

SÀNG LỌC HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ LÁ CHUỐI TIÊU THU HẢI TẶNG VĂN GIANG, HƯNG YÊN, VIỆT NAM

Nguyễn Trường Quốc Anh¹, Dương Minh Yên², Nguyễn Đức Huy², Hoàng Quốc Phương²,
 Nguyen Hoang Anh², Trịnh Thị Thúy², Hà Thị Dung³, Lục Quang Tấn⁴, Cao Thị Huệ^{2*}

¹Vinschool The Harmony, Phúc Đồng, Long Biên, Hà Nội

²Trường Đại học Thủy lợi, 175 Tây Sơn, Đống Đa, Hà Nội

³Trường Đại học Công nghiệp, 298 Cầu Diễn, Nam Từ Liêm, Hà Nội

⁴Phân hiệu Đại học Thái Nguyên tại tỉnh Hà Giang, phường Nguyễn Trãi, TP Hà Giang, tỉnh Hà Giang

TÓM TẮT

Cây chuối tiêu (*Musa acuminata* AAA) là một loài thực vật được trồng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới, quả được dùng làm thực phẩm dinh dưỡng hàng ngày ở nhiều quốc gia. Tại Việt Nam, lá chuối tiêu được dùng từ xa xưa để gói các loại bánh truyền thống và các sản phẩm chế biến từ thịt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tạo các cao chiết lá chuối tiêu với các dung môi khác nhau (cồn, cồn-nước tỉ lệ 7/3, 5/5) (E100, EW73, EW55); đánh giá hiệu suất, hàm lượng flavonoid và polyphenol cũng như sàng lọc hoạt tính sinh học của cao chiết. Hiệu suất của ba cao chiết với các dung môi tương ứng: cồn, cồn-nước tỉ lệ 7/3 và 5/5 lần lượt là 12,5; 9,7 và 7,8% (w/w). Hàm lượng polyphenol của cao chiết E100, EW73, EW55 lần lượt là 110,18; 52,37 và 26,47 mg/g, trong khi hàm lượng flavonoid có giá trị là 12,83; 21,57 và 12,32 mg/g. Giá trị EC₅₀ của hoạt tính chống oxy hóa tổng và quét gốc tự do DPPH của E100, EW73, EW55 có giá trị tương ứng là 353,19; 422,63; 561,84 µg/mL và 73,48; 81,53; 95,49 µg/mL. Cả ba cao chiết đều thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO với giá trị ức chế đạt 78,79-95,59% ở nồng độ 100 µg/mL; giá trị IC₅₀ của E100, EW73, EW55 lần lượt là 63,17; 50,29 và 54,44 µg/mL.

Từ khóa: Chống oxy hóa, hoạt tính sinh học, kháng vi sinh vật, lá chuối tiêu, ức chế sản sinh NO.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây chuối tiêu có tên khoa học là *Musa acuminata* AAA, là một loại cây trồng thuộc chi Musa và tất cả các loài của chi này đều là loài bản địa ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới. Loài chuối tiêu đã được trồng hơn 4000 năm và một số giống của nó là lương thực chủ yếu ở các vùng nhiệt đới trên thế giới. Chúng là những loại cây có chiều cao lên tới 9 mét và được sản xuất chủ yếu ở các khu vực châu Á, châu Phi và Nam Mỹ (Alabi *et al.*, 2013).

Ở nước ta, chuối là loại trái cây có diện tích và sản lượng cao. Do đặc điểm là loại cây ngắn ngày, nhiều công dụng và kỹ thuật canh tác đơn giản nên chuối được trồng ở rất nhiều nơi trong các vườn cây ăn trái và hộ gia đình. Với diện tích chiếm 19% tổng diện tích cây ăn trái của Việt Nam, hàng năm chuối tiêu cho sản lượng khoảng 1,4 triệu tấn. Tuy nhiên, diện tích trồng chuối lại không tập trung. Một số tỉnh miền Trung và miền Nam có diện tích trồng chuối khá lớn (Thanh Hóa, Nghệ An, Khánh Hòa, Đồng Nai, Sóc Trăng, Cà Mau có diện tích từ 3.000 ha đến gần 8.000 ha). Trong khi đó, các tỉnh miền Bắc có diện tích trồng chuối lớn nhất như: Hải Phòng, Nam Định, Phú Thọ...chưa đạt đến 3.000 ha. Tại tỉnh Hưng Yên, chuối được trồng ở các xã ven sông Hồng thuộc huyện Văn Giang như Thăng Lợi, Mễ Sở, hay xã Bình Minh, Hàm Tử thuộc huyện Khoái Châu.

Trên thế giới có rất nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của quả chuối và một số bộ phận của cây chuối. Nghiên cứu của nhóm tác giả Kappel và đồng tác giả (2013) đã chứng minh sự hiện diện của các chất chống oxy hóa như: flavonoid và rutin có trong các cao chiết thô. Nhóm tác giả Behiry và đồng tác giả (2019) cũng báo cáo rằng, trong chiết xuất cồn của lá chuối tiêu chứa nhiều hợp chất phenolic và flavonoid có khả năng chống oxy hóa, bao gồm: axit ellagic, axit gallic, rutin, myricetin và naringenin. Kết quả phân tích GC-MS chỉ ra trong lá chuối tiêu có sự hiện diện của phytol, axit octadecatrienoic, axit hexadecanoic và axit octadecadienoic. Trong quả chuối tiêu có chứa vitamin E, octadecenamide, β-sitosterol và stirosterol. Tất cả các hợp chất cấu thành này đều được báo cáo là có khả năng chống oxy hóa (Aziz *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2020). Nghiên cứu của Boadi và đồng tác giả (2021) cho thấy, chất chiết xuất từ vỏ và lá chuối tiêu thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Proteus mirabilis*. Ngoài ra, dịch chiết từ các bộ phận khác nhau của cây chuối tiêu cho thấy khả năng chống tiêu chảy, hạ đường huyết, chống oxy hóa, hạ huyết áp, chữa lành vết thương, chống dị ứng, chống sốt rét và làm trung hòa nọc độc của rắn.

Ở Việt Nam từ thời xa xưa ta đã dùng lá chuối tiêu để gói các loại bánh trái, hay các loại giò, chả với mục đích làm tăng hương vị và bảo quản các loại thực phẩm này trong thời gian dài hoặc dùng để đắp lên các vết thương,

vết bông. Tuy nhiên, các nghiên cứu khoa học về lá chuối còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung vào mục tiêu sàng lọc hoạt tính sinh học của lá chuối như khả năng kháng oxy hóa, kháng vi sinh vật kiểm định hoặc ức chế sản sinh nitric oxide (NO) nhằm giải thích cho các ứng dụng trên và mở rộng tiềm năng sử dụng của lá chuối trong nhiều lĩnh vực.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu lá chuối tiêu được thu hái tại cánh đồng chuối tiêu tại thôn Sâm Hồng, xã Thăng Lợi, huyện Văn Giang, tỉnh Hưng Yên. Mẫu được thu vào ngày 1/3/2024. Mẫu cây được định danh khoa học bởi TS. Vũ Hương Giang, Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tham khảo tài liệu của Valmayor và đồng tác giả (2000). Mẫu lá chuối tiêu sau khi thu hái được làm sạch sơ bộ, rửa sạch các chất bụi bẩn bám trên lá, sau đó cắt nhỏ, phơi khô dưới bóng râm và nghiền nhỏ. Tiêu bản lá chuối được lưu tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Thủy lợi. Mẫu khô được bảo quản trong túi nilon kín tại vị trí khô ráo, tránh ánh nắng trực tiếp cho đến khi tiến hành tạo các cao chiết, khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính sinh học.

Các chủng vi sinh vật kiểm định chuẩn quốc tế ATCC, bao gồm: *Enterococcus faecalis* ATCC299212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076, *Candida albicans* ATCC10231 được cung cấp bởi viện Kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm quốc gia.

Hóa chất

Cồn thực phẩm 90°C được mua của Công ty hóa chất Đức Giang. Nước tinh khiết được tạo ra tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Thủy lợi bởi máy lọc nước siêu sạch (Labaqua Bio, Biosand, Latvia). Các hóa chất để định tính sự có mặt của các chất hữu cơ có trong các cao chiết có xuất xứ Việt Nam và Trung Quốc. Các loại hóa chất dùng để xác định hàm lượng flavonoid và polyphenol tổng số; đánh giá hoạt tính sinh học như: acid gallic, thuốc thử Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 , AlCl_3 , CH_3COOK , quercetin, ascorbic acid, sodium phosphate, ammonium molybdate, DPPH và các hóa chất khác để đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO, kháng vi sinh vật kiểm định có xuất xứ Merck, Đức.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tạo cao chiết và tính hiệu suất của cao chiết

Nhóm nghiên cứu tiến hành tạo cao chiết với các dung môi cồn/nước theo tỉ lệ khác nhau. Ba loại dung môi được sử dụng là cồn 100%, cồn-nước tỉ lệ 7/3 và cồn nước tỉ lệ 5/5 (v/v). Phương pháp chiết được thực hiện như sau: 100 gram bột lá chuối tiêu nghiền nhỏ được chiết với ba loại dung môi nêu trên. Trong đó, quá trình chiết được thực hiện ở nhiệt độ thường. Đối với mỗi lần chiết, tỉ lệ dung môi/mẫu là 3/1 (v/w), thời gian chiết là 24 giờ. Sau đó, dịch chiết được thu qua giấy lọc và được gom lại, cô quay để loại dung môi bằng máy cất quay chân không và thu được cao chiết cồn 100%, cồn-nước 7/3, cồn-nước 5/5 được kí hiệu lần lượt là: E100, EW55, EW73. Hiệu suất cao hồi thu chiết được tính bằng tỉ lệ khối lượng của cao chiết (sau khi đã cô khô) và khối lượng của bột được liệu khô (tính theo đơn vị phần trăm).

Phương pháp định tính sự có mặt của các hợp chất trong các cao chiết

Định tính sự có mặt của các hợp chất chứa trong cao chiết bao gồm: flavonoid, polyphenol, terpenoid, quinone, coumarin và saponin được thực hiện bằng phương pháp hóa học theo mô tả của Cao và đồng tác giả (2023).

Phương pháp xác định hàm lượng polyphenol tổng số của các cao chiết

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo mô tả của Cao và đồng tác giả (2023). Sử dụng nước pha loãng các mẫu cao chiết để đạt nồng độ khoảng 1 mg/mL và dung dịch polyphenol chuẩn gallic acid nồng độ 20, 40, 60, 80, 100 và 120 $\mu\text{g/mL}$; thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% được pha loãng với nước. Lần lượt cho 1 mL dung dịch gallic acid với các nồng độ kể trên vào 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và để phản ứng trong 5 phút; sau đó, thêm tiếp vào 2 mL dung dịch Na_2CO_3 2%. Sau 45 phút phản ứng ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 765 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường chuẩn để sử dụng xác định hàm lượng polyphenol tổng trong các mẫu cao chiết. Các mẫu cao chiết được tiến hành tương tự với acid gallic.

Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid tổng số của các cao chiết

Hàm lượng flavonoid tổng được xác định theo mô tả của Chang và đồng tác giả (2002). Ethanol được sử dụng để pha loãng các cao chiết để đạt nồng độ 1 mg/mL và dung dịch flavonoid chuẩn quercetin đạt nồng độ 20; 40; 60; 80 và 100 $\mu\text{g/mL}$; dung dịch AlCl_3 10% và dung dịch CH_3COOK 1M được pha loãng với nước. Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch quercetin (nồng độ 20; 40; 60; 80 và 100 $\mu\text{g/mL}$) vào 1,5 mL ethanol và để phản ứng trong 5 phút. Sau đó, thêm tiếp 0,1 mL AlCl_3 10% và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm vào 0,1 mL CH_3COOK 1M và 2,8 mL nước cất, lắc đều rồi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Sau 45 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 tiến hành vẽ đường chuẩn để sử dụng xác định hàm lượng flavonoid trong các mẫu cao chiết. Các mẫu cao chiết được tiến hành tương tự như quercetin.

Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết

Hoạt tính chống oxy hóa tổng của các cao chiết được thực hiện theo phương pháp phosphomolybdenum theo mô tả của Cao và đồng tác giả (2023). Pha loãng bốn cao chiết để đạt nồng độ 10-100 µg/mL. Lần lượt cho 0,1 mL mỗi dung dịch cao chiết pha loãng với nồng độ tương ứng ở trên vào ống eppendorf dung tích 2 mL, bổ sung thêm 1 mL dung dịch phản ứng (0,6 M H₂SO₄, 28 mM sodium phosphate và 4 mM ammonium molybdate). Ống eppendorff được đóng nắp chặt, sau đó được ủ ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 90 phút. Ống mẫu thí nghiệm được làm nguội tới nhiệt độ phòng, sau đó đo nồng độ hấp thụ ở bước sóng 760 nm bằng máy đo quang. Ascorbic acid được dùng làm chất chuẩn.

Phương pháp quét gốc tự do DPPH của các cao chiết

Gốc tự do bền DPPH được sử dụng để xác định hoạt tính ức chế gốc tự do của các mẫu cao chiết. Phép thử được thực hiện theo mô tả của Cao và đồng tác giả (2023). Thêm 1,5 mL dung dịch DPPH 0,1 mM vào 1,5 mL dung dịch mẫu lần lượt có nồng độ 10, 25, 50, 100 µg/mL trong ethanol 90°. Sau đó, ủ dung dịch trong bóng tối (30 phút) và đo độ hấp thụ quang tại 517 nm. Các mẫu có hoạt tính mạnh, ức chế trên 50% tại nồng độ 10 µg/mL, được tiếp tục tiến hành ở các nồng độ thấp hơn là 1, 2, 5 µg/mL. Tất cả thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Dựa vào mật độ quang của dung dịch control và dung dịch mẫu thử để tính khả năng quét gốc tự do DPPH (%), từ đó xác định giá trị IC₅₀. Giá trị IC₅₀ được định nghĩa là nồng độ của mẫu mà tại đó nó có thể ức chế 50% gốc tự do. Mẫu có hoạt tính càng cao thì IC₅₀ càng thấp. Quercetin được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các cao chiết

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện tại Phòng Công nghệ Sinh học – Viện Hóa sinh biển dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Andrews (2001) dùng các thiết bị: box cấy Esco (AC2-4E1, Singapore); máy lắc ổn nhiệt (ThermoStable IS-20R, Korea) và máy đo mật độ quang (722N INESA, Trung Quốc). Đây là phương pháp thử nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 và 2 µg/mL với số thí nghiệm lặp lại 3 lần. Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ 2×10⁵CFU/mL.

Tiến hành thử: lấy 5,12 µL dung dịch mẫu thử có nồng độ 10 mg/mL vào hàng đầu tiên có chứa 100 µL môi trường LB rồi pha loãng nối tiếp giảm ½ nồng độ vào các hàng có chứa 50 µL cho đến khi đạt được nồng độ là 2 µg/mL, thêm 50 µL dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2×10⁵ CFU/mL, ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, xác định sơ bộ giá trị MIC. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy. Chất đối chứng là kháng sinh Ciprofloxacin cho các chủng vi khuẩn và cyclohexamide cho nấm.

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế NO của các cao chiết

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế nitric oxide (NO) trên mô hình tế bào RAW 264.7 được cảm ứng viêm bằng lipopolysaccharide (LPS). *Bước 1 tiến hành đánh thức tế bào RAW 264.7 từ nitơ lỏng (dòng tế bào RAW 264.7 do GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia cung cấp). Tiếp theo, tế bào RAW 264.7 được nuôi trong môi trường DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) bổ sung 2 mM L-glutamine, 10 mM dung dịch đệm HEPES, 1 mM sodium pyruvate và 10% fetal bovine serum (FBS), để trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau 3-5 ngày, tùy theo tình trạng tế bào sau khi đánh thức, tế bào được cấy chuyển với tỉ lệ 1:3. Sau đó, tế bào được cấy chuyển vào trong đĩa 96 giếng với mật độ 2 × 10⁵ tế bào/giếng, nuôi trong 24 giờ trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó tiến hành hút bỏ môi trường cũ và thay bằng môi trường mới DMEM không có FBS để trong 3 giờ. Tiếp theo, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau và ủ trong 2 giờ. Môi trường của một số giếng không chứa mẫu nghiên cứu mà chỉ có dung dịch pha mẫu được gọi là đối chứng âm. Đối chứng dương được sử dụng là Dexamethasone (Sigma) ở các nồng độ 100 µM, 20 µM, 4 µM và 0.8 µM. Tiến hành kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS nồng độ 1 µg/mL trong 24 giờ. Sau đó, hút 100 µL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng mới và bổ sung 100 µL thuốc thử Griess reagent (gồm 50 µL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µL 0,1% (w/v) N-1- naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước) và ủ tiếp hỗn hợp trên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, đo OD bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không có FBS được sử dụng làm giếng trắng (blank). Hàm lượng nitrite của mỗi giếng được xác định dựa vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO₂ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS). Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định bằng công thức:*

$$\% \text{ ức chế } (\%) = 100 - \frac{OD_1 - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{DMSO}} - OD_{\text{blank}}} * 100$$

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) được tính toán bằng phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4 (Cheenpracha et al., 2010; Liao et al., 2014).

Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đồ thị và số liệu được xử lý trên phần mềm Microsoft Office 2020. Phân tích thống kê được thực hiện với sự giúp đỡ của phần mềm Thống kê mô tả Turkey - Test, giá trị $P < 0,05$ được sử dụng để biểu hiện sự khác biệt đáng kể có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiệu suất thu hồi của cao chiết

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành tạo các cao chiết thô với cồn 100% (E100), cồn-nước theo tỉ lệ 7/3 (EW73) và cồn-nước theo tỉ lệ 5/5 (EW55) với mục đích sàng lọc hoạt tính sinh học và đánh giá sơ bộ thành phần hóa học. Dựa vào kết quả nghiên cứu trình bày ở Bảng 1 cho thấy, cao chiết E100 có hiệu suất cao nhất, đạt 12,5%. Cao chiết EW55 có hiệu suất thấp nhất, đạt 7,83%, trong khi cao chiết EW73 sử dụng dung môi ethanol và nước theo tỉ lệ 7/3 có hiệu suất 9,74%. Hiệu suất thu hồi cao chiết phụ thuộc vào các yếu tố như: bản chất dược liệu, độ mịn của dược liệu và kỹ thuật chiết (dung môi, tỉ lệ dung môi/bột dược liệu, thời gian chiết và kỹ thuật chiết). Tuy nhiên, bên cạnh hiệu suất cần phải tiến hành sàng lọc thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các cao chiết như: hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng viêm, hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, v.v. để khẳng định giá trị của các hợp chất thứ cấp đối với tác dụng dược lý của lá chuối tiêu nói riêng và các loài cây dược liệu nói chung.

Kết quả định tính sự có mặt của các nhóm chất trong các cao chiết

Đối với thực nghiệm định tính các hợp chất có trong các cao chiết từ lá chuối tiêu bằng phản ứng hóa học, kết quả có thể được đánh giá bằng các phản ứng có thể quan sát được bằng mắt thường. Kết quả định tính này cho biết rằng trong lá cây lá chuối tiêu chứa một số hoạt tính sinh học quan trọng. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở Bảng 1.

Trong cao chiết E100, EW73 và EW55 của lá chuối tiêu chứa phần lớn các hợp chất polyphenol, flavonoid, terpenoid. Trong đó, sự xuất hiện của polyphenol thể hiện mạnh nhất ở cao chiết E100. Đối với phép thử sự có mặt của các hợp chất flavonoid, phản ứng thể hiện sự thay đổi màu mạnh nhất thu được đối với cao chiết E100 và EW73. Trong cả ba cao chiết không thấy sự có mặt của quinone, trong khi coumarin và saponin chỉ xuất hiện ở cao chiết E100, không thấy xuất hiện trong hai cao chiết còn lại.

Bảng 1. Hiệu suất thu hồi cao chiết và kết quả định tính sự có mặt của một số nhóm chất có trong cao chiết lá chuối tiêu

Các cao chiết	Hiệu suất thu hồi cao chiết	Các nhóm hợp chất					
		Polyphenol	Flavonoid	Terpenoid	Quinone	Coumarin	Saponin
E100	12,5 ± 0,5	+++	++	+	-	+	+
EW73	7,8 ± 0,7	++	++	+	-	-	-
EW55	9,7 ± 0,4	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: (+) có; (-) không; kí hiệu: +, ++, +++ thể hiện cường độ có mặt của các chất trong các loại cao chiết; E100, EW73, EW55: các cao chiết của lá cây chuối tiêu lần lượt với các dung môi: cồn (100%), cồn-nước (7/3), cồn-nước (5/5)

Hàm lượng flavonoid tổng và polyphenol tổng có trong các cao chiết

Các hợp chất polyphenol và flavonoid là những thành phần quan trọng và chiếm tỷ lệ cao trong nhiều loài thực vật, đặc biệt là những loài thảo dược được dùng với vai trò tác nhân oxy hóa. Những nhóm hợp chất này đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ sức khỏe cho con người. Vì vậy, việc xác định hàm lượng các nhóm chất này là cần thiết trong việc nghiên cứu các hoạt tính sinh học của dược liệu. Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong các cao chiết được xác định tương đương hàm lượng gallic acid và quercetin với phương trình đường chuẩn $y = 0,0175x + 0,0829$ ($R^2 = 0,9944$) (đối với polyphenol) và $y = 0,0148x - 0,1296$ ($R^2 = 0,9913$) (đối với flavonoid). Qua đồ thị đường chuẩn đã xác định được hàm lượng của flavonoid và polyphenol tổng, kết quả nghiên cứu được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng flavonoid và polyphenol có trong các cao chiết của lá chuối tiêu

Các cao chiết	Hàm lượng polyphenol, mg QE /g cao chiết	Hàm lượng flavonoid, mg GAE/g cao chiết
E100	110,18 ± 3,16 ^a	12,83 ± 1,25 ^a
EW73	52,37 ± 1,45 ^b	21,57 ± 1,42 ^b
EW55	26,47 ± 1,70 ^c	12,32 ± 1,35 ^c

Ghi chú: E100, EW73, EW55: Các cao chiết của lá chuối tiêu lần lượt với các dung môi: cồn (100%), cồn-nước (7/3), cồn-nước (5/5); GAE: Tương đương gallic acid; QE: tương đương quercetin; giá trị được tính = giá trị trung bình ± dung sai; các chữ số a, b, c trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (Tukey's test, $p < 0,05$).

Từ kết quả ở Bảng 2 cho thấy, các mẫu cao chiết với các dung môi khác nhau sẽ cho kết quả hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid khác nhau một cách rõ rệt. Cụ thể, dùng dung môi cồn 100% sẽ thu được cao chiết có hàm lượng polyphenol cao nhất, đạt giá trị 110,18 mg/g. Mẫu EW73 cũng có hàm lượng polyphenol tương đối cao, đạt 52,37 mg/g cao chiết, trong khi mẫu EW55 có hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất.

Đối với hàm lượng flavonoid, khi dùng dung môi cồn 100% hoặc cồn-nước theo tỉ lệ 5/5 sẽ cho cao chiết có hàm lượng flavonoid chênh lệch không đáng kể. Hàm lượng flavonoid cao nhất thuộc về mẫu cao chiết EW73 khi dùng hỗn hợp dung môi cồn-nước tỉ lệ 7/3.

Như vậy, với mục đích tạo cao chiết theo định hướng thu được sản phẩm giàu polyphenol sẽ sử dụng dung môi cồn 100%, với mục đích thu được sản phẩm giàu flavonoid sẽ dùng dung môi cồn-nước theo tỉ lệ 7/3. Dùng dung môi cồn-nước theo tỉ lệ 7/3 sẽ thu được cao chiết có hàm lượng flavonoid và polyphenol cao ở mức tương đối.

Kết quả sàng lọc hoạt tính sinh học của các cao chiết

Hoạt tính oxy hóa tổng và quét gốc tự do DPPH của các cao chiết lá chuối tiêu

Trong khuôn khổ đề tài này, nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá hoạt tính chống oxy hóa tổng của cao chiết E100, EW55, EW73 theo phương pháp phosphomolybdenum. Thí nghiệm được tiến hành đối với mẫu đối chứng dương là ascorbic acid. Trên cơ sở thực nghiệm xây dựng đường tuyến tính về sự phụ thuộc của mật độ quang vào nồng độ mẫu ở bước sóng 760 nm của các mẫu thử (số liệu tại các nồng độ 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL đã xác định được giá trị EC₅₀). Ngoài ra, nhóm nghiên cứu cũng thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH là một trong những phương pháp đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* tổng thể cho mẫu nghiên cứu (Bảng 3).

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, tất cả các cao chiết từ lá chuối tiêu thu hái tại Văn Giang, Hưng Yên đều có khả năng chống oxy hóa trên hai phép thử. Đặc biệt, cao chiết E100 được chiết từ 100% cồn có hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính quét gốc tự do tốt hơn so với các cao chiết còn lại. Đối với hoạt tính chống oxy hóa tổng theo phương pháp phosphomolybdenum, giá trị EC₅₀ đối với các cao chiết E100, EW73, EW55 lần lượt là 353,19; 422,63 và 561,84 µg/mL, thể hiện hoạt tính kém hơn so với ascorbic acid. Tuy nhiên, kết quả thử nghiệm đối với gốc tự do DPPH cho kết quả rất khả quan. Giá trị EC₅₀ đối với các cao chiết đều nhỏ hơn 100 µg/mL (thông thường đối với các cao chiết thô, giá trị EC₅₀ nhỏ hơn 100 µg/mL được coi là có hoạt tính).

Bảng 3. Giá trị EC₅₀ của hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết từ cây lá chuối tiêu

Các cao chiết	Giá trị EC ₅₀ , µg/mL	
	Hoạt tính chống oxy hóa tổng	Hoạt tính quét gốc tự do DPPH,
E100	353,19 ± 7,49 ^a	73,48 ± 2,28 ^a
EW73	422,63 ± 8,55 ^b	81,53 ± 2,61 ^a
EW55	561,84 ± 7,63 ^c	95,49 ± 3,10 ^c
Ascorbic acid	27,74 ± 1,49 ^d	6,96 ± 0,22 ^d

Ghi chú: E100, EW73, EW55 – các cao chiết của lá cây chuối tiêu lần lượt với các dung môi: cồn (100%), cồn-nước (7/3) và cồn-nước (5/5); giá trị được tính = giá trị trung bình ± dung sai; các chữ số a, b, c, d trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (Tukey's test, P < 0,05).

Hoạt tính kháng vi sinh vật của các cao chiết lá chuối tiêu

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định cho thấy, cao chiết E100 có hoạt tính đối với 1 chủng gram dương *Escherichia coli* ATCC25922 và 1 chủng gram âm *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 với giá trị MIC tương ứng là 128 và 256 µg/mL. Cao chiết EW73 có hoạt tính đối với chủng *Escherichia coli* ATCC25922 và chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231 với giá trị MIC như nhau là 256 µg/mL. Trong khi cao chiết EW55 chỉ có hoạt tính đối với chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231 với giá trị MIC 256 µg/mL (Bảng 4).

Bảng 4. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các cao chiết từ lá chuối tiêu

Tên mẫu	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC299212 ⁽¹⁾	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 ⁽¹⁾	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 ⁽¹⁾	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922 ⁽¹⁾	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 ⁽²⁾	<i>Salmonella enterica</i> ATCC13076 ⁽²⁾	<i>Candida albicans</i> ATCC10231 ⁽³⁾
E100	> 256	> 256	>256	128	256	>256	>256
EW73	>256	>256	>256	256	>256	> 256	256
EW55	>256	>256	>256	>256	>256	>256	256
Ciprofloxacin	128	32	8	0,5	32	1	-
Cyclohexamide	-	-	-	-	-	-	32

Ghi chú: (1): gram dương, (2): gram âm, (3): nấm men

Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao chiết lá chuối tiêu

Để xác định khả năng ức chế sản sinh NO, các cao chiết được thử nghiệm về tác dụng kiểm soát lipopolysaccharide (LPS) chịu trách nhiệm kích thích việc sản xuất nitric oxide (NO), việc phóng thích yếu tố hoại tử khối u α (TNF- α) và interleukin-6 (IL-6) của tế bào RAW 264.7. Các đại thực bào được xử lý với nồng độ 0,8-100 $\mu\text{g/mL}$ cao chiết, kết quả thu được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxide (NO) của các cao chiết lá chuối tiêu

Nồng độ cao chiết, $\mu\text{g/mL}$	Khả năng ức chế sản sinh NO, %		
	E100	EW73	EW55
0,8	0,72 \pm 0,03 ^a	1,40 \pm 0,11 ^b	0,89 \pm 0,03 ^c
4	8,36 \pm 0,55 ^a	12,64 \pm 0,57 ^b	12,34 \pm 0,62 ^c
20	18,49 \pm 0,82 ^a	26,93 \pm 0,93 ^b	22,44 \pm 0,69 ^c
100	78,79 \pm 0,47 ^a	95,59 \pm 1,10 ^b	87,22 \pm 1,05 ^c

Ghi chú: E100, EW73, EW55 – các cao chiết của lá cây chuối tiêu lần lượt với các dung môi: cồn (100%), cồn-nước (7/3) và cồn-nước (5/5); giá trị được tính = giá trị trung bình \pm dung sai; các chữ số a, b, c trong cùng một hàng thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (Tukey's test, $P < 0,05$).

Dựa trên phương trình hồi quy tuyến tính mối quan hệ giữa nồng độ cao chiết và khả năng ức chế sản sinh nitric oxide xác định được nồng độ ức chế 50% sự sản sinh NO (giá trị IC₅₀). Theo đó, giá trị IC₅₀ của các cao chiết E100, EW73 và EW55 lần lượt là: 63,17 \pm 0,98; 50,29 \pm 2,64 và 54,44 \pm 1,78 $\mu\text{g/mL}$. Chất đối chứng dương dexamethasone hoạt động ổn định trong thí nghiệm, thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxide ở các nồng độ 0,8; 4; 20 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt là: 32,24; 36,88; 57,74. Giá trị IC₅₀ của dexamethasone là 14,68 $\mu\text{g/mL}$.

KẾT LUẬN

Ở công trình này chúng tôi đã tạo cao chiết tổng của lá chuối tiêu, sàng lọc thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cao chiết tổng. Hiệu suất thu hồi các cao chiết ethanol (100%), cao chiết cồn - nước (7/3), cao chiết cồn - nước (5/5) lần lượt là 12,5; 9,74 và 7,83%. Kết quả sàng lọc thành phần hóa học cho thấy, trong các cao chiết đều chứa polyphenol, flavonoid và terpenoid. Trong cao chiết ethanol còn thấy sự có mặt của coumarin và saponin. Hàm lượng flavonoid và polyphenol của các cao chiết tương đối cao, đạt giá trị tương ứng trong khoảng 12,32-21,57 mg/g và 26,47-110,18 mg/g, trong đó cao chiết ethanol chứa hàm lượng polyphenol cao nhất; cao chiết cồn-nước 7/3 có hàm lượng flavonoid cao nhất. Kết quả sàng lọc hoạt tính sinh học cho thấy, các cao chiết đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp phosphomolybdenum và quét gốc tự do DPPH, trong đó cao chiết E100 thể hiện hoạt tính tốt nhất. Cả ba cao chiết đều thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật yếu đối với các dòng vi sinh vật kiểm định, trong đó cao chiết E100, E73 thể hiện hoạt tính đối với 02 chủng, còn cao chiết EW55 thể hiện hoạt tính đối với duy nhất chủng nấm. Cả ba cao chiết đều thể hiện khả năng ức chế sản sinh nitric oxide, đạt giá trị 78,78; 95,59 và 87,22% ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt đối với ba cao chiết E100, EW73 và EW55. Giá trị IC₅₀ của cả 3 cao chiết đều nhỏ hơn 100 $\mu\text{g/mL}$.

Kết quả thực nghiệm của chúng tôi cho phép đưa ra cơ sở ban đầu về việc sử dụng lá chuối trong việc bảo quản thực phẩm để bao gói các loại bánh truyền thống và các loại thực phẩm từ thịt. Việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các chất có trong lá chuối tiêu sẽ được thực hiện ở các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmed OM, El-Twab SMA, Al-Muzafar HM, Amin KA, Aziz SMA, and Abdel-Gabbar M (2021). *Musa paradisiaca* L. leaf and fruit peel hydroethanolic extracts improved the lipid profile, glycemic index and oxidative stress in nicotinamide/streptozotocin-induced diabetic rats. *Vet Med and Sci*, 7(2): 500-511.

Alabi AS, Omotoso GO, Enaibe BU, Akinola OB, Tagoe CNB (2013). Beneficial effects of low dose *Musa paradisiaca* on the semen quality of male Wistar rats. *Niger Med J*, 54(2): 92-5.

Andrews JM (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 48 (1), 5-16.

Aziz SMA, Ahmed OM, EL-Twab SMA, Al-Muzafar HM, Amin KA, and Abdel-Gabbar M (2020). Antihyperglycemic Effects and Mode of Actions of *Musa paradisiaca* Leaf and Fruit Peel Hydroethanolic Extracts in Nicotinamide/Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, (9276343):15.

Kappel VD, Cazarolli LH, Pereira DF, Postal B., Madoglio FA, Bus ZS, Reginatto F, Silva F (2013). Beneficial effects of banana leaves (*Musa paradisiaca*) on glucose homeostasis: Multiple sites of action. *Rev Bras de Farmacia*, 23(4):706-715.

Behiry SI, Okla MK, Alamri SA, EL-Hefny M, Salem MZ, Alaraidh IA, Al-Ghtani SM, Monroy JC, Salem AZM (2019). Antifungal and Antibacterial Activities of *Musa paradisiaca* L. Peel Extract: HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Contents. *Processes*, 7(4): 215.

Boadi EO, Essuman MA, Mensah G, Ayimbissa EA, and Boye A (2021). Antimicrobial Activity against Oral Pathogens Confirms the Use of *Musa paradisiaca* Fruit Stalk in Ethnodentistry. *Evid Based Complement Alternat Med*, (10159):1-9.

- Cao TH, Ninh TCV, Luc QT, Nguyen KT, Nguyen TKY, Dinh TTT, Ha TD (2023). Assessment of Antioxidant Activities, Total Phenolics, and Flavonoids of Different Extracts of *Strobilanthes Schomburgkii* Leaves. *J Adv Zool*, 44(2), 1179-1187.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chem J (2002). Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, 10(3): 178-182.
- Cheenpracha S, Park EJ, Rostama B, Pezzuto JM, Chang LC (2010). Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesiterterpene peroxide, epimuquibilin A. *Marine drugs*, 8(3): 429-437.
- Liao H, Banbury L, Liang H, Wang X, Lü X, Hu L, Wu J (2014). Effect of Honghua (*Flos Carthami*) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and α -glucosidase activity. *J Trad Chinese Med*, 34(3): 362-368.
- Valmayor RV, Jamaluddin, SH, Silayoi B, Kusumo S, Danh LD, Pascua OC, Espino RRC. (eds.) (2000). Banana cultivar names and synonyms in Southeast Asia. n. 48 p. <https://cgspace.cgiar.org/server/api/core/bitstreams/c4134028-f51a-4e57-8d23-908dd05c0bdd/content>.

SCREENING OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF BANANA LEAF EXTRACTS HARVESTED IN VAN GIANG, HUNG YEN, VIETNAM

**Nguyễn Trường Quốc Anh¹, Dương Minh Yên², Nguyễn Đức Huy², Hoàng Quốc Phương²,
Nguyễn Hoàng Anh², Trịnh Thị Thúy², Hà Thị Dung³, Lục Quang Tấn⁴, Cao Thị Huệ^{2*}**

¹Vinschool The Harmony, Phúc Đồng, Long Biên, Hà Nội

²Trường Đại học Thủy lợi, 175 Tây Sơn, Đống Đa, Hà Nội

³Trường Đại học Công nghiệp, 298 Cầu Diễn, Nam Từ Liêm, Hà Nội

⁴Phân hiệu Đại học Thái Nguyên tại tỉnh Hà Giang, phường Nguyễn Trãi, TP Hà Giang, tỉnh Hà Giang

SUMMARY

Banana *Musa acuminata* AAA is a widely cultivated plant species in Vietnam, and its fruits are used as a daily nutritional food in countries around the world. In Vietnam, banana leaves have been traditionally used to wrap various types of cakes and processed meat products. In this study, we created extracts using different solvents (ethanol, 70% ethanol-water mixture, 50% ethanol-water mixture) (E100, EW73, EW55) and evaluated the yield, flavonoid and polyphenol contents, as well as the biological activity screening of these extracts. The yields of the three extracts were 12.5%, 9.7%, and 7.8% (w/w), respectively. The flavonoid content of the E100, EW73, and EW55 extracts were 110.18, 52.37, and 26.47 mg/g, while the flavonoid content gained values of 12.83, 21.57, and 12.32 mg/g, respectively. The EC₅₀ values of the total antioxidant activity and DPPH free radical scavenging activity for E100, EW73, and EW55 were 353.19, 422.63, 561.84 μ g/mL, and 73.48, 81.53, 95.49 μ g/mL, respectively. All three extract samples demonstrated the ability to inhibit nitric oxide (NO) production, with inhibition rates ranging from 78.79% to 95.59% at a concentration of 100 μ g/mL. The IC₅₀ values of the E100, EW73, and EW55 were 63.17, 50.29, and 54.44 μ g/mL, respectively.

Keywords: Banana leaf, biological activity, antioxidant, antimicrobial activity, inhibit NO production.

* Author for correspondence: Tel: 0972356688; Email: caohue@tlu.edu.vn