hình 3. Khả năng diệt vi khuẩn và nấm bệnh của cao chiết LT-Et96 với các nồng độ (μ g/ml) khác nhau. (A) *C. albicans*; (B) *S. mutans*; (C) *S. pyogenes*; (D) *C. diphtheriae*.

Bảng 4. Số lượng khuẩn lạc ở các nghiệm thức thử nghiệm khả năng diệt vi khuẩn và nấm bệnh của cao chiết LT-Et96 theo nồng độ.

Nồng độ cao chiết (ppm)	Số lượng khuẩn lạc (cfu)			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>C. diphtheriae</i>
Đối chứng - H ₂ O 0	812.000	834.000	987.900	1.067.200
15,625	713.000	688.000	794.000	747.200
31,25	665.000	649.000	786.000	529.600
62,5	385.000	551.000	688.000	472.000
125	341.000	336.000	642.000	270.400
250	283.000	369.000	266.000	82
500	354.000	27	72	0
1000	53	0	0	0
2000	0	0	0	0
DMSO 10%	712.000	736.000	844.000	908.000



Hình 4. Phân trăm diệt vi khuẩn, nấm bệnh của cao chiết LT-Et96 ở các nồng độ khác nhau so với nghiệm thức đối chứng.

Bàn luận

Ly trích thu nhận các hợp chất từ thực vật đang là hướng đi tiềm năng ứng dụng trong ngành dược phẩm, mỹ phẩm. Hiệu quả và hàm lượng hoạt chất thu nhận được phụ thuộc

vào nhiều yếu tố như nguồn nguyên liệu, phương pháp ly trích, dung môi sử dụng... Nhằm nâng cao hiệu quả thu nhận hợp chất sinh học, bên cạnh việc sử dụng các phương pháp ly trích truyền thống, nhiều kỹ thuật hiện đại như phương pháp hỗ trợ sóng siêu âm, vi sóng, chiết siêu tới hạn... đang được tiếp cận [6, 7, 12]. Nước và ethanol là hai dung môi xanh được sử dụng phổ biến hiện nay do chúng là nguồn tài nguyên tái tạo, giá thành thấp, có thể phân hủy sinh học và không gây ô nhiễm môi trường. Trong nghiên cứu này, hiệu suất thu nhận cao chiết trong nước (12,67%) cao hơn so với dung môi ethanol. Hiệu suất thu nhận hợp chất sinh học của nước thường cao hơn ethanol do dung môi nước có độ nhớt thấp, sức căng bề mặt nhỏ, khả năng hoà tan rộng nên dịch chiết thu nhận có lẫn nhiều tạp chất. Tuy nhiên, ethanol thường được sử dụng phổ biến hơn để tách chiết các hợp chất polyphenol nhờ tính hoà tan có chọn lọc và hoạt chất ít bị phân hủy trong quá trình cô đặc. Ngoài ra, thành phần các hợp chất (đặc biệt là các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa mạnh như polyphenol) thu nhận với dung môi ethanol cũng đa dạng và phong phú hơn so với nước hay các loại dung môi hữu cơ khác [13, 14]. Trong nghiên cứu này cũng ghi nhận hàm lượng phenolic và flavonoid tổng của cao chiết với ethanol cao hơn so với nước, đặc biệt cao chiết với ethanol 96% cho hàm lượng cao nhất (bảng 2). Trong nghiên cứu này, việc sử dụng sóng siêu âm trong quá trình ly trích cho hàm lượng phenolic và flavonoid tổng của cao chiết với ethanol 96% lần lượt đạt 382,327 mg GAE/g cao chiết và 55,073 mg QE/g cao chiết. Kết quả này cao hơn so với một số nghiên cứu khác khi sử dụng các kỹ thuật truyền thống để thu nhận cao chiết. Trong nghiên cứu của Sazwi và cs (2013) [15], thực hiện ly trích hoạt chất từ lá trà không bằng phương pháp ngâm chiết ghi nhận hàm lượng phenolic tổng đạt 77,20 mg GAE/g cao chiết và giá trị IC_{50} là 179,50 μ g/ml. Arsad và cs (2016) [16] thu nhận tinh dầu lá trà không bằng 2 phương pháp Soxhlet và chiết siêu tới hạn cho thấy, tinh dầu thu nhận bằng phương pháp chiết siêu tới hạn cho kết quả kháng oxy hóa cao hơn. Das và cs (2019) [17] so sánh hiệu quả kháng oxy hóa của cao chiết từ lá trà không bằng 3 phương pháp ngâm dầm, Soxhlet, hỗ trợ sóng siêu âm cho thấy, cao chiết thu nhận có sự hỗ trợ của sóng siêu âm cho kết quả hàm lượng phenolic tổng cao nhất (57,60 mg GAE/g cao chiết) và IC_{50} đạt 5,35 μ g/ml. Phương pháp sử dụng sóng siêu âm được xem là kỹ thuật trích ly nhanh và hiệu quả cho quá trình chiết xuất các hợp chất sinh học từ thực vật. Phương pháp này làm tăng tỷ lệ khuếch tán và cho phép dung môi thâm nhập nhanh hơn vào nguồn nguyên liệu. Ngoài ra, ly trích siêu âm được thực hiện ở nhiệt độ thấp cho phép bảo tồn toàn vẹn hoạt tính sinh học của các hoạt chất sinh học tự nhiên, trong khi chiết xuất ở nhiệt độ cao có thể làm mất tới 70% hoạt tính của các hoạt chất này [18, 19].

Hiệu quả trung hòa gốc tự do ABTS⁺ tương đồng với

hàm lượng phenolic và flavonoid tổng có trong các mẫu cao chiết. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺ của cao chiết với dung môi ethanol cũng tốt hơn so với chiết trong nước. Kết quả trung hòa gốc tự do ABTS⁺ của cao chiết lá trà không khá tốt, giá trị IC_{50} của cao chiết LT-Et70 và LT-Et96 lần lượt đạt 47,13 và 47,18 μ g/ml. Có nhiều phương pháp để đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết thực vật. Mỗi phương pháp sẽ cho những kết quả khác nhau vì sự hiện diện hỗn hợp thành phần các hợp chất có hoạt tính trong cao chiết có thể hiệu quả đối với phương pháp thử nghiệm này nhưng không hiệu quả đối với phương pháp khác [20]. Giới hạn trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺, điều này cũng còn hạn chế và chưa đầy đủ cơ sở để đưa ra kết luận về hiệu quả kháng oxy hóa của các loại cao chiết lá trà không.

Lá trà không hiện nay được sử dụng phổ biến như dược liệu phòng ngừa bệnh về răng miệng. Hợp chất polyphenol từ cao chiết lá trà không có khả năng ức chế một số loại vi khuẩn và nấm gây bệnh trong khoang miệng [4, 21]. Trong nghiên cứu này, các tác nhân gây bệnh được chọn khảo sát thường xuất hiện ở khoang miệng, cổ họng là *C. albicans*, *S. mutans*, *S. pyogenes* và *C. diphtheriae*. Cao chiết LT-Et96 cho kết quả kháng vi khuẩn, nấm bệnh tốt nhất. Bên cạnh phương pháp ly trích, hệ dung môi sử dụng cũng ảnh hưởng lớn đến hoạt tính kháng vi khuẩn của chiết xuất, cao chiết thực vật. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng, khả năng kháng vi khuẩn của các chiết xuất thực vật liên quan đến thành phần, hàm lượng các hợp chất chuyển hóa thứ cấp (tecpenoid, flavonoid, tannin, ancaloid, steroid) và một số hợp chất phenolic cùng các dung môi hữu cơ (ethanol, methanol...) cho thấy khả năng thu hồi lượng lớn các hợp chất này [22-24]. Trong nghiên cứu này, hiệu quả kháng vi khuẩn, kháng nấm bệnh của các loại cao chiết cũng tương đồng với hàm lượng phenolic và flavonoid tổng thu nhận được. Dựa vào kết quả ghi nhận giá trị nồng độ ức chế và diệt tối thiểu, cao chiết từ lá trà không cho thấy hoạt tính ức chế và diệt vi khuẩn tốt hơn trên nấm *C. albicans* (bảng 3, hình 4). Trong nghiên cứu của Nalina và Rahim (2007) [21] cho thấy, hydrochavicol và các acid béo là các thành phần chính trong cao chiết từ lá trà không có khả năng kháng *S. mutans*. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy, cao chiết lá trà không kháng lại *S. mutan* và *C. albican* với giá trị MIC ghi nhận từ 125 đến 2000 μ g/ml [4, 24]. Trong nghiên cứu này, giá trị MFC và MBC của cao chiết LT-Et96 trên các tác nhân *C. albicans*, *S. mutans*, *S. pyogenes* và *C. diphtheriae* lần lượt ghi nhận tại các nồng độ 1000, 500, 500 và 250 μ g/ml (diệt hơn 99,9% vi khuẩn, nấm bệnh [11]). Từ những kết quả ghi nhận được trong nghiên cứu này cho thấy, cao chiết lá trà không trong ethanol 96% thu nhận bằng kỹ thuật có hỗ trợ của sóng siêu âm có tiềm năng ứng dụng trong các sản phẩm hỗ trợ chăm sóc răng miệng.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu nhận cao chiết lá trầu không trong dung môi ethanol và nước bằng phương pháp sử dụng sóng siêu âm. Kết quả cho thấy, cao chiết LT-Et96 cho hàm lượng hoạt chất và hoạt tính sinh học tốt nhất. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng lần lượt đạt 386,34 mg GAE/g cao chiết và 55,07 mg QE/g cao chiết. Khả năng ức chế 50% gốc tự do ABTS⁺ (IC₅₀) ghi nhận ở nồng độ 47,18 µg/ml. Nồng độ diệt nấm và vi khuẩn tối thiểu của cao chiết từ ethanol 96% trên *C. albicans*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *C. diphtheriae* có giá trị lần lượt là 1000, 500, 500 và 250 µg/ml. Các kết quả cho thấy, cao chiết lá trầu không trong ethanol 96% với sự hỗ trợ của sóng siêu âm có tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F. Ferreres, et al. (2014), “*Piper betle* leaves: profiling phenolic compounds by HPLC/DAD-ESI/MSn and anti-cholinesterase activity”, *Phytochemical Analysis*, **25**(5), pp.453-460.
- [2] V. Dwivedi, S. Tripathi (2014), “Review study on potential activity of *Piper betle*”, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **3**(4), pp.93-98.
- [3] Trịnh Thị Trang, Nguyễn Thanh Hải (2016), “Tác dụng ức chế vi khuẩn *in-vitro* của cao khô dịch chiết lá trầu không (*Piper betle*) đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **14**(6), tr.869-876.
- [4] P. Phumat, et al. (2018), “Effects of *Piper betle* fractionated extracts on inhibition of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*”, *Drug Discoveries & Therapeutics*, **12**(3), pp.133-141.
- [5] S. Armenta, et al. (2019), “Green extraction techniques in green analytical chemistry”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **116**, pp.248-253.
- [6] F. Chemat, et al. (2012), “Green extraction of natural products: concept and principles”, *International Journal of Molecular Sciences*, **13**(7), pp.8615-8627.
- [7] L.W. Foo, et al. (2017), “Green extraction of antimicrobial bioactive compound from *Piper betle* leaves: probe type ultrasound-assisted extraction vs supercritical carbon dioxide extraction”, *Chemical Engineering Transactions*, **56**, pp.109-114.
- [8] F.L. Song, et al. (2010), “Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants”, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**(6), pp.2362-2372.
- [9] C.C. Chang, et al. (2002), “Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods”, *Journal of Food and Drug Analysis*, **10**(3), pp.178-182.
- [10] N. Nenadis, et al. (2004), “Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS⁺ assay”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(15), pp.4669-4674.
- [11] P. Parvekara, et al. (2020), “The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*”, *Biomaterial Investigations in Dentistry*, **7**(1), pp.105-109.
- [12] N. Azwanida (2015), “A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation”, *Medicinal & Aromatic Plants*, **4**(196), pp.2167-2412.
- [13] D. Madhavi, D. Salunkhe (1995), *Toxicological Aspects of Food Antioxidants (Food Antioxidants)*, CRC Press.
- [14] D. Stagos (2020), “Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts”, *Antioxidants*, **9**, DOI: 10.3390/antiox9010019.
- [15] N.N. Sazwi, et al. (2013), “Antioxidant and cytoprotective activities of *Piper betle*, *Areca catechu*, *Uncaria gambir* and *Betel quid* with and without calcium hydroxide”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **13**(1), pp.1-12.
- [16] N.H. Arsad, et al. (2016), “Effect of operating conditions of supercritical carbon dioxide on *Piper betle* leave oil yield and antioxidant activity”, *International Journal of Applied Chemistry*, **12**(4), pp.741-751.
- [17] S. Das, et al. (2019), “Effect of different extraction techniques on total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant activity of betelvine and quantification of its phenolic constituents by validated HPTLC method”, *3 Biotech*, **9**(1), DOI: 10.1007/s13205-018-1565-8.
- [18] E. Kiassos, et al. (2009), “Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics”, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **10**(2), pp.246-252.
- [19] Nguyễn Minh Thủy và cs (2018), “Tối ưu hóa các phương pháp trích ly quercetin từ vỏ hành tím”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **12**(97), tr.57-62.
- [20] Nguyễn Trọng Tuấn, Võ Văn Luận (2019), “Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết ethanol Trắc bá diệp (*Thuja orientalis* L.)”, *Tạp chí Công Thương*, **19**, tr.335-340.
- [21] T. Nalina, Z. Rahim (2007), “The crude aqueous extract of *Piper betle* L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans*”, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **3**(1), pp.10-15.
- [22] A.A.M. Ramzi, et al. (2010), “Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **7**, pp.323-330.
- [23] M.A. Rahman, M.S. Islam (2013), “Antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of the phytochemicals of whole *Leucas aspera* extract”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **3**(4), pp.273-279.
- [24] W.F. Sule, et al. (2011), “Phytochemical properties and in vitro antifungal activity of *Senna alata* Linn. crude stem bark extract”, *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(2), pp.176-183.