

THU NHẬN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CHIẾT XUẤT LÁ NEEM (*Azadirachta Indica*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG SÓNG SIÊU ÂM

Hoàng Thùy Dương, Ngô Hồng Loan, Phan Thị Kim Ngân, Lâm Hoàng Anh Thư,
Phạm Tiên Dũng, Ngô Võ Kế Thành, Nguyễn Hữu Tuyển*

Trung tâm nghiên cứu triển khai Khu Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chiết xuất hoạt chất từ lá neem trong dung môi ethanol và nước được thực hiện bằng phương pháp chiết với sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Các loại chiết xuất được xác định hàm lượng phenolic và flavonoid tổng. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định thông qua giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Kết quả cho thấy dịch chiết trong dung môi ethanol 96 cho hàm lượng phenolic và flavonoid cao hơn chiết trong dung môi ethanol 70. Hoạt tính kháng khuẩn hiệu quả nhất khi chiết với dung môi ethanol 70. Các giá trị MIC của dịch chiết LN-E₇₀ trên một số chủng vi khuẩn khảo sát lần lượt là 5 mg/mL đối với *S. aureus*; 25 mg/mL đối với *P. aeruginosa* và 1 mg/mL đối với *C. diphtheriae*. Thử nghiệm trên *E. coli* không ghi nhận khả năng kháng. Từ các kết quả thu được đã cho thấy chiết xuất từ lá neem với sự hỗ trợ của sóng siêu âm có hoạt tính sinh học và tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm.

Từ khóa: *Azadirachta indica*, lá neem, kháng khuẩn, phương pháp ly trích siêu âm.

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu và đánh giá hoạt tính sinh học của các nguồn thực vật ngày càng được quan tâm. Hợp chất có được tính từ thực vật là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho việc sản xuất các sản phẩm dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm chức năng. Một trong những loại thực vật được chú ý nhiều nhất hiện nay là cây Neem. Cây neem có nhiều công dụng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như dược phẩm, mỹ phẩm, nông nghiệp và xử lý môi trường (Dhaliwal *et al.*, 2004). Trên thế giới, cây neem được nghiên cứu rất nhiều về mặt hóa học và dược tính học. Các bộ phận của cây neem đều có chứa những hợp chất thuộc nhóm diterpenoid ba vòng (margocin, margocinin, margocilin...), nhóm limonoid (nimbolin A, nimbolin B, azachirachtin...), nhóm tetranortriterpenoid (nimbocinol, 17-epinimbocinol). Một số hợp chất cô lập được đã cho thấy được tính trị viêm loét bao tử, trị sốt rét như nimbidin, nimbidol hay hoạt tính trừ sâu azadirachtin (Dhaliwal *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2019; Herrera-Calderon *et al.*, 2019)... Ở Việt Nam, cây neem chủ yếu được trồng ở Ninh Thuận và Bình Thuận với mục đích trồng rừng, chống sa mạc hóa. Các nghiên cứu trong nước về tách chiết hoạt chất từ Neem hiện nay chủ yếu thực hiện bằng các phương pháp truyền thống như ngâm chiết, Soxhlet, đun. Việc áp dụng các kỹ thuật mới trong chiết xuất hợp chất từ Neem chưa được thực hiện rộng rãi.

Các kỹ thuật trích ly mới như hỗ trợ siêu âm, hỗ trợ vi sóng, chất siêu tới hạn và chiết trong dung môi tăng tốc (ASE) được ứng dụng nhằm tăng hiệu suất trích ly và hiệu quả của quá trình do giảm được thời gian xử lý và tiêu thụ dung môi và năng lượng ít hơn (Kiassos *et al.*, 2009). Trong đó, phương pháp chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm 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 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. Trích ly có hỗ trợ 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 (Kiassos *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2018).

Việc ly trích các thành phần hoạt chất có hoạt tính sinh học từ lá neem bằng các kỹ thuật mới vẫn còn ít được nghiên cứu, đặc biệt tại Việt Nam. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả kháng khuẩn của dịch chiết lá neem có hỗ trợ sóng siêu âm nhằm tạo cơ sở cho việc khai thác và ứng dụng lá neem cho 1 số ngành như y học, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và là cơ sở bổ sung thêm các thông tin về hoạt tính của chiết xuất lá neem bằng các phương pháp ly trích khác nhau.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Lá neem (xoan chịu hạn) tươi được thu nhận trực tiếp từ tỉnh Ninh Thuận - Việt Nam.

Các chủng vi khuẩn: *Escherichia coli* (E. coli) - ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa) - ATCC 10145, *Corynebacterium diphtheriae* (C. diphtheriae) - ATCC 13812, *Staphylococcus aureus* (S. aureus) - ATCC 25923, được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Trung tâm nghiên cứu triển khai Khu công nghệ cao.

Phương pháp thu nhận dịch chiết

Lá neem tươi được thu nhận và rửa sạch. Phơi khô mẫu lá trong điều kiện mát. Nghiền nhỏ mẫu lá thành dạng bột. Cân 100 g bột lá, bổ sung 1000 mL dung môi (ethanol 96; ethanol 70 và nước cất) tiến hành đánh siêu âm (800W, 37 kHz - Đức) ở nhiệt độ phòng. Sau 3 giờ, lọc và thu dịch chiết bằng giấy lọc New Star 102. Phần bột lá tiếp tục được chiết lặp lại 3 lần. Tiến hành loại dung môi và thu nhận cao chiết tổng bằng cách đun cách thủy ở 70°C. Hòa tan 1 g cao chiết trong 2 mL DMSO để sử dụng cho thí nghiệm xác định hoạt tính sinh học.

Phương pháp xác định hàm lượng phenolic và flavonoid trong dịch chiết

Hàm lượng phenolic được xác định thông qua phương pháp Folin-Ciocalteu (Singleton, Rossi, 1965, Li *et al.*, 2007). Sử dụng DMSO pha loãng mẫu LN-E₇₀ và LN-E₉₆ để đạt nồng độ 0,2 mg/mL và dung dịch phenolic chuẩn gallic acid nồng độ 0, 20, 40, 60, 80 và 100 µg/mL; thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% được pha loãng với nước. Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch gallic acid (nồng độ 0, 20, 40, 60, 80 và 100 µg/mL) vào 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, vortex đều và để phản ứng trong 4 phút. Sau đó, thêm tiếp vào 2 mL dung dịch Na₂CO₃ 2%. Sau 120 phút phản ứng ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ được xác định bằng máy đo quang phổ (OD) ở bước sóng 765 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn để sử dụng xác định hàm lượng phenolic tổng trong các mẫu chiết xuất. Các mẫu chiết xuất được tiến hành tương tự với phenolic chuẩn. Hàm lượng phenolic tổng được tính theo công thức: $P = a \times V/m$ Trong đó: P: hàm lượng phenolic tổng (mg gallic acid/g chiết xuất); a: giá trị x từ đường chuẩn với gallic acid (µg/mL); V: thể tích dung dịch cao chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

Hàm lượng flavonoid tổng được xác định theo mô tả của Chang và đồng tác giả (2002) có sửa đổi (Chang *et al.*, 2002). Ethanol được sử dụng để pha loãng cao chiết thành nồng độ 1 mg/mL. Dung dịch quercetin được chuẩn bị với các nồng độ 75; 50; 25; 12,5; 6,25 và 3,125 µg/mL trong DMSO. Dung dịch AlCl₃ 10% và dung dịch CH₃COOK 1M được pha loãng với nước. Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch quercetin (nồng độ 75; 50; 25; 12,5; 6,25 và 3,125 µg/mL) vào 1,5 mL ethanol 96, vortex và để phản ứng trong 5 phút. Sau đó, thêm tiếp 0,1 mL AlCl₃ 10%, vortex và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm vào 0,1 mL CH₃COOK 1M và 2,8 mL nước cất, lắc đều rồi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau 30 phút, tiến hành xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 415 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả OD được ghi nhận và xây dựng đường chuẩn flavonoid để sử dụng xác định hàm lượng trong các chiết xuất. Các mẫu chiết xuất được tiến hành tương tự với quercetin. Hàm lượng flavonoid tổng được tính theo công thức: $F = c \times V/m$ Trong đó: F: hàm lượng flavonoid tổng (mg quercetin/g chiết xuất); c: giá trị x từ đường chuẩn với quercetin (mg/mL); V: thể tích dịch chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

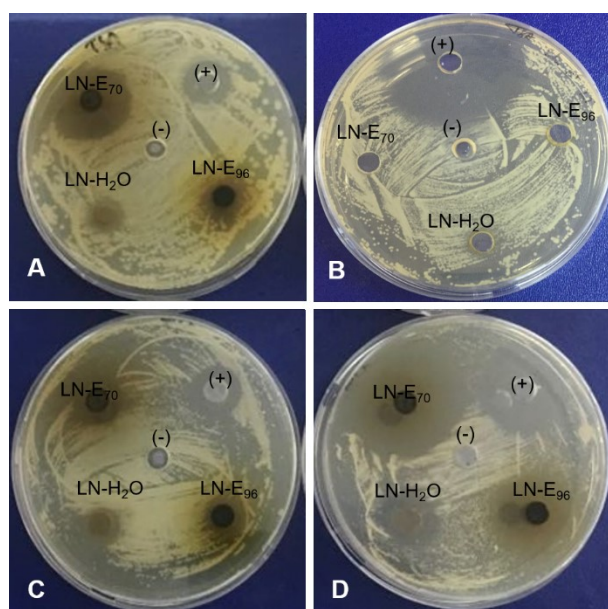
Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn của chiết xuất

Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán thạch theo mô tả của Parkavi và đồng tác giả (2012) có sửa đổi. Chiết xuất được chuẩn bị trong DMSO thành dãy nồng độ 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL (thử nghiệm với các chủng vi khuẩn Gram dương) và 10; 20; 50; 100; 200; 300; 400; 500 mg/mL (thử nghiệm với các chủng vi khuẩn Gram âm). Các chủng vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường Tryptic Soy Broth (Scharlau - Tây Ban Nha). Xác định mật độ tế bào bằng chỉ số hấp phụ OD tại bước sóng 625 nm. Hút 100 µl dịch khuẩn (nồng độ 10⁶ cfu/mL) trải đều trên đĩa TSA. Dùng que đục vô trùng inox (đường kính 8 mm) đục thành 5 giếng/đĩa. Hút 100 µl dịch chiết theo các nồng độ khác nhau đã chuẩn bị cho vào các giếng. Đối chứng âm với DMSO và đối chứng dương với kháng sinh ampicillin. Ủ các đĩa ở 37°C, sau 24 giờ tiến hành ghi nhận vòng vô khuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thu nhận dịch chiết

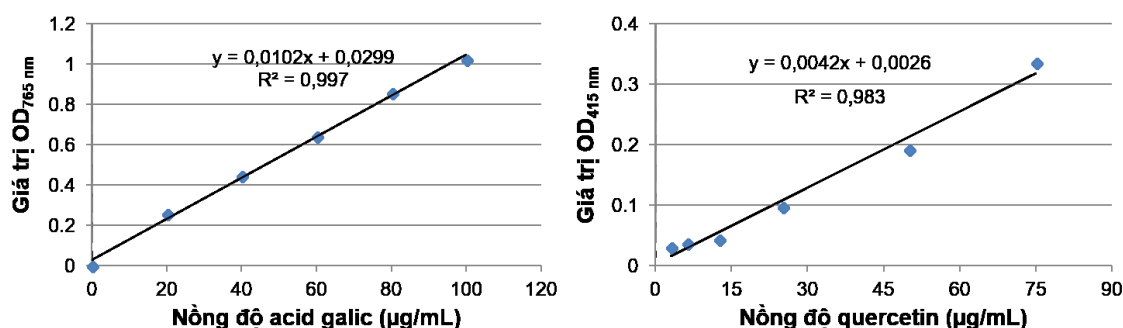
Dịch chiết thô (crude extract) hay còn gọi là dịch chiết tổng được thu nhận trước khi tiến hành tách phân đoạn là cách tiếp cận của nhiều nghiên cứu khảo sát hoạt tính sinh học của thực vật (Koehn 2008). Kết quả kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn cho thấy dịch chiết lá neem sử dụng dung môi ethanol 70 (LN-E₇₀) cho hiệu quả cao hơn dung môi ethanol 96 (LN-E₉₆) và nước (LN-H₂O), điều đó được thể hiện qua vòng vô khuẩn rộng. Dịch chiết với ethanol 96 cho thấy vòng vô khuẩn hẹp hơn và dịch chiết trong nước không ghi nhận vòng vô khuẩn.



Hình 1. Hoạt tính kháng khuẩn của các loại dịch chiết
A - *C. diphtheriae*; B - *E. coli*; C - *P. aeruginosa*; D - *S. aureus*

Hàm lượng phenolic và flavonoid trong dịch chiết

Trong quá trình sinh trưởng, thực vật sản sinh ra các hợp chất nhóm phenolic để đối phó với các gốc oxy hoạt tính (ROS) và các gốc tự do chất nền (substrate derived-free radicals) được tạo ra trong quá trình quang hợp. Dịch chiết được thu nhận với ethanol được cho thấy thành phần đa dạng các hợp chất của thực vật và an toàn cho sức khỏe và môi trường hơn khi sử dụng các dung môi hữu cơ khác như methanol, hexane và ethyl acetate (Madhavi, Salunkhe 1995). Hàm lượng phenolic và flavonoid trong các mẫu chiết được tính dựa trên cơ sở các đường chuẩn với acid gallic và quercetin chuẩn (Hình 2). Kết quả hàm lượng phenolic và flavonoid được thể hiện qua Bảng 1.



Hình 2. Đồ thị phương trình đường chuẩn acid galic và quercetin

Bảng 1. Hàm lượng phenolic và flavonoid trong mẫu dịch chiết

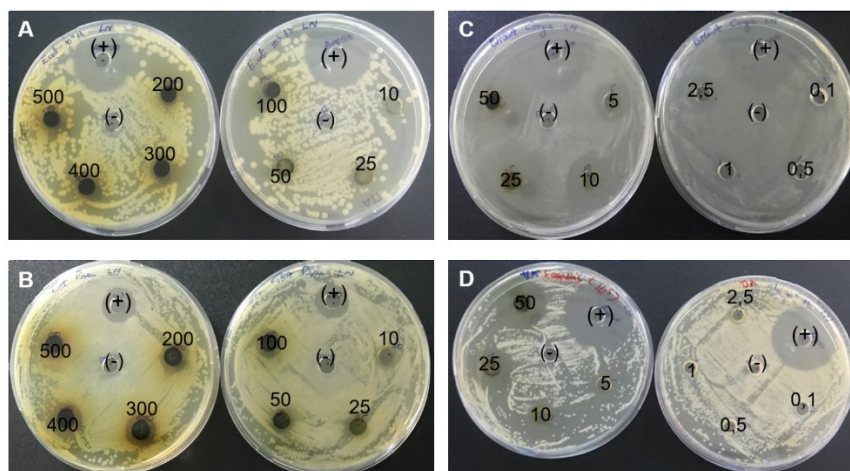
Dịch chiết	Hàm lượng phenolic tổng (mg GA/g cao chiết)	Hàm lượng flavonoid (mg QE/g cao chiết)
LN-E ₇₀	66,45	15,92
LN-E ₉₆	74,78	30,92
LN-H ₂ O	-	-

Ghi chú: (-) không thực hiện.

Phenolic và flavonoid là những hoạt chất quan trọng và chiếm tỷ lệ lớn trong thực vật nói chung. Hàm lượng phenolic và flavonoid thu được khi sử dụng dung môi ethanol 96 cao hơn ethanol 70, lần lượt là 30,92 mg QE/g cao chiết và 74,78 mg GA/g cao xuất so với 15,92 mg QE/g cao chiết và 66,45 mg GA/g cao chiết.

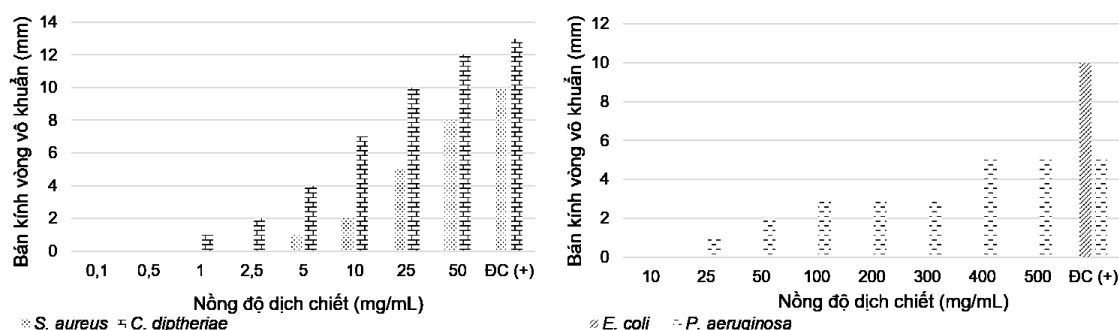
Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết

Từ kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn (Hình 1), với mục đích thu nhận dịch chiết lá neem có hoạt tính kháng khuẩn mạnh để tạo tiền đề cho các ứng dụng sau này, chúng tôi tiếp tục sử dụng dịch chiết với dung môi ethanol 70 để khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên các chủng vi khuẩn. Kết quả được thể hiện qua Hình 3 và Hình 4.



Hình 3. Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất lá neem theo nồng độ (mg/mL)
A - *P. aeruginosa*; B - *E. coli*; C - *C. diphtheriae*; D - *S. aureus*

Bước đầu khảo sát cho thấy khả năng kháng khuẩn của dịch chiết lá neem trên vi khuẩn Gram dương tốt hơn trên vi khuẩn Gram âm. Trên vi khuẩn Gram dương, nồng độ ức chế tối thiểu của dịch chiết lá neem đối với *S. aureus* là 5 mg/mL và bán kính vòng kháng khuẩn đạt được ở nồng độ khảo sát 50 mg/mL là 8 mm. Đối với vi khuẩn *C. diphtheriae*, dịch chiết lá neem có khả năng ức chế sự tăng trưởng và phát triển của vi khuẩn này tại nồng độ 1 mg/mL, bán kính vòng kháng khuẩn có giá trị 12 mm tại nồng độ 25 và 50 mg/mL. Kết quả cho thấy khả năng kháng *C. diphtheriae* của dịch chiết lá neem tốt hơn trên *S. aureus* với nồng độ ức chế tối thiểu cao hơn 5 lần. Đối với vi khuẩn Gram âm, dịch chiết lá neem gần như không có tác dụng kháng *E. coli* khi tăng nồng độ khảo sát lên đến 500 mg/mL. Trên vi khuẩn *P. aeruginosa*, nồng độ ức chế tối thiểu ghi nhận được là 25 mg/mL, bán kính vòng kháng khuẩn đạt được ở nồng độ 400 - 500 mg/mL là 5 mm. Kết quả giá trị nồng độ ức chế tối thiểu trên *P. aeruginosa* cao gấp 5 lần so với *S. aureus* và 25 lần so với *C. diphtheriae* chứng minh khả năng kháng khuẩn kém của dịch chiết lá neem trên vi khuẩn Gram âm.



Hình 4. Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết theo nồng độ

Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết lá neem trên bốn chủng vi khuẩn khảo sát bằng phương pháp khuếch tán qua thạch cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của dịch chiết trên 3 loại vi khuẩn *S. aureus*, *C. diphtheriae*, *P. aeruginosa* lần lượt là 5, 1, 25 mg/mL; dịch chiết lá neem có khả năng kháng tốt nhất trên *C. diphtheriae*.

THẢO LUẬN

Hiện nay, việc sử dụng các hoạt chất từ thực vật ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm ngày càng được sử dụng rộng rãi và phổ biến. So với kháng sinh hay các hoạt chất tổng hợp hóa học có tác dụng kháng khuẩn, hoạt chất từ thực vật cho thấy an toàn hơn, ít gây tác dụng phụ khi sử dụng, cơ thể dễ dung nạp, chi phí thấp, không gây ô nhiễm môi trường (Vermani *et al.*, 2002; Herrera-Calderon *et al.*, 2019). Tất cả các bộ phận từ cây Neem đều có

hoạt tính sinh học hữu ích như kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus,... và rất có tiềm năng sử dụng trong chăm sóc sức khỏe và làm đẹp (Muhammad *et al.*, 2019; Fatima *et al.*, 2020). Các hoạt tính dược liệu của cây Neem được ghi nhận nhờ sự hiện diện của các thành phần dẫn xuất phenolic, flavonoid, alkaloid (Hossain *et al.*, 2013). Thành phần và hoạt tính của các dịch chiết thực vật bị chi phối đáng kể bởi quy trình tách chiết cũng như các loại dung môi và trình tự sử dụng các dung môi trong quá trình tách chiết (Pellegini *et al.*, 2007; Rababah *et al.*, 2010). Dịch chiết thô (crude extract) hay còn gọi là dịch chiết tổng được thu nhận trước khi tiến hành tách phân đoạn là cách tiếp cận của nhiều nghiên cứu khảo sát hoạt tính sinh học của thực vật (Koehn, 2008). Chiết xuất từ lá neem bằng phương pháp soxhlet, ngâm chiết, đun, chiết lỏng điều áp, chiết có hỗ trợ vi sóng, sóng siêu âm hay chiết siêu tới hạn đều cho thấy sự hiện diện của các hợp chất quan trọng thuộc nhóm phenolic, flavonoid và alkaloid (Shewale, Rathod, 2018; Fatima *et al.*, 2020). Năm 2017, Barbosa và đồng tác giả đã ly trích hoạt chất từ lá neem bằng kỹ thuật ly trích lỏng điều áp (pressurized liquid extraction - PLE) với dung môi ethanol 80% và xác định thành phần phenolic và flavonoid từ dịch chiết. Kết quả cho thấy hàm lượng phenolic và flavonoid lần lượt đạt khoảng 38 mg GA/L chiết xuất và 53 mg QE/L chiết xuất (Barbosa *et al.*, 2017). Năm 2019, Ouerfelli và đồng tác giả sử dụng kỹ thuật ly trích có hỗ trợ sóng siêu âm để chiết xuất hoạt chất từ lá neem tươi, kết quả cho thấy hàm lượng phenolic đạt $47,47 \pm 0,03$ GA/g cao chiết (trong dung môi ethanol 80%), $107,41 \pm 0,003$ GA/g cao chiết (trong dung môi methanol 80%) (Ouerfelli *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu của Fatima và đồng tác giả (2020), dịch chiết lá neem trong các dung môi hữu cơ khi sử dụng phương pháp soxhlet ghi nhận hàm lượng phenolic đạt từ 6,64 - 13,54 mg GA/g chiết xuất. Đặc biệt khi sử dụng ethanol (50 - 80%), hàm lượng phenolic chỉ đạt từ 6,64 - 12,27 mg GA/g chiết xuất (Fatima *et al.*, 2020). Kết quả trong nghiên cứu này, dịch chiết lá neem trong ethanol 70 và ethanol 96 với sự hỗ trợ của sóng siêu âm ghi nhận với hàm lượng phenolic lần lượt đạt 66,45 và 74,78 mg GA/g cao chiết và hàm lượng flavonoid là 15,92 và 30,92 mg QE/g cao chiết. Qua đó cho thấy quá trình ly trích có hỗ trợ sóng siêu âm cho hiệu quả thu nhận hoạt chất sinh học cao hơn so với phương pháp truyền thống là soxhlet, ngâm chiết hay ly trích lỏng điều áp.

Trong nghiên cứu này, chiết xuất lá neem với nước không cho thấy hoạt tính kháng khuẩn (không ghi nhận vòng vô khuẩn), chiết xuất với ethanol 70 và ethanol 96 cho thấy hoạt tính kháng khuẩn mạnh (vòng vô khuẩn rộng) và ức chế nhóm vi khuẩn Gram dương tốt hơn nhóm vi khuẩn Gram âm. Kết quả này cũng được báo cáo trong các nghiên cứu của Aslam *et al.*, 2009; Brindha *et al.*, 2012; Muhammad *et al.*, 2019; Fatima *et al.*, 2020... Trong nghiên cứu của Brindha và đồng tác giả (2012), chiết xuất lá neem trong methanol đã được ghi nhận hoạt tính kháng lại các vi khuẩn *B. pumilus*, *P. aeruginosa* và *S. aureus* với bán kính vòng kháng khuẩn đạt 6 - 10 mm. Thử nghiệm trên *E. coli* không ghi nhận vòng kháng khuẩn (Brindha *et al.*, 2012). Trong một nghiên cứu khác, chiết xuất neem với dung môi methanol bằng phương pháp ngâm gần như không ghi nhận vòng vô khuẩn trên các loại vi khuẩn khảo sát (Al-Jadidi, Hossain, 2015). Dịch chiết lá neem trong ethanol ghi nhận ức chế các vi khuẩn Gram âm và Gram dương ở nồng độ từ 100 - 125 mg/mL (Muhammad *et al.*, 2019). Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy dịch chiết lá neem với ethanol tác động lên nhóm vi khuẩn Gram dương mạnh hơn nhóm Gram âm. Trong nghiên cứu của Rutanga và đồng tác giả (2015), chiết xuất lá neem trong ethanol cho thấy hiệu quả kháng *S. aureus* (bán kính vòng vô khuẩn từ 6 - 11 mm), tuy nhiên không ghi nhận hiệu quả kháng khi thử nghiệm trên *E. coli* (Rutanga *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu của Fatima và đồng tác giả (2020) cho thấy bán kính vòng vô khuẩn khi thử nghiệm trên *S. aureus* là 13 mm, khi thử nghiệm trên *E. coli* và *Pseudomonas* lần lượt đạt 12 và 11 mm. Giá trị MIC của các chiết xuất từ lá neem trên các vi khuẩn gây bệnh phổ biến đã được nhiều nhà khoa học khảo sát và công bố. Năm 2014, Parveen và đồng tác giả đã khảo sát và cho thấy chiết xuất lá neem trong ethanol cho thấy khả năng ức chế lại *Klebsiella* và *Salmonella* với MIC lần lượt tại 12,5 mg/mL và 6,5 mg/mL tuy nhiên không ghi nhận được khả năng ức chế lại *S. aureus* (Parveen *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu của Yuvaneswaran và đồng tác giả (2014), ghi nhận giá trị MIC lần lượt là 25 mg/mL (dịch chiết lá Neem trong acetone) và 10 mg/mL (chiết lá Neem trong chloroform) với vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa* (Yuvaneswaran, Nyet Kui, 2014). Năm 2019, Ugwu và đồng tác giả ghi nhận giá trị MIC của dịch chiết lá neem trên *E. coli* và *S. aureus* là 3,125 mg/mL và trên *P. aeruginosa* (ATCC 27853) là 6,25 mg/mL (Ugwu, 2019). Tùy vào dung môi hay các điều kiện chiết xuất khác nhau mà giá trị MIC của chiết xuất lá neem sẽ có sự khác biệt, trong nghiên cứu này giá trị MIC ghi nhận trên vi khuẩn *C. diphtheriae*; *S. aureus* và *P. aeruginosa* lần lượt là 1; 5 và 25 mg/mL. Giá trị MIC ghi nhận trong nghiên cứu cho thấy sự tương đồng và thấp hơn một số nghiên cứu khác đã công bố qua đó cho thấy ly trích bằng ethanol có hỗ trợ của sóng siêu âm là kỹ thuật hiệu quả để thu nhận hợp chất có hoạt tính và tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm.

KẾT LUẬN

Chiết xuất lá neem có hỗ trợ của sóng siêu âm trong dung môi ethanol cho thấy có hoạt tính kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm (trừ vi khuẩn *E. coli*). Chiết xuất với ethanol 70 cho hoạt tính mạnh hơn so với ethanol 96. Chiết xuất trong nước cất không ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn. Nồng độ phenolic và flavonoid tổng trong dịch chiết với dung môi ethanol 96 và ethanol 70 lần lượt đạt 30,92 mg QE/g chiết xuất; 74,78 mg GA/g chiết xuất và 15,92 mg QE/g chiết xuất; 66,45 mg GA/g chiết xuất. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) khi thử nghiệm dịch chiết LN-E₇₀ trên các chủng được ghi nhận tại 1; 5 và 25 mg/mL lần lượt trên các chủng *C. diphtheriae*; *S. aureus* và *P. aeruginosa*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Jadidi HSK, Hossain MA (2015). Studies on total phenolics, total flavonoids and antimicrobial activity from the leaves crude extracts of neem traditionally used for the treatment of cough and nausea. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci* 4(2): 93-98.
- Aslam FK Rehman, M Asghar, M Sarwar (2009). Antibacterial activity of various phytoconstituents of Neem. *Pak J Agri Sci* 46(3): 209.
- Barbosa AM, Santos KS, Muniz AV, Borges GR, Franceschi E, Oliveira BB, Padilha FF, Dariva C (2017). Pressurized liquid extraction of phenolic and flavonoid compounds from neem leaves. *IX Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada e V Escola de Termodinâmica*.
- Brindha S, Maragathavalli S, Kaviyarasi N, Annadurai B, Gangwar S (2012). Antimicrobial activity in leaf extract of neem (*Azadirachta indica* linn). *Int J Sci Nat* 3(1): 110-113.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10(3).
- Dhaliwal G, Arora R, Koul O (2004). Neem research in Asian continent: Present status and future outlook. *Neem: Today and in the new millennium, Springer*: 65-96.
- Fatima A, Malik T, Ibrahim I, Nadeem SG (2020). 17. Phytochemical screening and antibacterial activity of neem extracts on uropathogens. *Pure Appl Biol* 9(1): 148-153.
- Herrera-Calderon O, Ejaz K, Wajid M, Shehzad M, Tinco-Jayo JA, Enciso-Roca E, Franco-Quino C, Yuli-Posadas RÁ, Chumpitaz-Cerrate V (2019). *Azadirachta indica*: Antibacterial activity of neem against different strains of bacteria and their active constituents as preventive in various diseases. *Pharmacogn J* 11(6s).
- Hossain MA, Al-Toubi WA, Weli AM, Al-Riyami QA, Al-Sabahi JN (2013). Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem. *J Taibah Univ Sci* 7(4): 181-188.
- Kiassos E, Mylonaki S, Makris DP, Kefalas P (2009). Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innov Food Sci Emerg Technol* 10(2): 246-252.
- Koehn FE (2008). High impact technologies for natural products screening. *Natural Compounds as Drugs Volume I, Springer*: 175-210.
- Li, HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 102(3): 771-776.
- Madhavi D, Salunkhe D (1995). Toxicological aspects of food antioxidants. *Food antioxidants, CRC Press*: 281-374.
- Muhammad A, Lawan I M, Abubakar A, Dangora I (2019). Antimicrobial Activity of *Azadirachta indica* (Neem) Leave Extract Against Some Clinical Isolates. *Dutse J Pure Appl Sci* 5: 97-104.
- Nguyen T, Nguyen MT, Cuong N, Tai N, Ly N, Huyền L, Phi Phuong N, Nguyễn L (2018). Optimization of extraction methods for quercetin from shallot skin. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 12(97): 57-61.
- Ouerfelli M, Villasante J, Ben Kaâb LB, Almajano M (2019). Effect of Neem (*Azadirachta indica* L.) on lipid oxidation in raw chilled beef patties. *Antioxidants* 8(8): 305.
- Parkavi V, Vignesh M, Selvakumar K, Mohamed JM, Ruby JJ (2012). Antibacterial activity of aerial parts of *imperata cylindrica* (l) Beauv. *Int J Pharm Sci Drug Res* 4(3): 209-212.
- Parveen F, Banna QR, Iqbal MJ (2014). Growth inhibitory effect of ethanolic neem leaves extract on *Klebsiella*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. *Bangladesh J Pharmacol* 9(3): 347-350.
- Pellegrini N, Colombi B, Salvatore S, Brenna OV, Galaverna G, Del Rio D, Bianchi M, Bennett RN, Brighenti F (2007). Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *J Sci Food Agric* 87(1): 103-111.
- Rababah TM, Banat F, Rababah A, Ereifej K, Yang W (2010). Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. *J Food Sci* 75(7): C626-632.
- Rutanga JP, Uwimbabazi F, Uwimana J (2015). Assessment of antibacterial activity of Neem plant (*Azadirachta indica*) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Med Plants Stud* 3 (4): 85-91.
- Shewale S, Rathod VK (2018). Extraction of total phenolic content from *Azadirachta indica* or (neem) leaves: Kinetics study. *Prep Biochem Biotechnol* 48(4): 312-320.
- Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16(3): 144-158.
- Ugwu C (2019). Antimicrobial Activity of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf Extract on Some Bacteria. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 8(7): 431-437.
- Vermani K, Garg S, Zaneveld LJ (2002). Assemblies for in vitro measurement of bioadhesive strength and retention characteristics in simulated vaginal environment. *Drug Dev Ind Pharm* 28(9): 1133-1146.
- Yuvaneswaran K, Nyet Kui W (2014). Cytotoxicity and antimicrobial properties of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. *Int J Pharm Pharm Sci* 7(2).

RECEIVED AND EVALUATING THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEEM LEAF EXTRACT (*Azadirachta indica*) BY ULTRASOUND-ASSISED

Hoang Thuy Duong, Ngo Hong Loan, Phan Thi Kim Ngan, Lam Hoang Anh Thu, Pham Tien Dung, Ngo Vo Ke Thanh, Nguyen Huu Tuyen*

Research Laboratories of Saigon Hi-Tech Park

SUMMARY

In this study, neem leave ingredients were extracted by the ultrasound-assised method using ethanol and water solvents. Total phenolic and total flavonoid contents were determined. The antimicrobial activity of extracts from the leaves of Neem was determined by the Minimum Inhibitory concentration (MIC). The obtained results of this study have indicated that the extract in ethanol 96 showed a higher total phenolic and flavonoid contents than in ethanol 70. The extracts in ethanol 70 showed significant activity against bacterial strains. The MIC of the LN-E₇₀ extract was at 5 mg/mL for *S. aureus*, at 25 mg/mL for *P. aeruginosa* and at 1 mg/mL for *C. diphtheriae*. However, *E. coli* did not show any resistant signal at all the tested concentrations. In conclusion, Neem leaf extract by ultrasound-assisted method has shown biological activity.

Keywords: Neem leaf, *Azadirachta indica*, antimicrobial, ultrasound-assisted method.

* Author for corresspondence: Tel: +84-98589.4656, Email: tuyen.nguyenhuu@shtplabs.org