

KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG POLYPHENOL, HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA VÀ KHÁNG KHUẨN TRÊN VI KHUẨN *Escherichia coli* ATCC 25922 CỦA MỘT SỐ LOÀI THẢO DƯỢC

Nguyễn Thị Thanh Hà¹, Lê Phương Hồng Thủy¹, Nguyễn Văn Thanh¹, Nguyễn Thị Thu Hằng¹,
Đào Văn Cường², Nguyễn Văn Cường³, Nguyễn Huy Thái³, Nguyễn Thanh Hải^{4*}

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Cục Chế biến và Phát triển Thị trường Nông sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn

³Trung tâm Nghiên cứu Chó nghiệp vụ PDS, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

⁴Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nthaicnsh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 30.06.2021

Ngày chấp nhận đăng: 29.10.2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định hàm lượng polyphenol tổng số, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của dịch chiết từ các loài thảo dược gồm cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum*), hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus* Bge), kim ngân (*Lonicera japonica* Thumb), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), lô hội (*Aloe vera*), cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), cỏ hương bài (*Vetiveria zizanioides* L. Nash), tô mộc (*Caesalpinia sappan*), hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.) và sài đất (*Wedelia chinensis* Osb. Merr). Dược liệu được chiết xuất với các dung môi gồm ethanol, methanol và nước nóng, sau đó hòa loãng trong dung dịch Dimethyl Sulfoxide để xác định hoạt tính kháng khuẩn, hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa. Kết quả cho thấy tô mộc, cúc hoa vàng và sài đất có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. coli* ATCC25922 tốt nhất (với đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết ethanol nồng độ 1.000 mg/ml tương ứng là $25,15 \pm 0,45$; $23,25 \pm 0,35$ và $22,35 \pm 0,65$ mm). Đồng thời, đây cũng là các dược liệu có chứa hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất. Cụ thể, hàm lượng polyphenol của dịch chiết tô mộc, cúc hoa vàng và sài đất sử dụng dung môi ethanol tương ứng là $5,817 \pm 0,055$; $5,034 \pm 0,046$ và $4,625 \pm 0,069$ mg axit chlorogenic/100mg dược liệu; trong khi hoạt tính chống oxy hóa tương ứng là $0,512 \pm 0,012$; $0,424 \pm 0,006$ và $0,312 \pm 0,009$ mg Vitamin E/100mg dược liệu.

Keywords: Hoạt tính kháng khuẩn, hàm lượng polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa, dịch chiết, *Escherichia coli*.

The Content, Antioxidant and Antibacterial Activity of Polyphenols of Various Medicinal Plant Species on *Escherichia coli* ATCC 25922

ABSTRACT

Our study aimed to determine the total contents, antioxidant and antibacterial activity of polyphenols of several medicinal plant species, including *Chrysanthemum indicum*, *Astragalus membranaceus* Bge, *Lonicera japonica* Thumb, *Andrographis paniculata*, *Aloe vera*, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, *Vetiveria zizanioides* L. Nash, *Caesalpinia sappan*, *Coptis chinensis* Franch. and *Wedelia chinensis* Osb. Merr. Medicinal materials were extracted with solvents, including ethanol, methanol and hot water, then diluted with dimethyl sulfoxide. The results showed that the extracts of *Caesalpinia sappan*, *Chrysanthemum indicum* and *Wedelia chinensis* Osb. Merr exerted the strongest inhibitory effects against *E. coli* ATCC25922 (the diameters of inhibitory zones of ethanol extracts at 1000 mg/ ml were 25.15 ± 0.45 , 23.25 ± 0.35 and 22.35 ± 0.65 mm, respectively). They also had the highest polyphenol contents and antioxidant activities. Total polyphenol contents of *Caesalpinia sappan*, *Chrysanthemum indicum* and *Wedelia chinensis* Osb. Merr ethanol extracts were 5.817 ± 0.055 , 5.034 ± 0.046 and 4.625 ± 0.069 mg axit chlorogenic/100 mg plant material, respectively, while their antioxidant activities were 0.512 ± 0.012 , 0.424 ± 0.006 and 0.312 ± 0.009 mg vitamine E/100mg plant material, respectively.

Keywords: Antibacterial activity, antioxidant activity, *Escherichia coli*, extracts, polyphenol.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng sinh dùng trong chăn nuôi theo các hướng như phòng bệnh, kích thích miễn dịch không đặc hiệu bảo vệ cơ thể, kích thích tăng trưởng hay chữa bệnh. Tuy nhiên, tác dụng tiêu cực của việc sử dụng kháng sinh với thời gian dài cho động vật, ví dụ như khi sử dụng làm chất bổ sung vào thức ăn, đã được bộc lộ trên rất nhiều mặt, điển hình như yếu tố tồn dư làm phát sinh tính kháng kháng sinh ở vi khuẩn gây bệnh trên người hay tạo ra các sản phẩm chuyển hóa có độc tích lũy trong các thực phẩm tiêu dùng như thịt, trứng, sữa (Alice, 2016). Yêu cầu sản phẩm động vật cung cấp cho người tiêu dùng phải sạch, không chứa tồn dư kháng sinh hay các chất độc hại đã tạo ra xu hướng mới, trong đó có việc sử dụng thảo dược nguồn gốc thiên nhiên để thay thế cho các vai trò truyền thống của kháng sinh trong quy trình chăn nuôi. Việc sử dụng thảo dược được nhiều nhà nghiên cứu kỳ vọng là giải pháp an toàn hơn cho con người, động vật và môi trường, đồng thời lại có các ưu điểm như rẻ hơn, dễ kiểm, dễ chuẩn bị và ít tác dụng phụ (Alice, 2016).

Nhiều nghiên cứu khoa học hiện đại trong thời gian gần đây cũng đã chứng minh được việc bổ sung thảo dược vào thức ăn có tác dụng kích thích miễn dịch, tăng khả năng chống chịu với các bệnh, kích thích sức tăng trưởng và khả năng sản xuất cho nhiều đối tượng vật nuôi. Điều này một phần đến từ tác dụng tích cực của các polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa có trong tế bào thực vật (Alice, 2016). Với các yêu cầu ngày càng cao về việc không có tồn dư kháng sinh hay các chất chuyển hóa độc hại trong sản phẩm động vật để tránh gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng, việc ứng dụng thảo dược trong chăn nuôi không chỉ được coi là giải pháp góp phần tạo ra thực phẩm sạch, mà còn là giải pháp làm cho các thực phẩm chất lượng này trở nên có giá thành phù hợp hơn cho người tiêu dùng hơn, bởi thảo dược vốn được biết đến là là nguồn nguyên liệu sẵn có, dễ tiếp cận và rẻ tiền hơn so với các thuốc tổng hợp (Alice, 2016).

Các loại dược liệu gồm cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum*), hoàng kỳ

(*Astragalus membranaceus* Bge), kim ngân (*Lonicera japonica* Thumb), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), lô hội (*Aloe vera*), cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), cỏ hương bài (*Vetiveria zizanioides* L. Nash), tô mộc (*Caesalpinia sappan*), hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.) và sài đất (*Wedelia chinensis* Osb. Merr) đã được sử dụng để điều trị nhiễm khuẩn, kích thích miễn dịch, tăng cường sức đề kháng, phòng bệnh cho cả người và gia súc (Đỗ Tất Lợi, 1999). Bên cạnh đó, một số nghiên cứu trên thế giới cũng đã bước đầu khẳng định được tiềm năng ứng tác dụng này của cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum*) (Linda & cs., 2012), hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus* Bge) (Hong & cs., 2010), kim ngân (*Lonicera japonica* Thumb) (Sandigawad, 2015), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*) (Yadav & cs., 2016), lô hội (*Aloe vera*) (Babak & cs., 2017), cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) (Zhao & cs., 1991), cỏ hương bài (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) (Peng & cs., 2014), tô mộc (*Caesalpinia sappan*) (Badami & cs., 2004), hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.) (Kim & cs., 2016) và sài đất (*Wedelia chinensis* Osb. Merr) (Balaji & cs., 2016). Đây là các loài cây được liệu phổ biến, sẵn có ở Việt Nam để thu mua và ứng dụng cho mục đích chăn nuôi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.2.1. Dược liệu

Cúc hoa vàng, hoàng kỳ, kim ngân, xuyên tâm liên, lô hội, cam thảo, cỏ hương bài, tô mộc, hoàng liên và sài đất đã qua sơ chế được do công ty dược liệu cổ truyền Bình An (Nghĩa Trai, Hưng Yên) cung cấp. Tất cả các dược liệu trừ hoàng kỳ đều được mua từ các vùng trồng dược liệu tại Việt Nam, với thời điểm thu hoạch và bộ phận dùng theo đúng hướng dẫn của Đỗ Tất Lợi (1999). Riêng dược liệu rễ hoàng kỳ được nhập từ Trung Quốc. Việc định danh dược liệu được xác định bởi PGS. TS. Bùi Thị Tho, thông qua so sánh các tiêu bản đại thể và vi thể với mẫu chuẩn được lưu tại Vườn Dược liệu, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2.2. Vi khuẩn

Vi khuẩn dùng nghiên cứu là chủng vi khuẩn chuẩn *E. coli* ATCC25922, được cung cấp bởi Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Đây là chủng được sử dụng để chuẩn hóa các thí nghiệm về tính miễn cảm và tính kháng thuốc của những vi khuẩn nhóm Enterobacteria (Clinical Laboratory Standards Institute, 2010).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị chiết xuất dược liệu

Mẫu dược liệu sau khi đã xác định chính xác loại, làm khô, nghiền thành bột mịn ($< 0,05\text{mm}$) và đựng trong túi nilon bảo quản trong bình hút ẩm. Bột dược liệu sau đó được chiết với các dung môi có độ phân cực khác nhau thường dùng trong chiết xuất thực vật, bao gồm: ethanol, methanol và nước nóng. Với dung môi hữu cơ, việc chiết xuất được thực hiện theo phương pháp ngâm tại ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ với tỉ lệ bột dược liệu trên dung môi là 1/30. Với dung môi nước nóng, dược liệu được chiết nóng bằng cách trộn bột dược liệu với nước cất đun sôi theo tỉ lệ 1/30 và khuấy trộn bằng máy khuấy từ trong vòng 30 phút trước khi lọc. Các hỗn dịch của dược liệu và dung môi sau đó được li tâm với tốc độ 3.500rpm trong 30 phút và lọc qua giấy lọc để đảm bảo loại bỏ hết cặn. Dịch chiết sau đó được cô quay hút chân không, sử dụng hệ thống Rotavapor R-300 (Buchi, Thụy Sĩ) để loại hết dung môi trong áp suất thấp. Nhiệt độ trong quá trình chiết xuất được đảm bảo luôn $\leq 40^{\circ}\text{C}$. Cao chiết được hòa tan với Dimethyl Sulfoxide (DMSO) theo tỉ lệ 1g dược liệu khô trên 1ml DMSO. Dịch chiết được pha loãng cho đến các nồng độ thử nghiệm tiếp theo bằng dung môi DMSO.

2.2.2. Xác định hàm lượng Polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa

Hàm lượng polyphenol tổng số trong dịch chiết được xác định theo phương pháp của Suda & cs. (2005). Ở các ống thí nghiệm, 0,2ml chất chuẩn axit Chlorogenic (Merck, Đức) hoặc các dịch chiết pha loãng đến nồng độ 20 mg/ml, trộn

với 1ml thuốc thử Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent (Merck, Đức). Để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 3 phút, sau đó mỗi ống được thêm 10% Na_2CO_3 , 5ml nước cất, rồi ủ trong 60 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Mức độ hấp phụ của các ống thí nghiệm được xác định tại bước sóng 750nm bằng máy quang phổ kế (Beam Spectrophotometer LI-294, Lasany). Axit chlorogenic (Merck, Đức) được sử dụng làm chất chuẩn để tính hàm lượng polyphenol tổng số.

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định theo phương pháp của Masuda & cs. (2002), sử dụng cơ chất DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl). Dung dịch DPPH được chuẩn bị bằng trộn 0,1g DPPH với 50ml ethanol 96%. Ở các ống thí nghiệm, 0,2ml chất chuẩn hoặc các dịch chiết pha loãng đến nồng độ 20 mg/ml được trộn với 0,1ml DPPH và 4,8ml dung môi. Mức độ hấp phụ ánh sáng của các ống được xác định tại bước sóng 515nm, với các ống đối chứng âm bao gồm dịch chiết và dung môi DMSO (không có DPPH), ống đối chứng khác chỉ gồm 0,1ml DPPH và dung môi.

Khả năng chống oxy hóa của mẫu thí nghiệm được tính toán theo công thức:

$$\text{AA (\%)} = \frac{A_c - A_s - A_b}{A_c} \times 100$$

Trong đó:

$A_c = A_{\text{control}} = \text{Giá trị mật độ quang (OD) của ống đối chứng}$

$A_s = A_{\text{sample}} = \text{Giá trị mật độ quang (OD) của ống thí nghiệm}$

$A_b = A_{\text{blank}} = \text{Giá trị mật độ quang (OD) của ống blank}$

VTM E (alpha-Tocopherol, Merck, Đức) được sử dụng làm chất chuẩn để tính hoạt tính chống oxy hóa. Theo đó hoạt tính chống oxy hóa của 100mg bột dược liệu được quy đổi tương đương sang số mg vitamine E.

2.2.3. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết trên vi khuẩn *E. coli* ATCC25922

Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn được xác định theo phương pháp khuếch tán trên thạch, sử dụng các ống khâu bằng đồng có

đường kính bên trong lòng ống là 1cm, tiến hành đục 4 giếng sao cho mỗi giếng cách nhau 2-3cm. Sau khi đổ thạch đã được trộn vi khuẩn đến nồng độ 10^6 tế bào vi khuẩn/ml ra đĩa lòng, sử dụng các ống khâu đục 4 giếng trên bề mặt thạch và lần lượt nhỏ vào mỗi giếng 100 μ l dịch chiết tại các nồng độ khác nhau. Đĩa thạch được quan sát sau 24 giờ nuôi ở 37°C. Tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn sẽ được đánh giá thông qua độ lớn của đường kính vòng vô khuẩn tạo ra xung quanh giếng, xác định bằng máy đo độ lớn vòng vô khuẩn (Haloes Caliper - Zone Reader).

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần (tổng số là 90 thí nghiệm cho 30 loại dịch chiết từ 10 được liệu). Môi trường thạch sử dụng là môi trường Muller Hinton Agar (Merck, Đức), loại chuyên dụng cho các thí nghiệm khảo sát tính mẫn cảm của vi khuẩn với các hoạt chất kháng khuẩn. Kháng sinh ampicillin được sử dụng làm đối chứng dương và dung môi DMSO không chứa chất kháng khuẩn được sử dụng làm đối chứng âm khi đánh giá tác dụng ức chế vi khuẩn của dịch chiết được liệu.

2.3. Xử lý số liệu

Kết quả được phân tích bằng phần mềm Statcel software (1998). Hàm phân tích phương

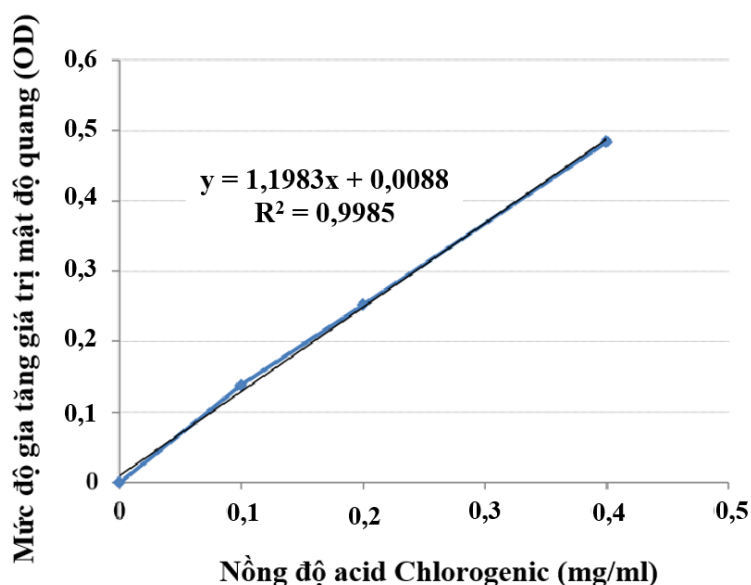
sai đơn giản One-way ANOVA và phương pháp điều chỉnh trị số p sử dụng Tukey *post hoc* test được sử dụng để so sánh các giá trị của đường kính vòng vô khuẩn, hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxi hóa. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê được thiết lập khi $P \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hàm lượng polyphenol tổng số của các dịch chiết được liệu

Axit chlorogenic được sử dụng làm chất chuẩn để quy đổi hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết được liệu. Tiến hành thí nghiệm để thiết lập đồ thị chuẩn giữa nồng độ axit chlorogenic với sự gia tăng giá trị mật độ quang với thuốc thử Folin Ciocalteu (Hình 1).

Kết quả cho thấy có mối quan hệ tương quan thuận giữa hàm lượng axit chlorogenic và mức độ gia tăng giá trị đo mật độ quang được tạo ra khi phản ứng với thuốc thử Folin Ciocalteu, trong đó hệ số xác định R^2 là 0,9985 và P-value <0,001. Hàm tương quan này được sử dụng để quy đổi tương đương mức độ gia tăng giá trị mật độ quang tạo ra bởi các dịch chiết khi phản ứng với thuốc thử Folin Ciocalteu về hàm lượng chất chuẩn axit chlorogenic.



Hình 1. Mối tương quan giữa hàm lượng chất chuẩn axit chlorogenic (mg/ml) với mức độ gia tăng giá trị mật độ quang

Khảo sát hàm lượng polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn trên vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 của một số loài thảo dược

Bảng 1. Kết quả xác định hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết các dược liệu thử nghiệm với 3 dung môi khác nhau

Dược liệu	Dung môi	Hàm lượng polyphenol tổng số (mg axit chlorogenic/100mg dược liệu)
Cúc hoa vàng	Ethanol	5,034 ^a ± 0,046
	Methanol	4,651 ^b ± 0,054
	Nước nóng	3,921 ^c ± 0,071
Hoàng kỳ	Ethanol	1,982 ^a ± 0,075
	Methanol	1,245 ^b ± 0,043
	Nước nóng	0,985 ^c ± 0,027
Kim ngân	Ethanol	3,011 ^a ± 0,043
	Methanol	2,376 ^b ± 0,065
	Nước nóng	1,987 ^c ± 0,061
Xuyên tâm liên	Ethanol	1,331 ^a ± 0,045
	Methanol	1,091 ^b ± 0,064
	Nước nóng	0,772 ^c ± 0,046
Lô hội	Ethanol	1,021 ^a ± 0,025
	Methanol	0,893 ^b ± 0,041
	Nước nóng	0,698 ^c ± 0,026
Cam thảo	Ethanol	1,420 ^a ± 0,045
	Methanol	1,113 ^b ± 0,031
	Nước nóng	0,982 ^c ± 0,016
Hương bài	Ethanol	1,117 ^a ± 0,075
	Methanol	0,973 ^b ± 0,051
	Nước nóng	0,729 ^c ± 0,025
Tô mộc	Ethanol	5,871 ^a ± 0,077
	Methanol	5,201 ^b ± 0,033
	Nước nóng	4,873 ^c ± 0,039
Hoàng liên	Ethanol	2,132 ^a ± 0,055
	Methanol	1,679 ^b ± 0,063
	Nước nóng	1,882 ^{ab} ± 0,047
Sài đất	Ethanol	4,652 ^a ± 0,069
	Methanol	4,109 ^b ± 0,083
	Nước nóng	3,762 ^c ± 0,076

Ghi chú: Các ký tự khác nhau trong hàm lượng polyphenol của cùng một dược liệu nhưng sử dụng 3 dung môi, bao gồm a, b và c được sử dụng để biểu đạt những khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) khi xử lý bằng hàm one-way ANOVA và Tukey post hoc test.

Kết quả thí nghiệm cho thấy tất cả các dược liệu khảo sát đều có chứa polyphenol với hàm lượng khác nhau, phụ thuộc vào loài và dung môi chiết xuất. Hàm lượng polyphenol tổng số thấp nhất là của dịch chiết nước - hương bài ($0,729 \pm 0,025$ mg axit chlorogenic/100mg dược liệu) và cao nhất là của dịch chiết ethanol - tô mộc ($5,871 \pm 0,077$ mg axit chlorogenic/100mg

dược liệu). Trong cả 3 dung môi chiết, cúc hoa vàng, tô mộc và sài đất đều là những dược liệu có hàm lượng polyphenol cao nhất. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu trước đây, trong đó khẳng định cúc hoa vàng (Zheng & cs., 2018), sài đất (Rehana & Nagarajan, 2018) và tô mộc (Nguyen & cs., 2020) là những thảo dược có chứa hàm lượng polyphenol cao.

3.2. Kết quả xác định khả năng chống oxy hóa của các dịch chiết dược liệu

Vitamine E (VTME - Alpha tocopherol) được sử dụng làm chất chuẩn để quy đổi khả năng chống oxy hóa của dịch chiết dược liệu. Đồ thị chuẩn giữa nồng độ VTME với khả năng loại bỏ gốc tự do của DPPH được thể hiện trong hình 2.

Kết quả cho thấy có mối quan hệ tương quan thuận giữa hàm lượng VTME và khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH, với hệ số xác định $R^2 = 0,9994$, P-value <0,001. Hàm tương quan này được sử dụng để quy đổi tương đương khả năng chống oxy hóa của các dịch chiết khảo sát theo hàm lượng chất chuẩn VTME, căn cứ vào khả năng loại bỏ gốc tự do.

Tất cả dịch chiết từ các loại dược liệu đều có hoạt tính chống oxy hóa, ở các nồng độ khác nhau, phụ thuộc loại dược liệu và dung môi chiết xuất (Bảng 2). Khả năng chống oxy hóa yếu nhất là của dịch chiết nước - cam thảo ($0,076 \pm 0,013\text{mg VTME/100mg}$ dược liệu) và cao nhất là của dịch chiết ethanol - tô mộc ($0,512 \pm 0,012\text{mg VTME/100mg}$ dược liệu). Trong cả 3 dung môi chiết, cúc hoa vàng, tô mộc và sài đất đều là những dược liệu có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất. Kết quả thu được này tương tự với các khảo sát trước đây, trong đó khẳng định cúc hoa vàng (Zhu & cs., 2005), sài đất (Darah & cs., 2013) và tô mộc (Badami &

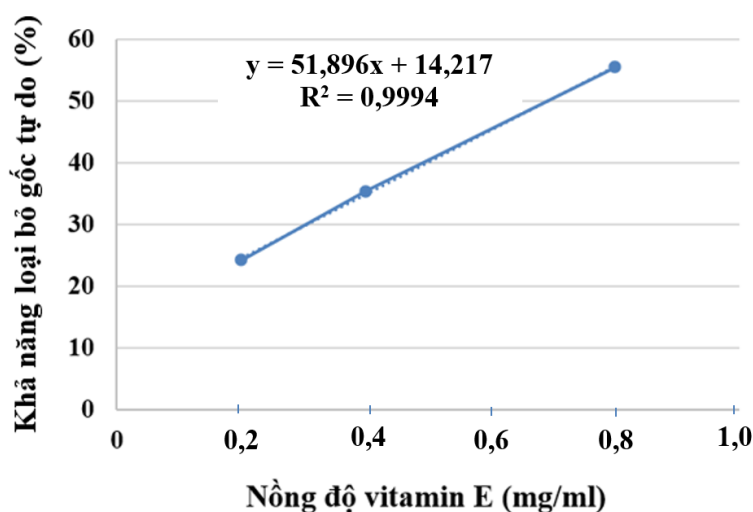
cs., 2003) là những dược liệu có tiềm năng cao về hoạt tính chống oxy hóa.

3.3. Khả năng kháng khuẩn của các dịch chiết dược liệu

Để kiểm chứng độ chính xác của phương pháp thí nghiệm và lựa chọn nồng độ kháng sinh phù hợp để làm đối chứng dương. Ampicillin ở các nồng độ khác nhau đã được sử dụng. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả bảng 3 cho thấy dung dịch kháng sinh ampicillin tạo ra đường kính vòng vô khuẩn trên đĩa thạch nuôi vi khuẩn *E. coli* 25922 với độ lớn tỉ lệ thuận với nồng độ kháng sinh sử dụng. Điều này khẳng định độ chính xác của phương pháp khuếch tán trên thạch được sử dụng. Đồng thời, căn cứ vào kết quả này, chúng tôi quyết định sử dụng kháng sinh Ampicillin tại các nồng độ 32 $\mu\text{g/ml}$ và 64 $\mu\text{g/ml}$ để làm đối chứng dương trong các thí nghiệm đánh giá đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết.

Trong thí nghiệm khảo sát tác dụng kháng khuẩn của dịch chiết dược liệu, kháng sinh ampicillin tại các nồng độ là 64 và 32 $\mu\text{g/ml}$ được sử dụng để làm đối chứng dương, còn dung môi DMSO nguyên chất không có chất kháng khuẩn được sử dụng làm đối chứng âm. Kết quả xác định độ lớn của các đường kính vòng vô khuẩn tạo ra bởi những dịch chiết dược liệu thử nghiệm được chúng tôi thể hiện ở bảng 4 và hình 3.



Hình 2. Mối tương quan giữa hàm lượng chất chuẩn VTM E (mg/ml) và khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH

Khảo sát hàm lượng polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn trên vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 của một số loài thảo dược

Bảng 2. Khả năng chống oxy hóa của các loại dịch chiết

Dược liệu	Dung môi	Hoạt tính chống oxy hóa quy đổi theo mg VTME/ 100mg dược liệu
Cúc hoa vàng	Ethanol	0,424 ^a ± 0,006
	Methanol	0,327 ^b ± 0,014
	Nước nóng	0,284 ^c ± 0,011
Hoàng kỳ	Ethanol	0,153 ^a ± 0,021
	Methanol	0,102 ^b ± 0,015
	Nước nóng	0,086 ^c ± 0,013
Kim ngân	Ethanol	0,276 ^a ± 0,021
	Methanol	0,210 ^b ± 0,018
	Nước nóng	0,178 ^c ± 0,013
Xuyên tâm liên	Ethanol	0,146 ^a ± 0,016
	Methanol	0,112 ^b ± 0,013
	Nước nóng	0,096 ^c ± 0,012
Lô hội	Ethanol	0,126 ^a ± 0,021
	Methanol	0,108 ^{ab} ± 0,011
	Nước nóng	0,086 ^c ± 0,014
Cam thảo	Ethanol	0,115 ^a ± 0,011
	Methanol	0,098 ^b ± 0,012
	Nước nóng	0,076 ^c ± 0,013
Hương bài	Ethanol	0,145 ^a ± 0,011
	Methanol	0,108 ^b ± 0,022
	Nước nóng	0,089 ^c ± 0,015
Tô mộc	Ethanol	0,512 ^a ± 0,012
	Methanol	0,423 ^b ± 0,021
	Nước nóng	0,314 ^c ± 0,020
Hoàng liên	Ethanol	0,115 ^a ± 0,007
	Methanol	0,098 ^{ab} ± 0,012
	Nước nóng	0,079 ^c ± 0,011
Sài đất	Ethanol	0,321 ^a ± 0,009
	Methanol	0,298 ^b ± 0,021
	Nước nóng	0,210 ^c ± 0,019

Ghi chú: Các ký tự khác nhau trong hoạt tính chống oxy hóa của cùng một dược liệu nhưng sử dụng 3 dung môi, bao gồm a, b và c được sử dụng để biểu đạt những khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) khi xử lý bằng hàm one-way ANOVA và Tukey post hoc test.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết phụ thuộc vào các yếu tố gồm: loại dược liệu, nồng độ và dung môi chiết xuất. Đường kính vòng vô khuẩn của các dược liệu khảo sát với vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 dao động trong phạm vi từ 10,00mm đến 25,15mm (dịch chiết ethanol - tô mộc tại nồng độ 1.000 mg/ml). Vì đối chứng âm chỉ có DMSO

không tạo ra tác dụng ức chế sự phát triển (Bảng 4) nên có thể khẳng định đường kính vòng vô khuẩn tạo ra xung quanh các giếng chứa dịch chiết tại các nồng độ khác nhau là do tác dụng của những thành phần có trong dược liệu. Dịch chiết ethanol cho đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất với 6 loại dược liệu là cúc hoa vàng, hoàng kỳ, kim ngân, tô mộc, hoàng liên và sài đất, tại cả

4 nồng độ khảo sát là 1000; 500; 250 và 125 mg/ml (Bảng 4). Với 4 dược liệu còn lại là xuyên tâm liên, lô hội, cam thảo và hương bài, dịch chiết ethanol cho đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất tại các nồng độ 1.000 và 500 mg/ml và cho đường kính vòng vô khuẩn tương đương với dịch chiết methanol và nước tại các nồng độ nhỏ hơn là 250 và 125 mg/ml (Bảng 4). Khi so sánh dung môi methanol và nước, chúng tôi nhận thấy dịch chiết với methanol cho đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn với 6 loại dược liệu là cúc hoa vàng, hoàng kỳ, kim ngân, tô mộc, hoàng liên và sài đất và cho đường kính vòng vô khuẩn tương đương với các dược liệu còn lại là xuyên tâm liên, lô hội, cam thảo và hương bài (Bảng 4). Kết quả thí nghiệm của chúng tôi phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây (Bassam & cs., 2006; Heidari & cs., 2015). Điều này được giải thích là do các hoạt chất có tính kháng khuẩn trong thực vật như các hợp chất polyphenols thường kém tan trong nước hơn so với các dung môi hữu cơ, trong khi hầu hết các thành phần có khả năng ức chế vi sinh vật phát triển của thực vật đã được xác định là có khả năng tan vào các dung môi rượu, bao gồm ethanol và methanol (Cowan, 1999).

Khi so sánh hoạt tính của các dịch chiết dược liệu sử dụng hai dung môi hữu cơ là ethanol và methanol, chúng tôi thấy dịch chiết với ethanol cho đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn dịch chiết methanol trên 8 loại dược liệu, bao gồm: cúc hoa vàng, xuyên tâm liên, lô hội, cam thảo, hương

bài, tô mộc, hoàng liên và sài đất. Tuy nhiên, với 2 dược liệu là hoàng kỳ và kim ngân thì dịch chiết methanol lại cho đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn (Bảng 4). Trên thực tế, hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết với dung môi nào cao hơn là phụ thuộc vào tính tan của các thành phần tạo ra tác dụng có trong từng loại dược liệu đối với mỗi loại dung môi khác nhau và vì thế nó sẽ phụ thuộc vào bản chất của các dược liệu (Cowan, 1999). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các nghiên cứu trước đây. Cụ thể, Sen & Batra (2012) và Do & cs. (2014) khẳng định dịch chiết ethanol có hoạt tính kháng khuẩn cao hơn methanol với một số dược liệu, Lee & cs. (2014) và Thanh Van Nguyen & Hai Thanh Nguyen (2019) cho rằng dịch chiết methanol tạo ra hiệu quả ức chế vi khuẩn mạnh hơn dịch chiết ethanol với một số dược liệu khác. Bên cạnh đó, chúng tôi nhận thấy trong cả 3 dung môi thì cúc hoa vàng, tô mộc và sài đất đều là những dược liệu có hoạt tính phytoncid mạnh nhất, thể hiện ở xu hướng tạo đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất. Ngược lại, các dược liệu xuyên tâm liên, lô hội, cam thảo, hương bài có hoạt tính phytoncid kém nhất, thể hiện ở xu hướng tạo đường kính vòng vô khuẩn nhỏ nhất ở cả 3 dung môi khảo sát. Kết quả thu được này khá tương đồng với các nghiên cứu trước đây, trong đó khẳng định hoạt tính kháng khuẩn mạnh của cúc cúc hoa vàng (Pitinidhipat & Patchanee, 2012), sài đất (Das & cs., 2013) và tô mộc (Srinivasan & cs., 2012).

Bảng 3. Kết quả xác định đường kính vòng vô khuẩn (mm) của kháng sinh ampicillin tại các nồng độ khác nhau

Nồng độ (µg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	Khoảng dao động của đường kính vòng vô khuẩn (mm)
512	32,25 ^a ± 0,25	31,50-33,50
256	30,00 ^b ± 0,50	28,70-31,00
128	28,25 ^c ± 1,75	27,50-28,50
64	27,00 ^c ± 0,50	26,50-27,50
32	21,50 ^d ± 1,50	20,00-23,50
16	19,00 ^{de} ± 1,50	18,00-19,50
8	15,25 ^e ± 0,25	14,50-15,50
4	10,00 ^f ± 0,00	10,00-10,00

Ghi chú: Các ký tự khác nhau trong cột đường kính vòng vô khuẩn, gồm a, b, c, d, e và f được sử dụng để biểu đạt những khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) khi xử lý bằng hàm one-way ANOVA và Tukey post hoc test.

Khảo sát hàm lượng polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn trên vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 của một số loài thảo dược

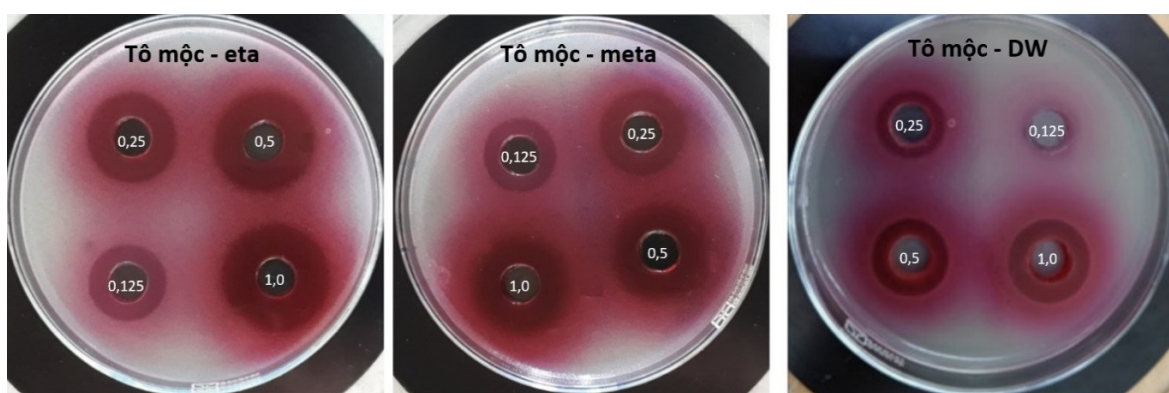
Bảng 4. Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết các dược liệu
(đường kính vòng vô khuẩn - mm)

Dược liệu	Dung môi	Nồng độ dịch chiết (mg/ml)			
		1000	500	250	125
Cúc hoa vàng	Ethanol	23,25 ^a ± 0,35	20,52 ^b ± 1,56	18,75 ^c ± 1,76	17,23 ^c ± 1,41
	Methanol	19,75 ^a ± 0,35	17,51 ^b ± 2,82	15,21 ^{bc} ± 0,70	14,51 ^c ± 0,00
	Nước nóng	21,21 ^a ± 0,20	19,25 ^b ± 0,35	17,54 ^c ± 0,34	16,75 ^c ± 1,06
Hoàng kỳ	Ethanol	15,50 ^a ± 0,70	15,50 ^a ± 0,70	15,21 ^a ± 0,41	14,75 ^b ± 0,35
	Methanol	17,18 ^a ± 0,25	16,25 ^b ± 0,35	16,23 ^b ± 0,36	14,52 ^c ± 0,70
	Nước nóng	13,21 ^a ± 0,24	12,09 ^b ± 0,11	11,27 ^c ± 0,52	10,79 ^c ± 0,26
Kim ngân	Ethanol	18,25 ^a ± 0,35	14,50 ^b ± 0,70	13,21 ^{bc} ± 0,70	11,75 ^c ± 0,35
	Methanol	20,51 ^a ± 2,12	16,42 ^b ± 0,00	15,21 ^{bc} ± 1,41	11,09 ^c ± 1,41
	Nước nóng	16,34 ^a ± 0,20	14,45 ^b ± 0,37	13,58 ^{bc} ± 0,41	11,29 ^c ± 1,41
Xuyên tâm liên	Ethanol	13,34 ^a ± 1,21	11,09 ^{bc} ± 1,02	10,00 ^c ± 0,00	10,00 ^c ± 0,00
	Methanol	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00
	Nước nóng	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00
Lô hội	Ethanol	14,09 ^a ± 0,42	12,82 ^b ± 0,39	10,00 ^c ± 0,00	10,00 ^c ± 0,00
	Methanol	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00
	Nước nóng	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00
Cam thảo	Ethanol	13,78 ^a ± 0,39	11,42 ^b ± 0,79	10,00 ^c ± 0,00	10,00 ^c ± 0,00
	Methanol	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00
	Nước nóng	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00
Hương bài	Ethanol	12,58 ^a ± 0,79	10,92 ^b ± 0,45	10,00 ^b ± 0,00	10,00 ^b ± 0,00
	Methanol	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00
	Nước nóng	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00	10,00 ^a ± 0,00
Tô mộc	Ethanol	25,15 ^a ± 0,45	22,42 ^b ± 1,36	19,75 ^c ± 1,46	18,93 ^c ± 1,31
	Methanol	23,85 ^a ± 0,75	21,71 ^a ± 2,02	18,71 ^c ± 0,34	17,91 ^c ± 0,45
	Nước nóng	21,21 ^a ± 0,20	19,25 ^a ± 0,35	17,54 ^c ± 0,00	16,75 ^c ± 1,06
Hoàng liên	Ethanol	17,21 ^a ± 0,45	16,22 ^b ± 0,78	14,89 ^c ± 0,45	13,27 ^c ± 1,21
	Methanol	16,23 ^a ± 0,23	15,45 ^{ab} ± 0,67	13,78 ^b ± 0,39	11,22 ^c ± 1,02
	Nước nóng	15,45 ^a ± 0,44	14,29 ^{ab} ± 0,54	12,77 ^b ± 0,67	11,09 ^c ± 0,87
Sài đất	Ethanol	22,35 ^a ± 0,65	20,32 ^b ± 1,21	18,25 ^c ± 1,16	16,73 ^d ± 1,22
	Methanol	21,25 ^a ± 0,45	19,61 ^b ± 1,08	17,51 ^c ± 0,74	15,81 ^d ± 0,29
	Nước nóng	19,31 ^a ± 0,59	18,15 ^b ± 0,75	16,14 ^c ± 0,43	14,77 ^d ± 1,26
Đối chứng dương - Ampicilin (g/ml)					
64			26,57 ± 1,05		
32			21,25 ± 0,65		
Đối chứng âm - DMSO: không có vòng vô khuẩn					

Ghi chú: Đường kính các giếng tạo ra trên bề mặt thạch để nhỏ dịch chiết là 10mm. Các ký tự khác nhau trong một hàng, gồm a, b, c và d được sử dụng để biểu đạt những khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) khi xử lý bằng hàm one-way ANOVA và Tukey post hoc test.



Hình 3. Vòng vô khuẩn tạo ra bởi dung dịch kháng sinh Ampicillin nồng độ 512 µg/ml, 64 µg/ml và 32 µg/ml trên đĩa thạch Muller Hinton cấy vi khuẩn *E. coli* 25922 (sau 24 giờ nuôi cấy)



Hình 4. Vòng vô khuẩn được tạo thành bởi dịch chiết tô mộc sử dụng các dung môi ethanol, methanol và nước nóng (theo thứ tự từ trái sang phải) tại 4 nồng độ thí nghiệm (1 g/ml; 0,5 g/ml; 0,25 g/ml và 0,125 g/ml; sau 24 giờ nuôi cấy)

Như vậy, các dược liệu có khả năng ức chế tốt sự phát triển của vi khuẩn cũng chính là các dược liệu có hàm lượng polyphenol cao và hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Cụ thể, cúc hoa vàng, sài đất và tô mộc là các dược liệu có đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất (Bảng 4), đồng thời cũng là các dược liệu có chứa hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã sơ bộ chứng minh được tác dụng kháng khuẩn của các dược liệu gồm cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum*), hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus* Bge), kim ngân (*Lonicera japonica* Thumb), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), lô hội (*Aloe vera*), cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), cỏ hương bài (*Vetiveria zizanioides* L.

Nash), tô mộc (*Caesalpinia sappan*), hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.) và sài đất (*Wedelia chinensis* Osb. Merr) trên vi khuẩn *E. coli* ATCC25922, với đường kính vòng vô khuẩn dao động trong phạm vi từ 10,00mm đến 25,15mm. Cúc hoa vàng, tô mộc và sài đất không chỉ có khả năng kháng khuẩn *E. coli* mạnh nhất mà còn có hàm lượng polyphenol và có hoạt tính sinh học chống oxy hóa cao nhất. Vì vậy, cần có các nghiên cứu tiếp theo tập trung hơn nữa vào 3 cây thuốc này để khai thác tiềm năng ứng dụng của chúng trong thú y.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số: 09/2019/TN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alice G. (2016). Recent contributions to development of herbal-based immunomodulators for frms animals. *Journal of Immunology and Serum Biology*. 2: 1-10.
- Babak D., Ali M., Farzad M.A., Eleni K. & Samuel N. (2017). Effect of *Aloe vera* and vitamin E supplementation on the immune response of broilers. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 30(2): 159-164.
- Badami S., Moorkoth S. & Suresh B. (2004). *Caesalpinia sappan*: A medicinal and dye yielding plant. *Natural Product Radiance*. 3(2): 75-82.
- Badami S., Moorkoth S., Rai S.R., Kannan E. & Bhojrai S. (2003) Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. *Biol Pharm Bull* 26: 1534-1537.
- Balaji P., Venkatachalam V., Sivakkumar T. & Kannan K. (2016). Activation of complement system, alternate pathway activity of selected herbal drugs. *Mintage journal of pharmaceutical and medical sciences*. 5(3): 10-15.
- Bassam A.S., Ghaleb A., Naser J., Awni A.H. & Kamel A. (2006). Antibacterial activity of four plant extracts used in palestine in folkloric medicine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Turkish Journal Of Biology*. 30:195-198.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twentieth informational supplement M100-S20. 30(1).
- Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-82.
- Darah I., Lim S.H. & Nithianantham K. (2013). Effects of methanol extract of *Wedelia chinensis* Osbeck (Asteraceae) leaves against pathogenic bacteria with emphasise on *Bacillus cereus*. *Indian J Pharm Sci*. 75(5): 533-539.
- Das M.P., Rebecca L.J. & Sharmila S. (2013). Evaluation of antibacterial and antifungal efficacy of *Wedelia chinensis* leaf extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 5(2): 265-269.
- Do Q.D., Angkawijaya A.E., Tran N.P.L., Huynh L.H., Soetaredjo F.E., Ismadji S. & Ju Y.H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22: 296-302.
- Đỗ Tất Lợi (1999). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Heidari S.M., Tabatabaei Y.F., Alizadeh B.B. & Mortazavi A. (2015). Antimicrobial effect of aqueous, ethanol, methanol and glycerin extracts of *Satureja bachtiarica* on *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Zahedan journal of research in medical sciences*. 17(7): 1-5.
- Hong F., Xiao W., Ragupathi G., Lau C.B., Leung P.C., Yeung K. S., George C., Cassileth B., Kennelly E. & Livingston P. O. (2010). The known immunologically active components of astragalus account for only a small proportion of the immunological adjuvant activity when combined with conjugate vaccines. *Planta Medica*. 77(8): 817-824.
- Kim E., Ahn S., Rhee H.I. & Lee D.C. (2016). *Coptis chinensis* Franch extract up-regulate type I helper T-cell cytokine through MAPK activation in MOLT-4 T cell. *Journal of Ethnopharmacology*. 189: 126-131.
- Lee J.H., Cho S., Paik H.D., Choi S.W., Nam K.T., Hwang S.G. & Kim S.K. (2014). Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some Thai edible plants as an alternative for antibiotics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 10: 1461-8.
- Linda S., Kim, Robert F. Waters N.D., Peter M. & Burkholder M.D. (2002). Immunological Activity of *Larch Arabinogalactan* and *Echinacea*: A preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alternative Medicine Review*. 7(2): 138-149.
- Masuda T., Oyama Y., Inaba Y., Toi Y., Arata T., Takeda Y., Nakamoto K., Kuninaga H., Nishizato S. & Nonaka A. (2002). Antioxidant related activities of ethanol extracts from edible and medicinal plants cultivated in Okinawa, Japan. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 49(10): 652-661.
- Nguyen V.B., Vu B.D., Pham G.K., Le B.Q., Nguyen V.C., Men C.V. & Nguyen T.V. (2020). Phenolic Compounds from *Caesalpinia sappan*. *Pharmacognosy Journal*. 12(2): 1-5.
- Peng H.Y., Lai C.C., Lin C.C. & Chou S.T. (2014). Effect of vetiveria zizanioides essential oil on melanogenesis in melanoma cells: downregulation of tyrosinase expression and suppression of oxidative stress. *Scientific World Journal*. Hindawi Publishing Corporation. Article ID 213013, 9p.
- Pitinidhipat & Patchanee Y. (2012). Antibacterial Activity of *Chrysanthemum indicum*, *Centella asiatica* and *Andrographis paniculata* against *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* under Osmotic Stress. *Nateepat. AU journal of Technology*. 15(4): 239-245.
- Rehana B.H. & Nagarajan N. (2018). Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of a medicinal herb, *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merrill. *Asian Journal*

- of Pharmaceutical and Clinical Research. 11(10): 433-437.
- Sandigawad A.M. (2015). Traditional applications and phytochemical investigations of *Lonicera japonica* Thunb. International Journal of Drug Development and Research. 7: 42-49.
- Sen A. & Batra A. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia Azedarach* L. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 4: 67-73.
- Srinivasan R., Govindarasu G.S., Sakthivel K., Krishnamurthy M., Ramaiya B., Mariappan K., Muchukathan G. & Chinnavenkataraman G. (2012). *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(1):136-139.
- Suda I., Oki T., Nishiba Y., Masuda M., Kobayashi M., Nagai S., Hiyane R. & Miyashige T. (2005). Polyphenol contents and radical scavenging activity of extracts from fruits and vegetables cultivated in Okinawa, Japan. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 52(10): 462-471.
- Thanh Van Nguyen & Hai Thanh Nguyen (2019). Study on antibacterial effects of several Vietnamese medicine plants and their relationships with polyphenol contents. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 12(4): 257-265.
- Yadav R., Yadav N. & Kharya M.D. (2016). Immunomodulation potential of *Andrographis Paniculata* and *Tinospora Cordifolia* methanolic extracts in combination forms. International Journal of Pharmacological Research. 6(1): 29-40.
- Zhao J.F., Kiyohara H., Sun X.B., Matsumoto T., Cyong J.C., Yamada H., Takemoto N. & Kawamura H. (1991). *In vitro* immunostimulating polysaccharide fractions from roots of *Glycyrrhiza uralensis* fish. et DC. Phytotherapy Research. 5(5): 206-210.
- Zheng J., Yu X., Maninder M. & Xu B. (2018). Total phenolics and antioxidants profiles of commonly consumed edible flowers in China. International journal of food properties. 21(1): 1524-1540.
- Zhu S., Yang Y., Yu H., Ying Y. & Zou G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. Journal of Ethnopharmacology. 96(1-2): 151-158.