

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT POLYPHENOL TỔNG TỪ CAO CHIẾT LÁ TÀU BAY *Crassocephalum crepidioides*

Đoàn Thiên Thanh*, Chu Thị Thanh Vy

Khoa Khoa học ứng dụng, Đại học Tôn Đức Thắng

TÓM TẮT

Cây Tàu bay (*Crassocephalum crepidioides*) là loại dược liệu quý với nhiều công dụng được sử dụng phổ biến tại Việt Nam. Tuy nhiên, hiện nay các nghiên cứu về loài cây này còn khá hạn chế, đặc biệt là hàm lượng polyphenol, nhóm hợp chất sinh học chính trong lá Tàu bay. Nghiên cứu này đã tối ưu hóa được quy trình tách chiết polyphenol từ lá Tàu bay để thu được hàm lượng polyphenol tổng số hiệu quả nhất thông qua khảo sát sự tương tác giữa các yếu tố như nồng độ dung môi ethanol, tỷ lệ giữa dung môi và chất khô, thời gian tách chiết bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methodology-RSM). Bên cạnh đó, hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn của cao chiết cũng được khảo sát. Kết quả tối ưu bằng thiết kế RSM – BBD cho thấy tại điều kiện dung môi ethanol 78,48% với tỷ lệ giữa dung môi và nguyên liệu là 4,58/1 (mL/g) trong 11,36 giờ ở nhiệt độ phòng, hàm lượng polyphenol của cao chiết thu được là $63,24 \pm 0,39$ (mgGA/g cao chiết). Đồng thời, cao chiết còn cho hoạt tính kháng oxy hóa khá cao với giá trị IC_{50} là $26,84 \pm 0,22$ ($\mu\text{g/mL}$). Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết cũng được thể hiện qua khả năng kháng lại vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* với giá trị MIC lần lượt là 5 và 8 (mg/mL). Do đó có thể thấy cao chiết lá Tàu bay có hoạt tính sinh học cao và cần sự quan tâm nghiên cứu sâu hơn để nâng cao giá trị của loại dược liệu tiềm năng này.

Từ khóa: *Crassocephalum crepidioides*, polyphenol, tối ưu hóa, RSM-BBD, kháng oxy hóa, kháng khuẩn.

MỞ ĐẦU

Cây Tàu bay (*Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore) hay còn gọi là Kim thất, Ngải rét, ... là cây rau dại ưa ẩm, được phân bố rộng rãi khắp các địa phương tại nước ta. Trong dân gian, Tàu bay được biết đến như một loài thực vật được sử dụng để điều trị một số bệnh trong dân gian như tiêu viêm, tán uất, tiêu hòn cục, cầm máu, sát trùng... Một số nghiên cứu trước đây cho thấy loài cây có nhiều lợi ích cho sức khỏe như kháng viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, làm lành vết thương, chống đông máu (Awang-Kanak *et al.*, 2019; Can *et al.*, 2020; Karki *et al.*, 2021; Opeyemi *et al.*, 2020). Cụ thể, chiết xuất hydroethanolic từ lá Tàu bay có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, tăng sinh nguyên bào sợi, co vết thương và hình thành mạch (Can *et al.*, 2020). Ngoài ra, trong cao chiết lá Tàu Bay còn có sự hiện diện của một số hợp chất sinh học khác nhau bao gồm hexadecenoic methyl este và axit α -Linolenic với các đặc tính hạ cholesterol; benzofuranone và benzofuran có khả năng chống ung thư và kháng khuẩn (Karki *et al.*, 2021). Các nhóm hợp chất phenolic và flavonoid với các hoạt tính kháng oxy hóa, kháng viêm và kháng nấm cũng được tìm thấy trong lá Tàu bay (Opeyemi *et al.*, 2020). Tuy nhiên, các nghiên cứu hoạt tính sinh học và hợp chất của cây Tàu bay nhìn chung vẫn còn hạn chế.

Thông thường, khi tối ưu hóa các thông số cho nghiên cứu thực nghiệm, các nhà khoa học thường dùng phương pháp cổ điển là tối ưu các đơn yếu tố. Tuy nhiên, phương pháp này có một số giới hạn, chính là không thể hiện cụ thể sự tương tác giữa các thông số với nhau và tổng số thí nghiệm thực hiện tăng khi số lượng khảo sát tăng. Để khắc phục nhược điểm đó, phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methodology – RSM) đã được ứng dụng trong quá trình tối ưu hóa các thông số thực nghiệm và cho hiệu quả cao. RSM bao gồm một nhóm các thuật toán và xử lý thống kê dựa trên sự phù hợp của các mô hình thực nghiệm với dữ liệu thực nghiệm thu được liên quan đến thiết kế thử nghiệm. Từ đó cho phép nghiên cứu sự tương tác giữa các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của quy trình nghiên cứu và đưa ra dự đoán về giá trị tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng. Phương pháp này đang được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu, đặc biệt là các quá trình tách chiết hợp chất nhằm tối ưu hóa được số lượng thí nghiệm và nâng cao hiệu suất tách chiết hợp chất mong muốn (Bezerra *et al.*, 2008).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng thiết kế Box – Behnken (RSM-BBD) cơ bản trong phương pháp RSM (Bezerra *et al.*, 2008) để tối ưu hóa các điều kiện tách chiết có thể ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol có trong lá Tàu bay sau khi đã khảo sát với từng đơn yếu tố như nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi và nguyên liệu, và thời gian chiết. Đồng thời, tiến hành khảo sát khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* từ cao chiết tối ưu đã thu được. Từ đó cung cấp thêm những dữ liệu khoa học về hoạt tính sinh học của loại dược liệu tiềm năng này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Lá Tàu bay được thu hái tại xã Liên Hiệp, huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng vào tháng 5/2022. Mẫu lá được định danh và lưu trữ tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Khoa học Ứng dụng, trường Đại học Tôn Đức Thắng theo mã định danh LCC1024. Lá Tàu bay sau khi thu hái sẽ được rửa sạch với nước để loại bỏ tạp chất và sấy khô ở nhiệt độ 55°C cho đến khối lượng không đổi (từ 2-3 ngày), xay nhuyễn và bảo quản kín gió ở 30-35°C. Bột lá khô sau đó được đem tách chiết với ethanol theo các yếu tố khảo sát bao gồm: nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi, thời gian thích hợp theo mô hình thiết kế thí nghiệm RSM-BBD.

Phương pháp nghiên cứu

Định lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng số có trong mẫu cao chiết được xác định bằng phương pháp Folin – Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). 1 mL mẫu (chất chuẩn acid gallic hoặc mẫu thử) vào ống nghiệm đã có sẵn 6 mL nước cất, lắc đều sau đó thêm 0,5 mL thuốc thử Folin – Ciocalteu 10%. Lắc đều, để yên các mẫu ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó, thêm 1,5 mL dung dịch Na_2CO_3 7% vào các ống nghiệm, lắc đều, thêm 1 mL nước cất. Để các mẫu ở nhiệt độ phòng trong tối 30 phút. Cuối cùng, đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 760 nm. Hàm lượng polyphenol tổng số chứa trong mẫu cao chiết được thể hiện bằng hàm lượng gallic acid đương lượng (GA) và được tính bằng công thức:

$$\text{TPC} = \frac{x}{C_{\text{ban đầu}}} \times F \quad (1)$$

Trong đó: TPC là hàm lượng polyphenol tổng số (mgGA/g cao chiết); x là nồng độ polyphenol tính được theo đường chuẩn gallic acid ($y = 0.0129x + 0.0668$, $R^2 = 0.9905$) ($\mu\text{g/mL}$); $C_{\text{ban đầu}}$ là nồng độ mẫu ban đầu (mg/mL); F là độ pha loãng.

Tối ưu hóa quá trình tách chiết polyphenol bằng phương pháp RSM

Sau khi các biến được sàng lọc thông qua các thí nghiệm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tách chiết của lá tàu bay, tiến hành lựa chọn kiểu thiết kế thí nghiệm phù hợp. Mô hình RSM-BBD (Box–Behnken Design) được sử dụng cho ba biến độc lập với ba cấp bậc: Nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu, thời gian tách chiết (Bezerra *et al.*, 2008). Từ đó, tìm ra khoảng giới hạn của các yếu tố (Bảng 1), sử dụng phần mềm thống kê minitab để chạy mô hình RSM-BBD dự đoán sự ảnh hưởng và tối ưu của các biến.

Bảng 1. Các yếu tố mã hóa được sử dụng trong mô hình RSM-BBD

Biến thực	Biến mã hóa	Đơn vị	Mức nghiên cứu		
			-1	0	1
Nồng độ ethanol	X_1	%	70	80	90
Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu	X_2	mL/g	3/1	5/1	7/1
Thời gian chiết	X_3	giờ	9	12	15

Hàm lượng polyphenol tổng trong cao chiết được kí hiệu là Y, đơn vị là mgGA /g cao chiết. Mô hình được biểu diễn bằng phương trình bậc 2 như sau:

$$Y = B_1X_1^2 + B_2X_2^2 + B_3X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_0$$

Trong đó: B_1, B_2, B_3 : là các hệ số bậc 1.

B_{11}, B_{22}, B_{33} : là các hệ số bậc 2.

B_{12}, B_{13}, B_{23} : là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố.

B_0 : là hệ số tự do.

$X_1, X_2, X_3, X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{12}, X_{13}, X_{23}$: là các biến độc lập.

Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp DPPH

Hoạt tính kháng oxy hóa được thực hiện theo phương pháp DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Villaño *et al.*, 2007). Cụ thể, Hút 1 mL dịch chiết mẫu từ dãy nồng độ pha loãng cho lần lượt vào các ống nghiệm, tiếp theo đó thêm vào 1 mL DPPH 0,06 mM, đậy kín và ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút. Thao tác tương tự đối với mẫu đối chứng âm (methanol 70%) và mẫu đối chứng dương (vitamin C). Đo OD của dung dịch ở bước sóng 517 nm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Giá trị OD phản ánh khả năng kháng oxy hóa của mẫu. Phần trăm hoạt tính kháng oxy hóa được xác định theo công thức sau:

$$\% = \frac{\text{OD chuẩn} - \text{OD mẫu}}{\text{OD chuẩn}} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó: 1%: phần trăm ức chế gốc DPPH; OD_{chuẩn}: Giá trị mật độ quang OD của dung dịch chuẩn; OD_{mẫu}: Giá trị mật độ quang OD của dung dịch mẫu. Tỷ lệ % hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, xây dựng phương trình đường chuẩn, từ đó xác định giá trị IC₅₀ (là nồng độ mà tại đó bắt 50% gốc tự do DPPH) để làm cơ sở so sánh khả năng kháng oxy hóa của cao chiết. Giá trị IC₅₀ càng thấp thì hoạt tính kháng oxy hóa càng cao và ngược lại.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết trên 02 chủng vi khuẩn *S. aureus* CC59 và *E. coli* 0145 được xác định dựa vào nồng độ ức chế tối thiểu (MIC – minimum inhibitory concentration) (Ngan *et al.*, 2017). Cao chiết đã được tối ưu hóa theo mô hình RSM-BBD được pha loãng trong dung dịch DMSO thành các nồng độ khảo sát từ 10-100 mg/mL. Dịch vi khuẩn được pha loãng sao cho mật độ đạt 10⁸ CFU/mL. Mỗi eppendorf chứa 50 µL môi trường LB lỏng, 10 µL cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau trong dung dịch DMSO và 40 µL dịch vi khuẩn. Mẫu blank bao gồm 50 µL môi trường LB lỏng, 10 µL cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau trong DMSO và 40 µL nước muối sinh lý. Các mẫu thử nghiệm và đối chứng sau đó được ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, thêm 20 µL resazurin 0,001% vào mỗi eppendorf. Quan sát sự thay đổi màu, ghi nhận giá trị MIC. Chất chỉ thị resazurin có màu xanh trong dung dịch. Những eppendorf có sự đổi màu của dung dịch resazurin từ màu xanh sang màu hồng cho thấy có sự phát triển của vi khuẩn trong giếng. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được định nghĩa là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm của cao chiết thực vật có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (không làm đổi màu resazurin).

Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích và xử lý thống kê theo phương pháp RSM- BBD bằng phần mềm Minitab (Minitab® phiên bản 19.2020.1, Minitab LLC, State College, PA, USA). Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm OriginLab (OriginLab 2022, OriginLab Corporation, Northampton, USA). Số liệu được biểu diễn dưới dạng $X \pm SD$ (X: giá trị trung bình của mẫu thử, SD: độ lệch chuẩn).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng

Trong các nghiên cứu đã được công bố trước đó thì chưa tìm thấy đề tài nào đi sâu vào tối ưu hóa điều kiện tách chiết polyphenol trong lá Tàu bay. Và trong nghiên cứu này, phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) được sử dụng để tối ưu hóa điều kiện tách chiết polyphenol từ cao chiết ethanol của lá Tàu bay cho ra kết quả phương trình tương quan giữa các yếu tố với các biến mã hóa như sau:

$$Y = -229 + 6,78X_1 + 12,03X_2 - 0,64X_3 - 0,0546X_1^2 - 1,536X_2^2 - 0,865X_3^2 - 0,1137X_1X_2 + 0,202X_1X_3 + 0,960X_2X_3 + 0,960X_2X_3$$

Trong đó: Y là hàm lượng polyphenol tổng (mgGA/g cao chiết); X₁ là nồng độ dung môi ethanol (%); X₂ là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g); X₃ là thời gian chiết (giờ).

Với hệ số hồi quy (R²) là 95,16%; điều này có nghĩa là có 95,16% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán từ mô hình. Bên cạnh đó, sự thiếu phù hợp của mô hình (0,098>0,05) không có ý nghĩa về mặt thống kê cho thấy phương trình hồi quy có sự tương thích với kết quả thực nghiệm.

Bảng 2. Mối tương quan tuyến tính giữa các yếu tố tách chiết polyphenol tổng từ lá Tàu bay

Biến số	Hệ số tương tác	SS chuẩn	Giá trị T	Giá trị P
Hằng số	60,39	1,60	37,84	0,000*
X1	-0,872	0,977	-0,89	0,413
X2	-1,796	0,977	-1,84	0,126
X3	-1,105	0,977	-1,13	0,310
X1*X1	-5,46	1,44	-3,79	0,013*
X2*X2	-6,14	1,44	-4,27	0,008*
X3*X3	-7,78	1,44	-5,41	0,003*
X1*X2	-2,27	1,38	-1,65	0,161
X1*X3	6,09	1,38	4,40	0,007*
X2*X3	5,76	1,38	4,17	0,009*

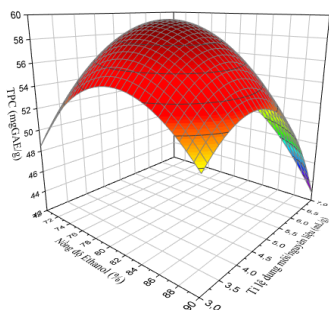
*** cho biết giá trị có ý nghĩa về mặt thống kê (p<0,05).

Kết quả thể hiện trong Bảng 2 cho thấy hàm lượng polyphenol được tách chiết từ lá Tàu bay chịu ảnh hưởng bởi cả 3 yếu tố (nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian chiết) ở bậc 2, với p ≤ 0,05 thể hiện giá trị

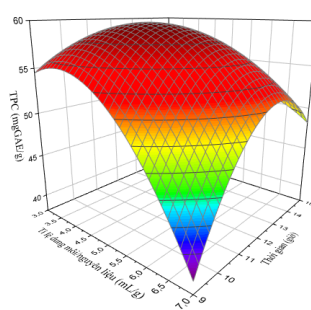
có ý nghĩa về mặt thống kê. Cụ thể là khi tăng giá trị các đơn yếu tố về nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và nhiệt độ lên một khoảng thích hợp thì hàm lượng polyphenol cũng tăng theo. Sự tương quan giữa kết quả thực nghiệm và mô hình dự đoán được thể hiện qua Bảng 3. Từ đó, cho thấy kết quả thực tế có độ tin cậy cao so với mô hình, vì vậy có thể sử dụng mô hình này để xác định điều kiện tối ưu tách chiết polyphenol từ lá Tàu bay và cho các đối tượng khác.

Bảng 3. Kết quả thực nghiệm và dự đoán từ mô hình RSM-BBD

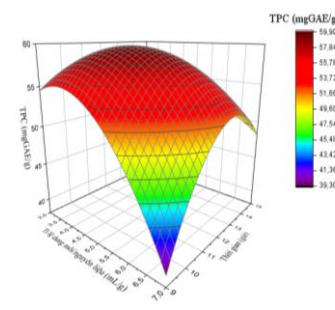
NT	Biến số thực			TPC (mg GA/g cao chiết)	
	X ₁ (%)	X ₂ (mL/g)	X ₃ (giờ)	Thực nghiệm	Mô hình
1	70	3/1	12	47,111	49,185
2	90	3/1	12	53,571	51,988
3	70	7/1	12	48,558	50,141
4	90	7/1	12	45,922	43,849
5	70	5/1	9	58,067	55,212
6	90	5/1	9	40,496	41,297
7	70	5/1	15	41,633	40,832
8	90	5/1	15	48,403	51,258
9	80	3/1	9	54,346	55,128
10	80	7/1	9	38,739	40,012
11	80	3/1	15	42,667	41,394
12	80	7/1	15	50,109	49,327
13	80	5/1	12	59,256	60,394
14	80	5/1	12	61,514	60,394
15	80	5/1	12	60,411	60,394



(A) Nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu



(B) Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian



(C) Nồng độ ethanol và thời gian

Hình 1. Bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương quan của các cặp yếu tố đến hàm lượng polyphenol trong cao chiết Tàu bay

Phương trình hồi quy còn được sử dụng để thiết lập các bề mặt đáp ứng, thể hiện sự tương tác giữa các cặp yếu tố (nồng độ dung môi với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu với thời gian chiết và nồng độ dung môi với thời gian chiết) đến hàm lượng polyphenol tách chiết được từ lá Tàu bay. Hình 1A thể hiện sự ảnh hưởng của cặp yếu tố nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng polyphenol tách chiết được từ lá Tàu bay. Khi tăng riêng lẻ nồng độ ethanol từ 74% đến khoảng 80% và tỷ lệ khoảng từ 4/1 mL/g đến 4,5/1 mL/g thì hàm lượng chiết được cũng tăng đến lượng xấp xỉ 60,7708 mgGA/g cao chiết. Nhưng khi tiếp tục tăng nồng độ ethanol hoặc lượng dung môi/ nguyên liệu riêng lẻ thì hàm lượng polyphenol có xu hướng giảm đi khá nhiều (khoảng 10 mgGA/g cao chiết). Tuy nhiên, khi kết hợp giữa 02 yếu tố trên thì hàm lượng polyphenol cao nhất đạt 59,70 mgGA/g cao chiết lại không có khác biệt đáng kể. Vì thế, cặp yếu tố nồng độ ethanol – tỷ lệ dung môi/nguyên liệu thông qua phân tích phương sai ($p \leq 0,05$) cũng không có ý nghĩa tương tác.

Ảnh hưởng của cặp yếu tố tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian đến lượng polyphenol tách chiết từ lá Tàu bay được thể hiện qua Hình 1B. Kết quả cho thấy khi tăng tỷ lệ nguyên liệu đến khoảng 4,5/1 mL/g và thời gian ngâm khoảng 12 giờ thì hàm lượng polyphenol cũng tăng theo và đạt gần 60 mgGA/g cao chiết, điều đó cho thấy 2 yếu

tổ này tỷ lệ thuận với hàm lượng polyphenol tách chiết được. Tuy nhiên khi càng tăng tỷ lệ và thời gian ngâm thì hàm lượng polyphenol lại giảm mạnh (gần 20 mgGA/g cao chiết) chỉ còn 39,3 mgGA/g cao chiết. Điều này cũng phù hợp với kết quả khảo sát tỷ lệ và thời gian trước đó.

Tương tự như cặp yếu tố tỷ lệ và thời gian thì nồng độ ethanol và thời gian cũng ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng polyphenol tách chiết được với phân tích phương sai ($p \leq 0,05$) có ý nghĩa về mặt thống kê. Cụ thể là khi tăng thời gian ngâm thì các hợp chất khác ngoài polyphenol cũng được tách chiết và tan vào dung môi làm hạn chế tính thấm của dung môi chiết (Toma *et al.*, 2001). Và khi tăng nồng độ dung môi thì độ phân cực của dung môi cũng thay đổi theo nên khi tăng nồng độ dung môi từ 70% lên khoảng 78% thì hàm lượng polyphenol đạt cực đại khoảng 59,7 (mgGA/g cao chiết) nhưng khi tăng nồng độ lên đến 90% thì hàm lượng giảm khá đáng kể. Kết quả từ hình 1C cho thấy hàm lượng polyphenol thấp nhất là khoảng 39,9 (mgGA /g cao chiết) ở nồng độ dung môi 90% và thời gian chiết là 15 giờ.

Theo dự đoán từ mô hình, hàm lượng polyphenol đạt tối đa là 60,7708 (mgGA/g cao chiết) tương ứng với các điều kiện tối ưu như sau: nồng độ dung môi ethanol (X_1) là 78,4848% ; tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 4,5758/1 (mL/g) và thời gian chiết là 11,3636 giờ. Để kiểm tra kết quả của mô hình, chúng tôi tiến hành thí nghiệm với các giá trị dự đoán để thu hàm lượng polyphenol cực đại với điều kiện tiệm cận là nồng độ ethanol 78,48% ; tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 4,58/1 (mL/g) và thời gian chiết là 11,36 giờ. Hàm lượng polyphenol thu được từ kết quả thực nghiệm là $63,235 \pm 0,39$ mgGA/g cao chiết với sai số không vượt quá 5% so với kết quả dự đoán từ mô hình. Vì vậy cho thấy sự tương quan chặt chẽ giữa hai kết quả tính toán giúp khẳng định tính chính xác của mô hình và sự tồn tại của điểm tối ưu. Qua nghiên cứu, có thể thấy sự tương tác qua lại giữa các yếu tố đến khả năng tách chiết polyphenol khi sử dụng phương pháp RSM. Từ đó, áp dụng các thông số này vào thực nghiệm để tối ưu về kinh tế và thời gian cho người thực hiện.

Hoạt tính kháng oxy của cao chiết lá tàu bay

Hoạt tính kháng oxy hóa của Vitamin C và cao chiết được thể hiện thông qua Bảng 4, với giá trị IC_{50} của vitamin C là $2,418 \pm 0,15$ $\mu\text{g/mL}$ và của cao chiết là $26,837 \pm 0,22$ $\mu\text{g/mL}$ cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết khá cao mặc dù thấp hơn so với vitamin C khoảng 11,1 lần. Theo Kähkönen và đồng tác giả (1999), những loại thực vật có hàm lượng polyphenol lớn hơn 20 mgGA/g, được xem là có hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Với hàm lượng polyphenol khoảng 63,235 mgGA /g cao chiết, các hợp chất kháng oxy hóa có trong cao chiết đã trung hòa các gốc tự do DPPH khá tốt với nồng độ khá thấp (giá trị $IC_{50} = 26,837 \pm 0,22$ $\mu\text{g/mL}$). Theo Awang-Kanak và đồng tác giả (2019) khi tiến hành khảo sát khả năng kháng oxy hóa của cao chiết lá tàu bay từ Kota Belud, Sabah thuộc Malaysia từ ethanol, nước nóng và nước cất, giá trị IC_{50} lần lượt là $180,39 \pm 1,94$; $386,84 \pm 0,96$ và $659,61 \pm 0,87$ $\mu\text{g/mL}$. Một nghiên cứu khác của Karki và đồng tác giả (2021) cho thấy giá trị IC_{50} của cao chiết lá tàu bay bằng methanol có nguồn gốc từ Nepal là 6,95 $\mu\text{g/mL}$, chỉ thấp hơn IC_{50} của vitamin C (4,21 $\mu\text{g/mL}$) khoảng 1,65 lần. Sở dĩ kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa từ lá tàu bay của nghiên cứu này và những nghiên cứu trước đây có sự khác nhau có thể là do điều kiện môi trường, khí hậu và thổ nhưỡng khác nhau. Ngoài ra, điều kiện và phương pháp tách chiết khác nhau cũng có thể là một trong những nguyên nhân ảnh hưởng đến khả năng kháng oxy của cao chiết. Kết quả nghiên cứu này cho thấy lá tàu bay *C. crepidioides* có chứa các hợp chất kháng oxy hóa khá mạnh.

Bảng 4. Khả năng bắt gốc tự do DPPH của vitamin C và cao chiết lá tàu bay

Mẫu	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Phương trình
Vitamin C	$2,418 \pm 0,15$	$y = 19,614x + 2,5371$ ($R^2 = 0,989$)
Cao ethanol Tàu bay	$26,837 \pm 0,22$	$y = 1,7155x + 3,9616$ ($R^2 = 0,9885$)

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá tàu bay

Kết quả ở Bảng 5 dựa vào phản ứng màu của thuốc thử resazurin, cho thấy giá trị MIC của cao chiết đối với chủng vi khuẩn *S. aureus* là 5 mg/mL vì tại nồng độ này không có sự chuyển màu từ xanh sang hồng chứng tỏ không có sự phát triển của vi khuẩn. Trong khi đó, với chủng vi khuẩn *E. coli* thì giá trị MIC đạt tại nồng độ cao chiết là 8 mg/mL, điều này chứng tỏ cao chiết có khả năng kháng lại chủng vi khuẩn gram dương *S. aureus* tốt hơn so với chủng vi khuẩn gram âm là *E. coli*. Tuy nhiên, hoạt tính kháng O2 chủng vi khuẩn này của cao chiết lá Tàu bay vẫn thấp hơn so với đối chứng dương là amoxicillin với giá trị MIC là 0.05 mg/mL. So với các nghiên cứu trước của Karki và đồng tác giả (2021) với giá trị MIC của cao chiết acetone và methanol lá tàu bay kháng lại vi khuẩn *S. aureus* lần lượt là 50 và 30 mg/mL, cao chiết lá tàu bay trong nghiên cứu này có hoạt tính kháng khuẩn cao hơn hẳn. Điều này có thể do hàm lượng hợp chất polyphenol trong cao ethanol tốt hơn so với các loại dung môi khác.

Bảng 5. Khả năng ức chế sinh trưởng vi khuẩn (MIC) của cao chiết lá tàu bay

Vi khuẩn	Cao Tàu bay (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	$5 < \text{MIC} < 4$
<i>E. coli</i>	$8 < \text{MIC} < 7$

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công tối ưu hóa được hàm lượng polyphenol tổng số từ cao ethanol của lá Tàu bay với giá trị là $63,235 \pm 0,39$ (mgGA/g cao chiết) tại điều kiện tách chiết tốt nhất là nồng độ ethanol 78,48% với tỷ lệ giữa dung môi và nguyên liệu là 4,58/1 (mL/g) trong 11,36 giờ ở nhiệt độ phòng. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết tối ưu hóa của lá Tàu bay khá cao với IC_{50} đạt $26,837 \pm 0,22$ $\mu\text{g/mL}$ và có khả năng kháng tốt ở cả 02 chủng vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli*. Các kết quả trên cho thấy việc sử dụng mô hình tối ưu hóa RSM-BBD sẽ có thể tối đa được hiệu suất cũng như số lượng các thí nghiệm trong nghiên cứu; góp phần đánh giá đúng hơn về sự tương quan giữa các yếu tố tách chiết ảnh hưởng đến hiệu suất chiết tách chất mang hoạt tính sinh học. Nghiên cứu này đã bước đầu cho thấy tiềm năng về dược tính của cao chiết từ lá Tàu bay; tuy nhiên, cần có thêm nhiều các nghiên cứu chuyên sâu trong tương lai để đánh giá toàn diện hơn về giá trị của cây này trong y học và đời sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Awang-Kanak F, Fadzelly M, Mohamed M (2019). Ethnobotanical note, total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidative activities of wild edible vegetable. *Crassocephalum crepidioides* from Kota Belud, Sabah. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 269(1): 012012.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76: 965–977.
- Can NM, Thao DTP, Gil G (2020). Wound healing activity of *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore. leaf hydroethanolic extract. *Oxid Med Cell Longev*, 2020(1): 2483187.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 47(10): 3954–3962.
- Karki A, Baral R, Karki S, Neupane B, Koirala P, Baral S, Panta S (2021). Phytochemical screening, free radical scavenging, and *In-vitro* anti-bacterial activity study of chloroform, acetone and methanol extracts of selected medicinal plants of nepal. *CUPMAP*. 4(1): 22-35.
- Ngan LTM, Dung PP, Nhi NVTY, Hoang NVM, Hieu TT (2017). Antibacterial activity of ethanolic extracts of some Vietnamese medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *AIP Conf Proc*, 1878: 020030.
- Opeyemi OA, Funmilayo DO, Omolaja RO (2020). Phytochemical profiling of the hexane fraction of *Crassocephalum crepidioides* Benth S. Moore leaves by GC-MS. *Afr J Pure Appl Chem*, 14(1), 1–8.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM(1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 152–178.
- Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem*, 8(2): 137–142.
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1): 230–235.

OPTIMIZING CONDITIONS FOR TOTAL POLYPHENOL EXTRACTION FROM *Crassocephalum crepidioides* LEAF EXTRACT

Doan Thien Thanh*, Chu Thi Thanh Vy

Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University

SUMMARY

Crassocephalum crepidioides is a precious herb with many potentials in traditional medicine in Vietnam. However, study on the plant species is still limited, particularly in polyphenol content, the major biological compounds in *C. crepidioides*. This study has optimized the extraction conditions from the leaves to obtain the most effective total polyphenol content by investigating the interaction between factors such as ethanol concentration, ratio between solvent and material (v/w), extraction time using response surface methodology (RSM). Besides, the antioxidant and antibacterial activities of the extract were also examined. The optimal result obtained by the RSM – Box Behnken design is 78.48% ethanol solvent with a solvent to material ratio of 4.58/1 (mL/g) for 11.36 hours at room temperature, the obtained polyphenol content of the extract was 63.24 ± 0.39 (mgGA/g extract). The extract also showed high antioxidant activity with IC_{50} value of 26.84 ± 0.22 ($\mu\text{g/mL}$). The antibacterial activity of the extract is also revealed against two bacteria strains, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with MIC values of 5 and 8 mg/mL, respectively. Therefore, it can be seen that *C. crepidioides* leaf extract has high biological activity and requires further research attention to improve the value of this potential medicinal herb.

Keywords: *Crassocephalum crepidioides*, total polyphenol content, optimization, RSM-BBD, antioxidant, antibacterial activity.

* Author for correspondence: Tel: 0905902096; Email: doanthienthanh@tdtu.edu.vn