

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA CAO CHIẾT ETHANOL HẠT XAY NHUNG TRÊN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN GÂY BỆNH

Bùi Thị Kim Lý⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài: 28/3/2022; Ngày phản biện: 03/4/2022; Chấp nhận đăng: 28/4/2022

Liên hệ email: lybtk@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.03.306>

Tóm tắt

Nhiễm khuẩn là một trong những vấn đề lớn lên sức khỏe của con người, bên cạnh đó tình trạng kháng kháng sinh đang dần trở nên cấp bách. Để giải quyết vấn đề trên, có hai xu hướng tiếp cận trong lĩnh vực nghiên cứu là tìm hiểu cơ chế lan truyền tính kháng và tìm ra loại kháng sinh mới. Tính tới hiện tại, số lượng kháng sinh phân lập tự nhiên hiện chiếm ưu thế hơn so với kháng sinh tổng hợp. Mục tiêu của bài nghiên cứu là khảo sát hoạt tính ức chế một số vi khuẩn gây bệnh của cao chiết ethanol hạt xay nhung (*Dialium cochinchinensis* Pierre), loài *Dialium* phân bố đặc thù và quý hiếm tại Tây Nguyên, Việt Nam. Phương pháp tiến hành gồm hai giai đoạn là khảo sát độ nhạy của vi khuẩn gây bệnh với cao chiết hạt xay bằng thí nghiệm khuếch tán được liệu trong đĩa thạch sau đó xác định nồng độ MIC và MBC bằng phương pháp pha loãng được liệu và tái hoạt hoá vi khuẩn trên thạch. Dịch chiết hạt xay cho thấy khả năng kháng mạnh với các chủng vi sinh gram dương với MIC (mg/mL) đối với *S. aureus* 6538; *S. aureus* 25923; *R. equi* 6939; *B. cereus* 46 và *L. monocytogenes* 13932 lần lượt là 3,13; $4,17 \pm 1,04$; $2,60 \pm 0,52$; $0,59 \pm 0,11$; $4,17 \pm 1,04$.

Từ khóa: *Dialium cochinchinensis*, kháng khuẩn, khuếch tán đĩa thạch, MIC

Abstract

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Dialium cochinchinensis* Pierre ETHANOL EXTRACT

Bacterial infections are a major cause of pathogens in humans. Additionally, antibiotic resistance has become a growing concern. Two approaches have been proposed to address these issues: investigating the mechanism of resistance transmission and developing new antibiotics. The purpose of this study was to determine the lethality of *Dialium cochinchinensis* ethanol seed extract against a variety of pathogenic bacteria. The agar diffusion assay was used to determine the bacterial sensitive and then the MIC and MBC were determined. The seed extract demonstrated a high level of resistance to gram-positive microorganisms, with MIC (mg/mL) values of 3,13; $4,17 \pm 1,04$; $2,60 \pm 0,52$; $0,59 \pm 0,11$; $4,17 \pm 1,04$ for *S. aureus* 6538; *S. aureus* 25923; *R. equi* 6939; *B. cereus* 46 và *L. monocytogenes* 13932, respectively.

1. Đặt vấn đề

Cây xay nhung có tên khoa học là *D.cochinchinensis* Pierre là một loài cây phân bố chuyên biệt tại khu vực Tây Nguyên Việt Nam, cây được đưa vào sách đỏ từ năm 1996 và hiện đang được bảo vệ tại khu bảo tồn sinh quyển Kon Chư Răng (Đỗ Huy Bích và nnk., 2006; Hợp, 1997). Các bộ phận của cây xay từ lâu đã được khai thác phục vụ cho nhu cầu đời sống của con người như để lấy gỗ, làm thực phẩm và làm thuốc chữa nhiều bệnh ở người bao gồm cả những bệnh lý do vi sinh vật như tiêu chảy, kháng nấm (Đỗ Huy Bích và nnk., 2006). Vì tính chất phân bố đặc thù, hiện chưa có nhiều nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn trên đối tượng này được thực hiện so với các đối tượng cùng chi khác mà điển hình là *Guineense*. Các nghiên cứu trên đối tượng *Guineense* cho thấy khả năng kháng khuẩn mạnh của cao chiết từ nhiều bộ phận của cây như vỏ thân, vỏ quả, lá và hạt (Ajiboye và nnk., 2018; Okeke và nnk., 2016). Hoạt tính kháng khuẩn cũng được ghi nhận trên nhiều đối tượng cùng chi trong các nghiên cứu khác như *Ovoideum* Thwaites (Bulugahapitiya và nnk., 2020), *Indum* (I và nnk., 2016), *Angolense* Welw. Ex Oliv và nnk. (2020).

Các nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn luôn được coi trọng vì nhiễm khuẩn là một trong những vấn đề phổ biến và gây ảnh hưởng hàng đầu lên sức khỏe của con người (Moghadamtousi và nnk., 2014). Theo WHO, hiện nay tình trạng nhiễm trùng bệnh viện cùng với sự kháng kháng sinh đang dần trở nên nghiêm trọng mà cả thế giới đang phải đối mặt, con người có thể phải chịu thời kì hậu kháng kháng sinh khi mà tình trạng đa kháng lan rộng và các vết thương nhỏ khi đó cũng có thể trở thành nguyên nhân gây tử vong. Ước tính đến 2050 sẽ có khoảng 10 triệu người chết do nhiễm vi sinh kháng kháng sinh (Hutchings và nnk., 2019). Đối mặt với vấn đề nổi cộm nêu trên, có hai xu hướng tiếp cận trong lĩnh vực nghiên cứu là tìm hiểu về sự kháng thuốc và quá trình lan truyền tính kháng trong quần thể vi khuẩn, hướng tiếp cận còn lại là tập trung tìm kiếm các nguồn cung cấp kháng sinh mới (Obolski và nnk., 2015). Với hơn 100 năm nghiên cứu và phát triển kể từ lần đầu tiên kháng sinh được đưa vào sử dụng, hiện chỉ khoảng 122 loại kháng sinh được ít nhất một quốc gia liệt kê trong cơ sở dữ liệu thuốc thiết yếu toàn cầu (Global Essential Medicines), trong đó phần lớn là kháng sinh có nguồn gốc từ tự nhiên (Adekoya và nnk., 2021; Hutchings và nnk., 2019). Có sự chênh lệch đáng lo ngại trong tốc độ kháng kháng sinh phát sinh trong quần thể vi khuẩn và tốc độ tìm ra thuốc kháng sinh mới được ứng dụng (Ventola, 2015). Trong những năm gần đây, các nghiên cứu tìm kiếm kháng sinh mới đang được chú ý phát triển, giai đoạn từ 2017 đến 2021 có 25 loại kháng sinh mới được phát hiện với 398 bài báo trên Medline, 43 bài báo trên Science Direct cùng 131 bài báo cáo thử nghiệm lâm sàng (Al-Tawfiq và nnk., 2021). Như đã đề cập, cây xay nhung được sử dụng trong y học dân tộc để chữa trị các bệnh liên quan tới vi khuẩn cùng với các dữ liệu khoa học về hoạt tính kháng khuẩn ghi nhận từ các cây cùng chi khác cho thấy khả năng cao trong việc ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn từ xay nhung. Trong bài báo cáo này, cao chiết ethanol hạt xay nhung được tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế lên sự phát triển của một số chủng vi khuẩn gây bệnh thông thường.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị cao chiết

Cao chiết hạt xay nhưng (*D.cochinchinensis* Pierre) được thu nhận bằng phương pháp ngâm dầm bột khô nghiền từ hạt xay trong ethanol 96% (tỉ lệ 1:10 w/v) trong 4 ngày sau đó cô quay chân không ở 45°C để loại bỏ dung môi. Cao chiết được hoà tan lại trong ethanol để tiến hành các thí nghiệm.

2.2. Chứng vi khuẩn và hoạt hoá sinh khối vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được sử dụng cho khảo sát bao gồm các chủng vi khuẩn gram dương: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (SA38), *S. aureus* ATCC 25923 (SA23), *Rhodococcus equi* ATCC 6939 (RE39), *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 (LM32), *Bacillus cereus* phân lập (BC46); Các chủng vi khuẩn gram âm: *Proteus mirabilis* ATCC 25933 (PM33), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (CF90), *Salmonella enterica* ATCC 14028 (SE28), *Escherichia coli* ATCC 8739 (EC39), *E. coli* ATCC 25922 (EC22); chủng vi sinh kháng thuốc: *S.aureus* kháng methicillin phân lập từ bệnh viện đại học Y dược Tp.Hồ Chí Minh (MRSA).

Vi khuẩn được hoạt hoá và nuôi cấy lắc trong môi trường TSB (Acumedia, Mỹ) qua đêm trước khi tiến hành các thí nghiệm. Dịch sinh khối được hiệu chỉnh về mật độ 10^8 CFU/ml tương đương với độ đục chuẩn 0.5 Mc Farland để sử dụng cho các thí nghiệm. (Donay và nnk., 2007).

2.3. Khảo sát khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Môi trường đĩa thạch MHA (HiMedia, Ấn Độ) được lựa chọn sử dụng cho thí nghiệm với bề dày môi trường thạch đạt 2/3 chiều cao đĩa petri. Sinh khối đã hoạt hoá ở 10^8 CFU/ml được trải đều lên bề mặt đĩa thạch bằng tăm bông cấy vô trùng. Sau khi sinh khối khô trên bề mặt thạch, tiến hành tạo giếng mẫu có kích thước đường kính Ø6mm bằng dụng cụ đục giếng vô trùng. Mỗi đĩa môi trường được nạp mẫu vào 4 giếng gồm: dịch chiết ở nồng độ 150mg/ml, 100mg/ml, 50mg/ml và 0mg/ml. Sau 20 giờ ủ ở 35°C, kích thước vòng ức chế được tính là hiệu của đường kính vùng không có vi khuẩn mọc trừ cho đường kính giếng thử nghiệm là 6mm.

2.4. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration – MIC) được thực hiện trên các chủng vi khuẩn được xác định là nhạy cao với cao chiết từ thí nghiệm khuếch tán đĩa thạch. Thí nghiệm tiến hành bằng phương pháp pha loãng được liệu trong môi trường MHB (HiMedia - Ấn Độ) (Elshikh và nnk., 2016). Dịch sinh khối hoạt hoá được hiệu chỉnh nồng độ 10^5 CFU/ml bằng môi trường MHB. Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa 96 giếng vô trùng với thành phần mỗi nghiệm thức gồm 50µl cao chiết các nồng độ và 50µl dịch sinh khối ở 10^5 CFU/ml. Đối chứng dương là ampicillin, đối chứng âm là môi trường MHB. Hỗn hợp dịch sinh khối với cao chiết được tiến hành ủ ở 35°C trong vòng 20 giờ trước khi ủ với 30µl resazurin 0,02% trong 30 phút. Kết quả MIC được ghi nhận là nồng độ thấp nhất mà resazurin chưa chuyển màu.

2.5. Xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (minimal bactericidal concentration – MBC) được xác định là nồng độ mà tại đó 99,9 % vi khuẩn bị chết dưới tác động của cao chiết (Wiegand và nnk., 2008). Thí nghiệm được phát triển từ thí nghiệm xác định MIC, theo đó tất cả sinh khối từ các giếng mà resazurin chưa chuyển màu được trải riêng lẻ lên các đĩa thạch môi trường TSA (Acumedia, Mỹ) và ủ 35°C trong vòng 20 giờ. Nồng độ MBC được xác định là nồng thấp nhất mà số khuẩn lạc ít hơn 10 (Sutton, 2011).

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp độc lập. Các phương pháp thống kê, so sánh được tiến hành trên phần mềm Graphpad Prism phiên bản 9.0.0. với giá trị alpha là 0,05. Kết quả được biểu hiện dưới dạng trung bình cộng kết quả và độ lệch chuẩn.

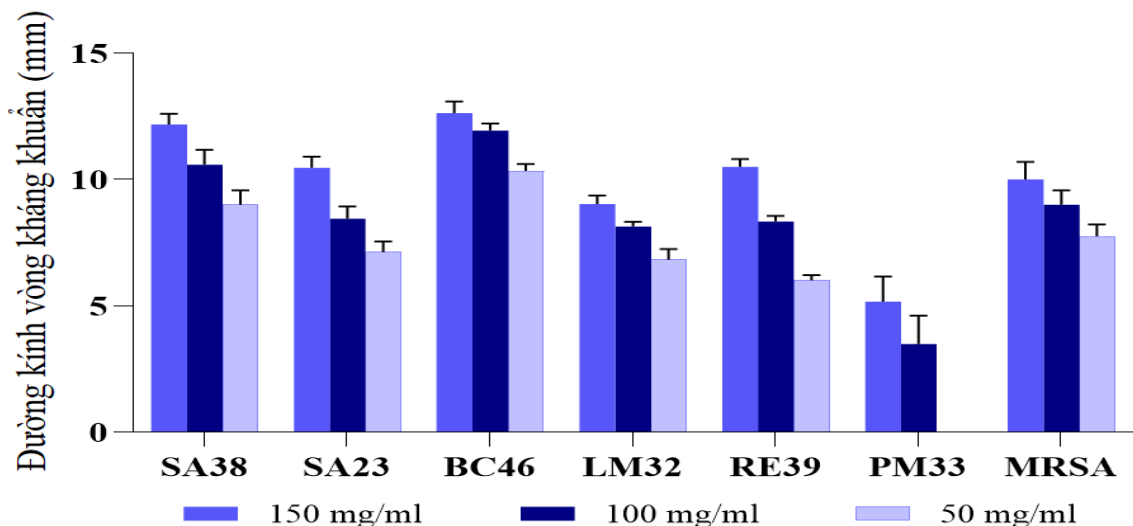
3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Tác động ức chế của cao chiết hạt xay lên các chủng vi khuẩn thử nghiệm



Hình 1. Kết quả vòng ức chế ghi nhận trên các chủng gram dương: BC46, LM32, RE39 và các chủng gram âm: PM33, SE28, EC39. Nồng độ cao chiết: 150 mg/ml (1), 100mg/ml (2), 50 mg/ml (4) và chứng âm (3). *R. equi* ATCC 6939 (RE39), *L.monocytogenes* ATCC 13932 (LM32), *B. cereus* phân lập (BC46), *P. mirabilis* ATCC 25933 (PM33), *S. enterica* ATCC 14028 (SE28), *E. coli* ATCC 8739 (EC39)

Mẫu cao chiết bổ sung vào các giếng sẽ khuếch tán trong thạch agar đã được cấy khuẩn trên bề mặt. Tác động ức chế tăng sinh vi khuẩn được ghi nhận khi xuất hiện các vòng ức chế tăng sinh xung quanh giếng từ đó phản ánh khả năng kháng khuẩn của cao chiết lên chủng vi khuẩn đang thử nghiệm. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn gram dương thể hiện tính nhạy cảm với cao chiết trong khi đó hầu hết các chủng gram âm không xuất hiện vòng ức chế trừ PM33. Vòng ức chế càng lớn cho thấy tác động cao chiết lên sự phát triển của vi khuẩn càng mạnh mẽ. Hình 1 ghi nhận lại kết quả quan sát vòng ức chế của 6/10 chủng thử nghiệm và cho thấy sự khác biệt cảm quan rõ ràng về tác động của cao chiết đối với các chủng gram dương so với các chủng gram âm. Cũng như các chất kháng sinh, các hợp chất kháng khuẩn cần xâm nhập vào trong tế bào để thực hiện được hoạt tính sinh học của mình và thường theo hai cách là thông qua màng lipid đối với các chất kỵ nước hoặc thông qua kênh thẩm thấu đối với các chất ưa nước. Cấu trúc màng ngoài xuất hiện ở vi khuẩn gram âm là lớp kép phospholipid và lipopolysaccharides (LPS) có cấu trúc bất đối xứng và có tính kỵ nước cao hơn nhiều so với các lớp phospholipid điển hình, tính kỵ nước tạo nên do tương tác mạnh của các LPS kém lưu động cùng với cấu trúc vùng lõi LPS cung cấp một rào cản để ngăn chặn sự xâm nhập của các chất kháng khuẩn kỵ nước. Ngoài ra, sự thay đổi trong chức năng của các phân tử porin trên màng ngoài cũng cho thấy sự giảm thẩm thấu đáng kể đối với các chất kháng khuẩn tan trong nước ở vi khuẩn gram âm kháng kháng sinh (Delcour, 2009). Nghiên cứu trước đây trên cao chiết hạt của cây cùng chi là *D. guineense* cho thấy nồng độ MIC vượt mức 200 mg/ml trên các chủng vi khuẩn gram âm (Ajiboye và nnk., 2018).



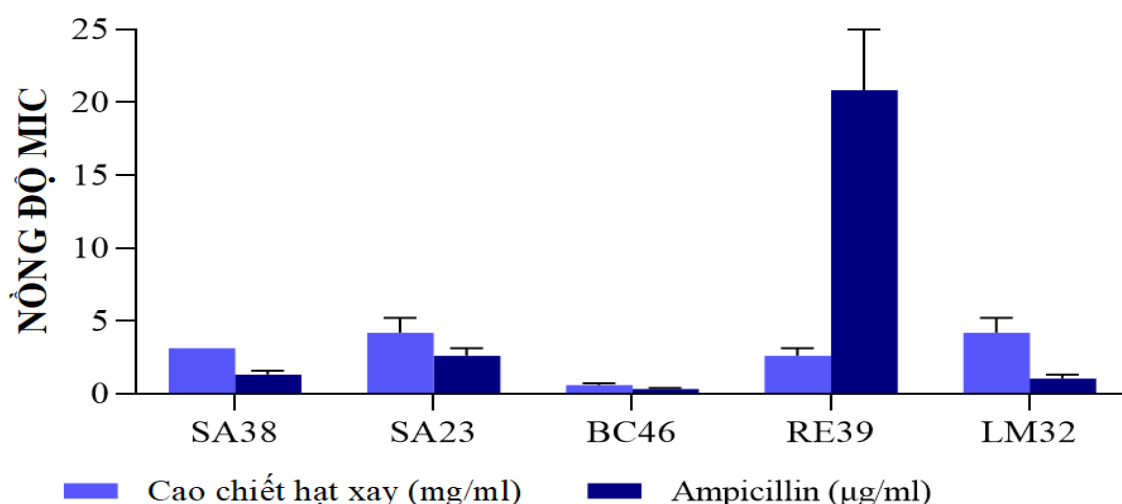
Hình 2. Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn ghi nhận được ở các chủng nhạy cảm với cao chiết hạt xay. *S. aureus* ATCC 6538 (SA38), *S. aureus* ATCC 25923 (SA23), *R. equi* ATCC 6939 (RE39), *L. monocytogenes* ATCC 13932 (LM32), *B. cereus* (BC46), *P. mirabilis* ATCC 25933 (PM33), *S. aureus* kháng methicillin (MRSA).

Tác động của cao chiết lên các chủng vi khuẩn được xác định thông qua phạm vi gây ức chế tăng sinh, phạm vi này được số hoá thông qua đo đặc đường kính vòng kháng

khuẩn không bao gồm đường kính giếng mẫu. Một kết quả đáng chú ý là khả năng vượt qua tính kháng methicillin của cao chiết hạt xay trên chủng MRSA với đường kính vòng kháng khuẩn ở nồng độ 50, 100 và 150 mg/ml lần lượt là $7,75 \pm 0,48$; $9,00 \pm 0,58$ và $10,00 \pm 0,71$. *S. aureus* là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây ra nhiễm trùng máu, việc nhiễm MRSA làm tăng cao tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân ung thư máu so với bệnh nhân nhiễm *S. aureus* nhạy methicillin (Nam và nnk, 2019). Theo thống kê có hơn 60% ca nhiễm *S. aureus* tại Việt Nam được xác định là MRSA và con số này rơi vào khoảng 37% khi xác định trên ca nhiễm trùng máu (Nam và nnk., 2019).

Kết quả kiểm định one-way anova dữ liệu thuộc các nghiệm thức cao chiết nồng độ 150mg/ml cho thấy có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê trong tác động của cao chiết hạt xay lên các chủng có xuất hiện vòng kháng khuẩn với p-value < 0,0001. Kết quả so sánh hậu định cho thấy tác động của cao chiết lên BC46 và SA38 là mạnh nhất song không có sự khác biệt mang tính thống kê trong tác động của cao chiết hạt xay lên hai chủng này, p-value = 0,95 > alpha = 0,05. Tác động ức chế của cao chiết lên PM33 được ghi nhận là thấp nhất. Trước đây trên hoạt động ức chế tăng sinh lên *S. aureus* cả chủng nhạy và kháng methicillin cũng được ghi nhận trên đối tượng cùng chi là *D. ovoideum* (Bulugahapitiya và nnk., 2020). Chủng PM33 là chủng gram âm duy nhất thể hiện tính nhạy với cao chiết. Trong ghi nhận của Adeyinka và cộng sự về MIC của cao chiết hạt xay cùng chi *D. guineense* lên *Proteus mirabilis* là 150mg/ml và 200mg/ml đối với cao chiết methanol và ethanol với kích thước vòng kháng khuẩn ghi nhận từ 4-6mm tương tự như kết quả trong bài nghiên cứu này (Ajiboye và nnk., 2018).

3.2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)



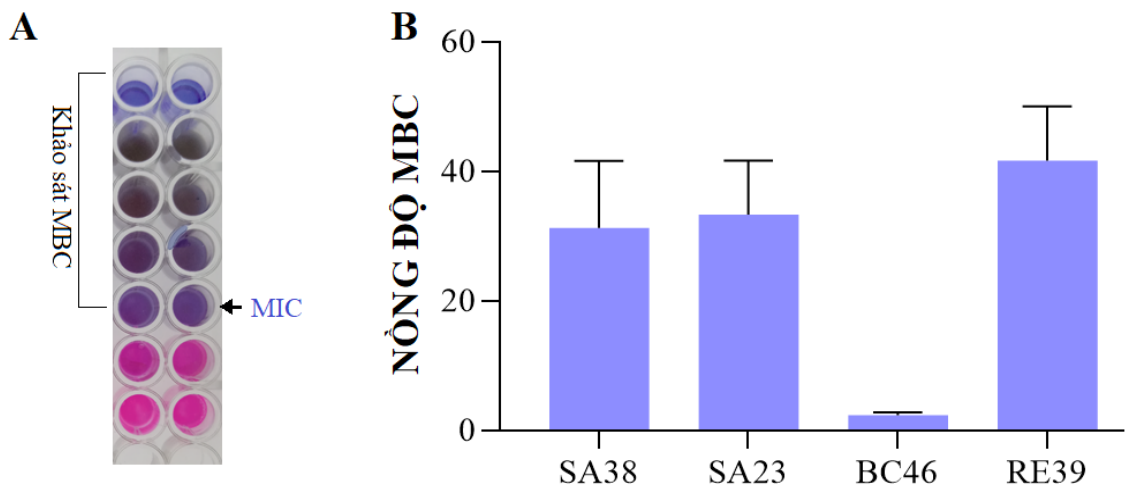
Hình 3. Kết quả giá trị MIC của cao chiết hạt xay và chủng dương lên các chủng vi khuẩn thử nghiệm: *S. aureus* ATCC 6538 (SA38), *S. aureus* ATCC 25923 (SA23), *R. equi* ATCC 6939 (RE39), *L. monocytogenes* ATCC 13932 (LM32), *B. cereus* (BC46)

Các chủng vi khuẩn thể hiện tính nhạy cảm cao với cao chiết hạt xay được tiến hành xác định nồng độ ức chế tối thiểu sau 20 giờ tiếp xúc với cao chiết. Trong thí nghiệm này,

thuốc nhuộm resazurin được sử dụng như chất chỉ thị khả năng sống hoặc chết của quần thể sinh khối vi khuẩn. Thuốc thử resazurin lần đầu tiên được Pesch và Simmert (1929), là một chất nhận điện tử nên có thể phát hiện hoạt động của ty thể và các phản ứng sinh hoá trong tế bào chất của tế bào sống vì vậy cho phép phát hiện tình trạng sống chết của cả tế bào nhân sơ và nhân thực (Rampersad, 2012). Dựa trên sự chuyển màu của resazurin từ xanh sang hồng trong dịch sinh khối, nồng độ MIC (mg/ml) được xác định cụ thể là $3,13; 4,17 \pm 1,04; 2,60 \pm 0,52; 0,59 \pm 0,11; 4,17 \pm 1,04$ lần lượt cho SA38; SA23; RE39; BC46 và LM32. Ampicillin được dùng làm đối chứng dương cho thí nghiệm đồng thời kiểm tra tính đúng của thí nghiệm thông qua giá trị MIC ghi nhận. Kết quả giá trị MIC của Ampicillin phù hợp với các nghiên cứu trước đó (Hình 3).

Kết quả MIC đại diện cho dịch chiết hạt xay trong ethanol khi tiến hành so sánh hoạt tính kháng khuẩn với các loại dịch chiết dược liệu khác trên cùng đối tượng. Có sự khác biệt trong giá trị nồng độ MIC của cao chiết hạt xay lên các vi khuẩn thử nghiệm, $p\text{-value} < 0,001$. Chủng BC46 chịu tác động mạnh nhất từ cao chiết với $p\text{-value} = 0,04 < \alpha = 0,05$. Chủng BA23 và LM32 có giá trị MIC cao nhất và có giá trị MIC trung bình như nhau. Hiệu quả tác động ghi nhận thông qua giá trị nồng độ được xem xét là kém hoạt động hơn so với đối tượng cùng chi là *D. angolense* khi được thử nghiệm trên các chủng vi khuẩn tương tự (V và nnk., 2020).

3.3. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)



Hình 4. Kết quả nồng độ MBC của cao chiết hạt xay lên các chủng thử nghiệm.:

S. aureus ATCC 6538 (SA38), *S. aureus* ATCC 25923 (SA23),
R. equi ATCC 6939 (RE39), *B. cereus* (BC46)

Bên cạnh việc đánh giá tác động ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn, tác động diệt khuẩn cũng cần được chú ý. Để xác định được giá trị MBC, sinh khối từ nghiệm thức MIC được tái hoạt hoá trên môi trường hoạt hoá vi khuẩn (Hình 4A). Giá trị MBC cũng là một giá trị có ý nghĩa trong việc đánh giá và so sánh dược liệu về khả năng gây chết tế bào vi sinh vật. Giá trị MBC (mg/ml) của cao chiết hạt xay lên các chủng RE39; BC46;

SA38 và SA23 lần lượt được nghi nhận là $41,67 \pm 8,33$; $2,34 \pm 0,45$; $31,25 \pm 10,83$ và $33,33 \pm 8,33$. Đối với LM32 có MBC tương đối cao vượt ngưỡng thử nghiệm $>50\text{mg/mL}$ cho thấy khả năng gây chết của dịch chiết hạt xay lên đối tượng này là hạn chế. Nồng độ MBC của ampicillin cũng được xác định trong khoảng từ 3,39 đến 10,42 ($\mu\text{g/mL}$) cho các chủng thử nghiệm ngoại trừ RE39, nồng độ MBC của ampicillin của RE là cao hơn ngưỡng thử nghiệm tại $25\mu\text{g/mL}$. Trước đó giá trị MBC của ampicillin lên các chủng *R.equi* đạt cao nhất ở ngưỡng $128\mu\text{g/mL}$ (Giacometti và nnk., 2005).

Kết quả phân tích thống kê giá trị MBC bằng kiểm định Turkey cho thấy BC46 là chủng chịu tác động mạnh mẽ nhất từ dịch chiết hạt xay với $P \text{ value} = 0,025 < \alpha = 0,05$. Kết quả này cho thấy tính không tương đồng so với kết quả phân tích giá trị MIC đồng thời cho thấy một khía cạnh khác trong sự tác dụng của một loại dược liệu lên các chủng vi sinh vật về hoạt tính ức chế tăng trưởng và hoạt tính diệt khuẩn. Khoảng cách nồng độ giữa MIC và MBC có sự khác biệt và phụ thuộc vào đối tượng cũng như cao chiết thử nghiệm. Cao chiết ethanol hạt xay thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh lên các chủng vi khuẩn gram dương thử nghiệm thể hiện thông qua giá trị nồng độ ức chế và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu thấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Adekoya, I., Maraj, D., Steiner, L., Yaphe, H., Moja, L., Magrini, N., . . . Persaud, N. (2021). Comparison of antibiotics included in national essential medicines lists of 138 countries using the WHO Access, Watch, Reserve (AWaRe) classification: a cross-sectional study. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(10), 1429-1440.
- [2] Ajiboye, A., Kola, B., Rachael, A., Ajuwon, B., Adebobola, O., & Ugochinyere, I. (2018). Antibacterial Activity of the seed of *Dialium guineense* against Selected Enteric Bacteria. *Covenant Journal of Physical and Life Sciences (CJLP)*, 6 (2): 1-10. 6, 1-10.
- [3] Al-Tawfiq, J. A., Momattin, H., Al-Ali, A. Y., Eljaaly, K., Tirupathi, R., Haradwala, M. B., . . . Schlagenhauf, P. (2021). Antibiotics in the pipeline: a literature review (2017-2020). *Infection*, 1-12.
- [4] Bulugahapitiya, V. P., Tn, R., Wmdgb, W., & Hc, M. (2020). Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Dialium ovoideum* thwaites, an endemic plant in Sri Lanka. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 6(2), 316-320.
- [5] Delcour, A. H. (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1794(5), 808-816.
- [6] Donay, J. L., Fernandes, P., Lagrange, P. H., & Herrmann, J. L. (2007). Evaluation of the Inoculation Procedure Using a 0.25 McFarland Standard for the BD Phoenix Automated Microbiology System. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12), 4088-4089.
- [7] Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, . . . Toàn, T. (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập I*. Nxb Khoa Học và Kỹ Thuật.
- [8] Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38, 1015-1019.

- [9] Giacometti, A., Cirioni, O., Kamysz, W., Silvestri, C., Del Prete, M. S., Licci, A., . . . Scalise, G. (2005). In vitro activity of citropin 1.1 alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 410-412.
- [10] Hợp, T. (1997). *100 loài cây bản địa tại Tây Nguyên*.
- [11] Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.
- [12] I, I. K., V.I.E, A., & I, A. C. (2016). Antimicrobial Analysis and Structural Elucidation Of Active Compounds Of *Dialium Indum* Leaves Extract (Valvet Tamarind). *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, 6(12), 237-244.
- [13] Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). Antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int*, 2014, 186864.
- [14] Nam, L. V., Quyet, D., Hung, P. N., Tien, T. V., Thanh, K. C., Dung, Q. A., . . . Pho, D. C. (2019). Antibiotic Resistance Profile and Methicillin-Resistant Encoding Genes of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bloodstream Infection Patients in Northern Vietnam. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 7(24), 4406-4410.
- [15] Obolski, U., Stein, G. Y., & Hadany, L. (2015). Antibiotic Restriction Might Facilitate the Emergence of Multi-drug Resistance. *PLoS computational biology*, 11(6), e1004340-e1004340.
- [16] Okeke, N. C., Udeani, T. K., & Onyebuchi, U. L. (2016). Wound-healing and antimicrobial properties of dichloromethane fraction of *Dialium guineense* (Wild) fruit coat. *Res Pharm Sci*, 11(3), 219-226.
- [17] Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(9), 12347-12360.
- [18] Sutton, S. (2011). Accuracy of Plate Counts *JOURNAL OF VALIDATION TECHNOLOGY*, 17(3), 42-46.
- [19] V, B., S, B., Philippe, O., Kahumba, B., Duez, P., & Jb, L. (2020). Antimicrobial, antioxidant activities and toxicity on *Cavia porcellus* of *Dialium angolense* Welw. Ex Oliv, a traditional medicinal plant from Bagira in Eastern of DR Congo. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 13, 166-180.
- [20] Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277-283.
- [21] Wiegand, I., Hilpert, K., & E W Hancock, R. (2008). *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substance* (Vol. 3).