

NGHIÊN CỨU DỊCH CHIẾT CAO TỔNG HẠT CÂY LỤC LẠC LÁ ỒI DÀI (*CROTALARIA ASSAMICA* BENTH.) BẰNG TRÍCH LY VỚI CỒN, PHẦN TÍCH SƠ BỘ THÀNH PHẦN VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CƠ BẢN

Nguyễn Long Hoàng, Lê Thảo Hiền, Võ Viết Tiên, Trần Thị Tường An, Nguyễn Đình Quân*

Phòng thí nghiệm Nhiên liệu Sinh học và Biomass, trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Lục lạc lá ổi dài (*Crotalaria assamica* Benth.) một loại cây thuộc họ Fabaceae, được sử dụng rộng rãi như một loại thảo dược ở khu vực các nước châu Á như Trung Quốc, Việt Nam, Nhật Bản... Trong nghiên cứu này, trích ly cao chiết bằng cồn 90% kết hợp siêu âm từ hạt của cây *C. assamica* Benth được thử nghiệm trên mô hình *in vivo*. Các nhóm chất alkaloid, coumarin, flavonoid, tannin and saponin được định tính bằng phương pháp *I. Ciulei*, trong đó nhóm alkaloid và flavonoid cho tín hiệu dương tính mạnh mẽ nhất với các thuốc thử. Tiếp đến, cao chiết được thử nghiệm khả năng kháng oxy hóa, khả năng kháng khuẩn và độc tính cấp. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH được kiểm tra để đánh giá khả năng kháng oxy hóa của cao chiết và kết quả cho thấy giá trị IC_{50} là 337,14 $\mu\text{g/mL}$. Giá trị này nằm trong khoảng phù hợp với hoạt tính kháng oxy hóa của dược liệu trong y khoa và cao hơn một số cây thuốc châu Á đã được công bố trong các nghiên cứu trước như cao chiết cây nhàu, *Solanum hainanense* Hance và *Streptocaulon juvenas* Merr mà giá trị IC_{50} của các thảo dược này lần lượt là 917,16; 1734; và 2586 ppm. Cao chiết tiếp đến được pha loãng với nước tới nồng độ 2048 $\mu\text{g/mL}$ để khảo sát khả năng kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (nhạy với methycillin (MSSA)) and *Staphylococcus aureus* (đề kháng methycillin (MRSA)). Trong thí nghiệm này, cao chiết có khả năng kháng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* với đường kính vòng kháng khuẩn là 7,5 mm. Để khẳng định khả năng an toàn của loại dược liệu này, thí nghiệm độc tính cấp được thực hiện trên chuột. Liều LD_{50} được tính toán an toàn là 20 g cao chiết/1 kg trọng lượng chuột trong suốt 14 ngày thực hiện thí nghiệm.

Từ khóa: Hạt, *Crotalaria assamica* Benth., độc tính cấp, kháng khuẩn, kháng oxy hóa, *in vivo*.

MỞ ĐẦU

Cây lục lạc lá ổi dài mọc hoang dại ở môi trường sống ẩm từ cây bụi ven sông và đồng cỏ rừng thường xanh trên núi cao từ 900 - 1500 m so với mực nước biển. Ở Việt Nam, cây lục lạc lá ổi dài được tìm thấy ở miền núi phía Bắc, miền Trung và Tây Nguyên. Là một loài cây họ đậu ngắn ngày, dễ trồng, sản lượng cao và đặc biệt có khả năng cải tạo đất; cây lục lạc lá ổi dài có tiềm năng về giá trị kinh tế trong việc trồng và sản xuất dược liệu (Lợi, 2009).

Trong nghiên cứu hoạt tính kháng viêm của họ *Crotalaria pallida* và *C. assamica* Benth một nhóm nhà khoa học Đài Loan chỉ mới công bố về việc phát hiện một isoflavone mới là 5,7,4'-trihydroxy-2'-methoxyisoflavone (Ko *et al.*, 2004). Các nhà khoa học Trung Quốc cũng xác định thành phần pyrrolizidine trên 20 loại thảo mộc thuộc họ *Compositae* (Zhao *et al.*, 1989). Bên cạnh đó, pyrrolizidine alkaloid cũng được phát hiện trong dịch chiết của ba loại thảo dược Trung Quốc, trong đó có *C. assamica* (Edgar *et al.*, 1992).

Trong y học dân gian, người ta sử dụng toàn bộ cây để làm thuốc. Tại vùng miền núi phía Bắc, rễ cây dùng sắc uống để trị sỏi bàng quang, trị các loại vết thương ngoài da. Tại Tây Nguyên, thân cây dùng để làm thuốc trị phong thấp, đau xương, xuất huyết; lá dùng để trị nhọt, viêm mủ; hạt dùng để làm thức uống như các loại trà thảo mộc, được cho là giúp ngủ ngon, an thần (*Vietnamese National Drug Formularity*, 2002). Trà nấu từ hạt lục lạc lá ổi dài có vị thanh nhẹ, không đắng chát, có thể xem là dễ uống. Tuy vậy, đây chỉ là các cách sử dụng theo kinh nghiệm dân gian mà chưa có nghiên cứu khoa học cụ thể. Đáng chú ý, chưa có nghiên cứu nào khảo sát hạt của cây này, kể cả những tính chất cơ bản như hoạt tính kháng oxy hóa, hoạt tính kháng khuẩn, và độc tính cấp của dược thảo.

Trong đề tài này, cao chiết từ hạt của cây lục lạc lá ổi được trích ly bằng dung môi cồn 90% có hỗ trợ sóng siêu âm và được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa và thử nghiệm độc tính cấp trên chuột. Những kết quả này được mong đợi sẽ là cơ sở khoa học khẳng định tính hữu dụng và tiềm năng ứng dụng của nguyên liệu này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Hạt cây lục lạc lá ổi dài trồng ở huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng được cung cấp bởi Phòng Tài nguyên Thực vật, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên. Các hạt này được sao vàng hạ thổ trước khi đem đi chiết xuất theo phương pháp đã được báo cáo (Jiang *et al.*, 2010).

Diethyl ether (chuẩn HPLC), 2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH, 95% KL), dimethyl sulfoxide (DMSO, chuẩn phân tích) được mua từ Aldrich Sigma Co. Ltd. Methanol (MeOH, 99.9% KL), ethanol (90% thể tích), được mua từ Vina Chemsol (Việt Nam). Nước cất trong thí nghiệm được chưng cất bằng máy cất nước 2 lần của phòng thí nghiệm Nhiên liệu Sinh học và Biomass (Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh).



Hình 1. Cây lục lạc lá ổi dài (*Crotalaria assamica* Benth)

Chuột thí nghiệm giống Swiss Albino 6 đến 8 tuần tuổi, cân nặng khoảng 17 - 23 g/con, được cung cấp bởi Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh và Viện Pasteur Nha Trang. Chuột được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm trong 24 giờ để chuột thích nghi với điều kiện mới.

Phương pháp

Chiết xuất cao tổng với cồn 90 độ có hỗ trợ sóng siêu âm

20 g hạt cây lục lạc lá ổi dài sau khi sao vàng hạ thổ được nghiền thành bột. Bột này được trộn với 250 mL cồn 90° và đánh siêu âm trong 25 phút rồi lọc và cô quay chân không bay hơi ethanol để thu được hỗn hợp cao tổng. Phần bã lại được tiếp tục trích ly tương tự thêm 2 lần. Sau quá trình này, hỗn hợp cao tổng thu được có dạng sệt đặc để dùng cho các thí nghiệm sau. Thành phần hóa học của dịch chiết được định tính bằng phương pháp *I.Ciulei*, xác định theo nhóm hợp chất đặc trưng bao gồm alkaloid, coumarin, anthraquinon, flavonoid, cardiac glycoside, saponin, tannin.

Thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao tổng trích ly được đo với kết quả thử nghiệm khả năng khử gốc tự do (DPPH). Dung dịch phản ứng điển hình chứa 0,4 mL dịch mẫu với 0,8 mL dung dịch DPPH nồng độ 0,1 mM với cồn. Dịch chiết cồn được phân tán trong DMSO với tỷ lệ 400, 200, 100, 80, và 60 µg/mL (ppm). Đối chứng dương là dung dịch acid ascorbic trong nước với nồng độ là 10, 8, 6, 4, và 2 ppm. Đối chứng âm là cồn. Hấp thụ quang học được thực hiện tại bước sóng 517 nm. Hỗn hợp phản ứng được đặt trong nhiệt độ phòng khoảng 30 phút trước khi phân tích (Scherer & Godoy, 2009) (Ak & Gülçin, 2008). Khả năng khử gốc tự do (DPPH) được tính theo công thức sau:

$$S (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

Trong đó: A_1 là mật độ quang của dung dịch phản ứng DPPH, A_0 là mật độ quang học của dung dịch đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ của dịch chiết khử được 50% gốc tự do DPPH) được tính toán từ đường chuẩn trong khoảng tuyến tính bằng việc vẽ đồ thị sự phụ thuộc của nồng độ dung dịch chiết vào khả năng khử gốc tự do.

Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn

Các chủng vi khuẩn được cấy lên bề mặt dịch agar. Các lỗ đường kính 5,5 mm được tạo ra bằng dụng cụ đã khử trùng. 70 µL mẫu được nhỏ vào lỗ. Mẫu đối chứng dùng dung môi DMSO. Đĩa petri được ủ tại 37°C trong 16 - 18 tiếng đồng hồ trước khi đo đường kính vòng kháng khuẩn theo phương pháp đã mô tả trước đây (Adedapo *et al.*, 2008). Các mẫu được gửi phân tích tại Trung tâm Khoa học Công nghệ Sapharcen thuộc Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

Thử nghiệm độc tính cấp

Dịch chiết từ hạt lục lạc lá ổi dài được cho bay hơi dung môi ở 90°C đến khi thu được hỗn hợp khô. 1g của hỗn hợp khô được thêm nước cho đủ 1 mL thể tích dịch đặc để cho chuột uống bằng kim uống chuyên dụng.

Mỗi thí nghiệm thử nghiệm độc tính cấp được thực hiện với 6 đơn vị chuột đực và 6 đơn vị chuột cái đã bị bỏ đói trong 12 giờ. Chuột được cho uống trong 14 ngày. Liều dùng cao nhất là 20 mL mẫu/1kg chuột. Sự vận động nói chung, trạng thái sinh hoạt của chuột, cũng như số chuột bị chết trong 14 ngày được theo dõi và ghi nhận kết quả.

Có 3 trường hợp có thể xảy ra:

- Trường hợp 1: Sau khi cho chuột uống thuốc, số chuột trong lô vẫn bảo toàn, xác định liều cao nhất có thể qua kim mà không làm chết chuột. Liều này được kí hiệu là Dmax và liều tương đối an toàn Ds dùng trong các thử nghiệm được lý có thể bằng hoặc lớn hơn 1/5 Dmax.

- Trường hợp 2: Sau khi cho chuột uống thuốc, tỷ lệ tử vong là 100% thì thử với liều giảm ½ so với liều đầu. Tiếp tục giảm liều cho đến khi tìm được liều tối thiểu gây chết 100% chuột (LD100) và liều tối đa không gây chết chuột nào (LD0). Tiến hành thử nghiệm xác định LD50: chia chuột làm 4 lô, mỗi lô ít nhất 6 con. Chia 4 liều theo cấp số cộng khoảng từ LD0 đến LD100. Ở những liều gần LD50, tăng số lượng chuột lên để sự đo lường được chính xác hơn. Theo dõi chuột trong 72 giờ, ghi nhận các diễn biến của chuột, số lượng chuột chết/sống ở mỗi lô, lập phân suất tử vong để tìm LD50. LD50 được tính theo phương pháp Karber - Behrens.

- Trường hợp 3: Sau khi cho chuột uống thuốc, phân suất tử vong thấp hơn 100%, không xác định được liều gây chết tuyệt đối, không thể xác định được LD50. Tuy nhiên, trong trường hợp này, có thể xác định liều tối đa không gây chết chuột, gọi là liều chết (LD0). Khi đó, liều tương đối an toàn Ds dùng trong các thử nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích thành phần cơ bản dịch chiết cao tổng từ hạt lục lạc lá ổi dài

Một cách định tính tổng quát, các thành phần hợp chất hữu cơ trong cao tổng được phân biệt theo nhóm đặc trưng phụ thuộc vào độ mạnh của tín hiệu cường độ màu trình bày trong Bảng 1. Theo đó, nhóm các hợp chất alkaloid và flavonoid cho tín hiệu mạnh nhất, tương ứng thành phần nhiều nhất trong hỗn hợp cao tổng. Đây là những thành phần thường gặp trong các thực vật có được tính tích cực đến sức khỏe người dùng. Các alkaloid có hoạt tính sinh học mạnh mẽ như kháng viêm, chống tắc nghẽn mạch máu, chống sự hình thành u hạch, chống co thắt, và bảo vệ gan (Debnath *et al.*, 2018). Trong khi đó, các flavonoid cũng có hoạt tính sinh học đa dạng như kháng viêm, chống ung thư, chống virus, chống oxy hóa, điều biến miễn dịch qua khi ức chế một số enzyme và hormone đặc trưng (Lee *et al.*, 2007). Do giới hạn của khảo sát ban đầu, việc phân tích cụ thể và định danh các hợp chất trên chưa được thực hiện trong nghiên cứu này.

Bảng 1. Thành phần các nhóm hợp chất hữu cơ trong dịch chiết hạt lục lạc lá ổi dài

Nhóm hợp chất	Cường độ màu thuốc thử
Alkaloid	+++
Coumarin	++
Anthraquinon	-
Flavonoid	+++
Cardiac Glycoside	-
Saponin	++
Tannin	+

Chú thích: + : dương tính yếu với thuốc thử; ++ : dương tính với thuốc thử; +++ : dương tính mạnh với thuốc thử; - : âm tính với thuốc thử.

Hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa là một tính chất hữu ích của thực phẩm và dược phẩm chống lại những tác nhân oxy hóa DNA và lipid trong cơ thể động vật. Ở thí nghiệm này, dịch chiết cao tổng ethanol của hạt lục lạc lá ổi dài có hoạt tính kháng oxy hóa khá cao khi giá trị IC₅₀ trung bình của 3 lần thí nghiệm là 337.14 ppm theo phương pháp khử gốc tự do DPPH. Giá trị này nằm trong khoảng phù hợp với hoạt tính kháng oxy hóa của dược liệu trong y khoa và cao hơn một số cây thuốc châu Á đã được công bố trong các nghiên cứu trước như cao chiết cây nhàu (Đài *et al.*, 2012), *Solanum hainanense* Hance và *Streptocaulon juvenas* Merr (Nguyen, Eun, 2011) mà giá trị IC₅₀ của các thảo dược này lần lượt là 917,16; 1734; và 2586 ppm.

Hoạt tính kháng khuẩn

Bên cạnh hoạt tính kháng oxy hóa, khả năng kháng khuẩn của dịch chiết cao tổng hạt lục lạc lá ổi dài cũng được tìm thấy tích cực khi kháng lại chủng *P. aeruginosa*, với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình cả 3 lần lặp lại là 7,5 mm. Đây là chủng vi khuẩn nguy hiểm gây suy giảm miễn dịch tồn tại trong môi trường bệnh viện và các hội chứng nhiễm trùng huyết. Kết quả này cũng được thực hiện với đối chứng với DMSO. Bảng 2 trình bày các số liệu thu được từ thực nghiệm.

Dịch chiết ethanol của hạt lục lạc lá ổi dài cho thấy không có tính kháng ngữa các chủng vi sinh khác đã kiểm tra như: *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (chủng nhạy cảm với methycilin (MSSA)) và *Staphylococcus aureus* (chủng kháng thuốc methycilin (MRSA)). Điều này phần nào cũng cho thấy tính tương thích sinh học của sản phẩm. Tuy vậy việc sản phẩm kháng lại được chủng *P. aeruginosa* nguy hiểm vẫn là một kết quả tích cực, là dữ liệu để thực hiện các nghiên cứu kháng viêm trên chủng vi khuẩn này về sau.

Bảng 2. Dữ liệu kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn *P. aeruginosa*

Mẫu	Đường kính vùng kháng khuẩn (mm)
DMSO (*)	5,5
Mẫu cao tổng (lần 1)	7,4
Mẫu cao tổng (lần 2)	7,5
Mẫu cao tổng (lần 3)	7,5

Độc tính cấp

Hạt lục lạc lá ổi dài được dùng như 1 loại thảo dược ở một số địa phương và đặc biệt là người dân tộc thiểu số tại tỉnh Lâm Đồng. Loại thảo dược này được người dân cho biết là giúp ngủ ngon và tăng cường sức khỏe. Tuy vậy, độc tính cấp của hạt lục lạc lá ổi dài chưa được nghiên cứu, trong khi đây là tính chất quan trọng nhất liên quan đến sự an toàn của dược thảo. Trong thí nghiệm với chuột (Hình 2), dịch chiết hạt lục lạc lá ổi dài thể hiện không có độc tính. Tất cả đơn vị chuột tham gia thử nghiệm đều khỏe mạnh sau 14 ngày và không có dấu hiệu khác biệt gì so với các đơn vị chuột không thử nghiệm. Điều này phù hợp với trường hợp 3 như đã trình bày ở phần phương pháp. Liều lượng cao nhất của dịch chiết cao tổng đã dùng trong thí nghiệm là (LD0) 0,2 mL dịch chiết/10 g chuột. Thí nghiệm này xác nhận sự an toàn và tiềm năng làm dược liệu của hạt lục lạc lá ổi dài

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp trên chuột

Lô	Số lượng chuột	Tỉ lệ đực cái	Liều 1	Số lượng chuột chết	Liều 2	Số lượng chuột chết
1	20	1:1	0,1 mL/10g chuột	0	0,2 mL/10g chuột (lặp)	0
2	20	1:1	0,1 mL/10g chuột	0	0,2 mL/10g chuột (lặp)	0
3	20	1:1	0,1 mL/10g chuột	0	0,2 mL/10g chuột (lặp)	0
4	20	1:1	0,1 mL/10g chuột	0	0,2 mL/10g chuột (lặp)	0
5	20	1:1	0,1 mL/10g chuột	0	0,2 mL/10g chuột (lặp)	0

Như vậy, liều cao nhất qua được đầu kim uống là 0,2 mL/10g chuột nhưng không gây chết bất cứ chuột nào ở cả 5 lô. Đây là liều phù hợp và an toàn nhất mà không hề gây độc cho động vật thí nghiệm.



Hình 2. Thử nghiệm độc tính cấp trên chuột

KẾT LUẬN

Dịch chiết cao tổng bằng cồn 90° từ hạt lục lạc lá ổi dài (*C. assamica* Benth.) lần đầu tiên được phân tích để làm rõ một số tính chất cơ bản. Những nhóm hợp chất được tìm thấy nhiều nhất trong dịch chiết bằng phương pháp phân tích định tính *I.Ciulei* là alkaloid và flavonoid. Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng vi khuẩn của dịch chiết là tích cực, cho thấy tiềm năng có thể sử dụng làm một loại dược thảo có lợi cho sức khỏe. Cuối cùng, thử nghiệm *in vivo* trên chuột đã xác nhận tính an toàn của sản phẩm. Nghiên cứu này là nghiên cứu ban đầu với kỳ vọng sẽ

mở ra chuỗi nghiên cứu đem lại thêm dữ liệu khoa học cho cây thuốc lục lạc lá ổi dài và tìm thấy những ứng dụng mới trong y học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adedapo AA, Jimoh FO, Koduru S, Afolayan AJ, Masika PJ (2008). Antibacterial and antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Calpurnia aurea*. *BMC Compl Alter Med* 8(1): 53.
- Ak T, Gülçin İ (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact* 174(1): 27-37.
- Đài TTX, Nguyễn PTM, Quách HT (2012). Khảo sát hiệu quả hạ đường huyết và chống oxy hóa của cao chiết cây Nhàu (*Morinda citrifolia* L.) ở chuột bệnh tiểu đường. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ* 23(b1) 115-124.
- Debnath B, Singh WS, Das M, Goswami S, Singh MK, Maiti D, Manna K (2018). Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Mat Today Chem* 9: 56-72.
- Edgar JA, Lin HJ, Kumana CR, Ng MMT (1992). Pyrrolizidine Alkaloid Composition of Three Chinese Medicinal Herbs, *Eupatorium cannabinum*, *E. japonicum* and *Crotalaria assamica*. *Ame J Chinese Med* 20: 281-288.
- Jiang L, Cheng M, Gao Q, Tang J (2010). Analysis of Monocrotaline in Seed of *Crotalaria assamica* Benth. *China Pharma* 13: 1743-1745.
- Ko HH, Weng JR, Tsao LT, Yen MH, Wang JP, Lin CN (2004). Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorganic Med Chem Lett* 14(4): 1011-1014.
- Lee ER, Kang GH, Cho SG (2007). Effect of Flavonoids on Human Health: Old Subjects but New Challenges. *Recent Patent Biotechnol* 1(2): 139-150.
- Lợi ĐT (2009). *Những cây thuốc Việt Nam*. NXB Y Học.
- Nguyen VQ, Eun BJE (2011). Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. *J Med Plant Res* 5: 2798-2811.
- Scherer R, Godoy HT (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chem* 112: 654-658.
- Vietnamese National Drug Formulary (Dược thư quốc gia Việt Nam) (2002). Bộ Y tế, Việt Nam.
- Zhao XL, Chan MY, Ogle CW (1989). The Identification of Pyrrolizidine Alkaloid-Containing Plants - A Study on 20 Herbs of the Compositae Family. *Ame J Chinese Med* 17: 71-78.

INVESTIGATING THE ETHANOLIC EXTRACT OF *CROTALARIA ASSAMICA* BENTH SEEDS WITH SOME BASIC PROPERTIES AND THE GENERAL CHEMICAL COMPOSITION

Nguyen Long Hoang, Le Thao Hien, Vo Viet Tien, Tran Thi Tuong An, Nguyen Dinh Quan*

Laboratory of Biofuel and Biomass Research, Ho Chi Minh University of Technology (HCMUT), Vietnam National University (VNU), Ho Chi Minh City, Vietnam.

SUMMARY

Crotalaria assamica Benth. which belongs to Fabaceae family, is a commonly available herb in Asian countries, such as China, Vietnam, Japan, etc. Most of the studies on its toxicity and anti-inflammatory activity have been carried out on in vitro models. In this study, crude extract from dark roasting and land cooling seed of *Crotalaria assamica* Benth. was investigated and tested on in vivo models with ultrasound extraction in 90 wt.% ethanol. Alkaloid, coumarin, flavonoid, tannin and saponin compounds were detected by *I.Ciulei* qualitative analysis method, among which alkaloids and flavonoids were found with strongest positive signs. Sequentially, the crude extract was tested for antioxidant capacity, antibacterial activity and acute toxicity. The free radical scavenging DPPH capacity was measured to evaluate its antioxidant and a fairly high value of IC₅₀ of 337.14 µg/mL was recorded. The result was showed its potential for antioxidant activity, due to the range of acceptable value for human treatment in pharmacy. This positive result is higher than that of some other Asia's herbs medical treatment in previous studies such as *Morinda citrifolia* L. leaves, *Solanum hainanense* Hance, and *Streptocaulon juvenas* Merr, of which IC₅₀ values were 917.16, 1734, and 2586 ppm, respectively. To test the antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (sensitive with methycillin (MSSA)) and *Staphylococcus aureus* (resistant to methycillin (MRSA)), the

crude extract was diluted with water down to 2048 $\mu\text{g/mL}$. The diluted extract affected on *Pseudomonas aeruginosa* with the inhibition diameter of 2mm. To elucidate the safety of using this herb as a botanical medicine, its acute toxicity was tested on mice. A feeding dose of 20 g crude extract/1 kg weight of mice was safe for the mice during 14-day-test.

Keywords: Seed, *Crotalaria assamica Benth.*, acute toxicity, antibacterial activity, antioxidant activity, *in vivo*.