

Flavonoid extraction from Siam weed (*Chromolaena odorata*) for the development of a wound-healing gel with antimicrobial properties

Nhung T. B. Tran, Linh Q. Phan, Y N. N. Nguyen, Minh C. Nguyen, & Anh T. Vu *

Faculty of Chemical Engineering and Food Technology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: March 19, 2023

Revised: April 03, 2023

Accepted: April 08, 2023

Keywords

Antimicrobial

Flavonoid

Siam weed

*Corresponding author

Vu Thuy Anh

Email:

vuthuyanh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

This study focused on extracting flavonoids, a group of natural compounds with high biological activity, from Siam weed (*Chromolaena odorata*). Various extraction conditions were investigated including the ratio of raw material to solvent, temperature, and extraction time. The highest flavonoid content was obtained when using ethanol with a concentration of 70% and a raw material-to-solvent ratio of 1:200 g/mL, at a temperature of 50°C for 2 h. Additionally, antibacterial activity test revealed that both the extract and gel (supplemented with the extract) were effective in limiting the growth of three bacteria strains including *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, and *Escherichia coli*. Therefore, this study suggests that this wild plant species may be a good source of natural antibacterial agents.

Cited as: Tran, N. T. B., Phan, L. Q., Nguyen, Y. N. N., Nguyen, M. C., & Vu, A. T. (2023). Flavonoid extraction from Siam weed (*Chromolaena odorata*) for the development of a wound-healing gel with antimicrobial properties. *The Journal of Agriculture and Development* 22(2), 50-59.

Nghiên cứu trích ly flavonoid từ cây cỏ lào (*Chromolaena odorata*) định hướng làm gel hỗ trợ - sát khuẩn vết thương

Trần Thị Bích Nhung, Phan Quang Linh, Nguyễn Ngọc Như Ý, Nguyễn Công Minh & Vũ Thùy Anh *

Khoa Công Nghệ Hóa học và Thực Phẩm, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 19/03/2023

Ngày chỉnh sửa: 03/04/2023

Ngày chấp nhận: 08/04/2023

Từ khóa

Cây cỏ lào

Flavonoid

Kháng khuẩn

*Tác giả liên hệ

Vũ Thùy Anh

Email:

vuthuyanh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Cây cỏ lào (*Chromolaena odorata*) là thực vật phổ biến của Việt Nam chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học. Nghiên cứu sử dụng ethanol làm dung môi để trích ly flavonoid, nhóm hợp chất tự nhiên giàu hoạt tính sinh học, từ cây cỏ lào. Các thông số khảo sát của nghiên cứu bao gồm tỉ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết. Hàm lượng flavonoid cao nhất thu được khi sử dụng ethanol có nồng độ 70% với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:200 g/mL, nhiệt độ chiết 50°C và thời gian 2 giờ. Bên cạnh đó, tiềm năng kháng khuẩn của dịch trích và gel (bổ sung dịch trích) đã được khảo sát và kết quả chỉ ra tiềm năng kháng khuẩn của sản phẩm trên 3 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* và *Escherichia coli*. Nghiên cứu này cho thấy loài thực vật hoang dã này có thể là nguồn cung cấp kháng khuẩn tự nhiên tốt.

1. Đặt Vấn Đề

Cây cỏ lào (*Chromolaena odorata* (L) King và Robinson Asteraceae) là một cây cỏ dại lâu năm có nguồn gốc từ Trung và Nam Mỹ. Sau này được đưa vào các vùng có khí hậu nhiệt đới là Châu Phi, Châu Á và nhiều nơi khác trên thế giới (Bhuyan & ctv., 2019). Chi *Chromolaena* (họ Asteraceae) được xếp vào trong những loài thực vật lâu đời nhất, chi này bao gồm 175 loài cây bụi và thảo mộc. Với sự xâm lấn và phát triển nhanh chóng của chúng đã gây ra những đe dọa và gây trở ngại trong trồng trọt, chăn nuôi, phòng chống hỏa hoạn và ảnh hưởng đến hệ sinh thái tự nhiên,...tuy nhiên không thể phủ định những dược tính có ích của chúng trong lĩnh vực y học và sức khỏe con người. Olawale & ctv. (2022) đã báo cáo về các sự hiện diện các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây cỏ như flavonoid, alkaloid, các acid béo và saponin. Các thành phần sinh học đã kể trên là các hợp

chất giàu tiềm năng kháng khuẩn (Yaouba & ctv., 2017), chữa lành vết thương (Vijayaraghavan & ctv., 2017), chống ung thư (Kouamé & ctv., 2013), giảm đau (Cahyo & ctv., 2021), chống viêm (Owoyele & ctv., 2005), chống đái tháo đường và đục thủy tinh thể (Onkaramurthy & ctv., 2013), ngăn ngừa rối loạn lipid máu (Ifeanacho & ctv., 2021), giảm độc tính cho phổi gây ra bởi doxorubicin (Ikewuchi & ctv., 2021). Bên cạnh đó, các flavonoid cũng là thành phần không thể thiếu trong một số mỹ phẩm và dược phẩm (Tungmunnithum & ctv., 2020). Một số nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng hợp chất sinh học từ *Chromolaena odorata* (L) King và Robinson Asteraceae có thể được ứng dụng trong lĩnh vực môi trường để loại bỏ màu tím tinh thể ra khỏi nước (Soosai & ctv., 2022) .

Nghiên cứu này, khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly flavonoid như dung môi, tỉ lệ dung môi/dịch chiết, nhiệt độ, thời gian, từ đó đưa ra các kết quả nhằm nâng cao hiệu suất trích

ly và tìm được các điều kiện trích ly tối ưu. Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn từ dịch chiết cây cỏ lào cũng được chúng tôi đề cập trong bài báo cáo này với hai phương pháp khuếch tán đĩa và phương pháp xác định đường cong chết phụ thuộc thời gian (time kill-curve). Cuối cùng đi đến phổ chế gel ứng dụng trong kháng khuẩn.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Cây cỏ lào

Nguyên liệu cây cỏ lào (*Chromolaena odorata* (L.) King và Robinson Asteraceae), được thu mua tại Khánh Hòa loại bỏ các phần thừa, bụi bẩn, đất... Sau đó nguyên liệu sẽ được rửa sạch và sấy khô trong tủ sấy với nhiệt độ khoảng (40 – 45°C ± 3°C) đến khi ẩm độ đạt 8 - 10%, sau khi sấy nguyên liệu, cắt nhỏ, đóng gói, hút chân không và bảo quản ở nhiệt độ mát, dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.1.2. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong phân tích bao gồm Ethanol 99,7% (Xilong-Trung Quốc); chất chuẩn Quercetin (Himedia-Ấn Độ); CH₃COOK (Xi long-Trung Quốc) và AlCl₃ (Xilong-Trung Quốc), Nutrient Agar (Ấn Độ), NaCl (Xilong-Trung Quốc).

2.2. Bố trí thí nghiệm

Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện trích ly flavonoid bằng phương pháp ngâm chiết.

Nguyên liệu cây cỏ lào sau khi xử lý rửa sạch, sấy khô và bảo quản cho các thí nghiệm tiếp theo. Cân 0,25 g nguyên liệu cỏ lào, cho thêm dung môi có nồng độ, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi theo từng khảo sát. Dung dịch được ủ trong bể ổn nhiệt ở thời gian và nhiệt độ trích ly khác nhau. Sau đó dịch trích được đem đi ly tâm ở 5.200 vòng 5 phút bằng máy ly tâm lạnh Hermle (Z-326K, Đức). Sau đó lọc thu dịch, bã được trích ly lần 2 với cùng lượng dung môi. Thu tất cả dịch sau các lần trích ly và tiến hành đuổi dung môi đến khi dịch còn 50 mL. Tiến hành xác định hàm lượng flavonoid của dịch trích ly theo phản ứng tạo màu với AlCl₃.

Thực hiện khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid: khảo sát loại dung môi

(ethanol, nước), nồng độ dung môi (60%, 70%, 80%), tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (1:50, 1:100, 1:200), nhiệt độ (40°C, 50°C, 60°C), thời gian ủ (1 giờ, 2 giờ, 3 giờ). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các bố trí thí nghiệm được mô phỏng như Hình 1.

2.2.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của dung môi trích ly đến hàm lượng flavonoid trong dịch trích

Thí nghiệm 1 yếu tố lặp lại 3 lần hoàn toàn ngẫu nhiên. Yếu tố thí nghiệm: nước và ethanol được lặp lại 3 lần trong các khoảng thời gian khác nhau.

Cách tiến hành thí nghiệm: Cân 0,25 g mẫu khô cây cỏ lào, xay nhuyễn sau đó đưa vào mỗi mẫu ethanol với nồng độ 80% và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL) 1:200, ở điều kiện 50°C trong 1 giờ. Sau đó lọc thu dịch, bã được trích ly lần 2 với cùng lượng dung môi. Thu tất cả dịch sau các lần trích ly và tiến hành đuổi dung môi đến khi dịch còn 50 mL. Tiến hành xác định hàm lượng flavonoid của dịch trích ly.

Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng flavonoid. Phương pháp đánh giá: Xác định hàm lượng flavonoid theo Chang & ctv. (2002) như mục 2.3.2. Xác định hàm lượng flavonoid tổng (TFC).

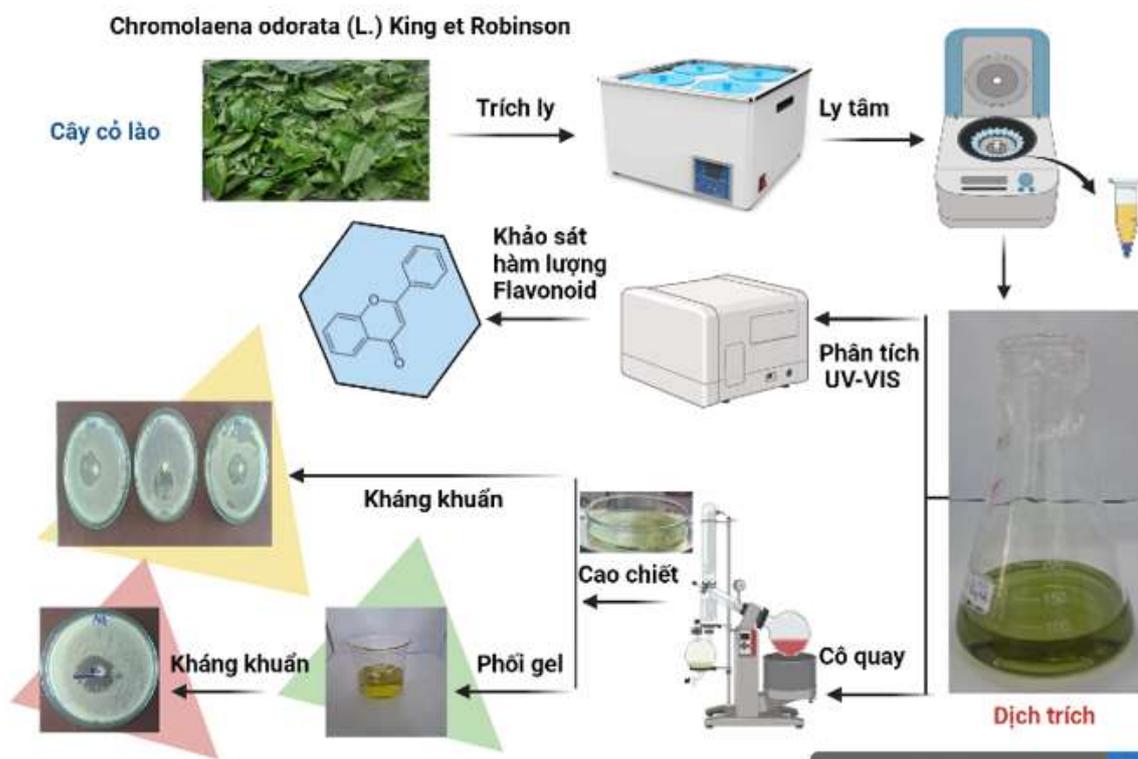
2.2.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng flavonoid trong dịch trích

Thí nghiệm 2 yếu tố lặp lại 3 lần hoàn toàn ngẫu nhiên. Yếu tố thí nghiệm: nồng độ (60%, 70%, 80%), tỉ lệ nguyên liệu và dung môi (1:50, 1:100, 1:200).

Cách tiến hành thí nghiệm: Cân 0,25 g mẫu khô cây cỏ lào, xay nhuyễn cho dung môi vào mỗi mẫu. Tiếp theo đó chúng ta đưa vào quy trình trích ly ở các điều kiện khác như:

- Ở nồng độ 60% và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL) 1:50, 1:100, 1:200.
- Ở nồng độ 70% và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL) 1:50, 1:100, 1:200.
- Ở nồng độ 80% và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL) 1:50, 1:100, 1:200.

Sau đó lọc thu dịch, bã được trích ly lần 2 với cùng lượng dung môi. Thu tất cả dịch sau các lần trích ly và tiến hành đuổi dung môi đến khi dịch còn 50 mL. Tiến hành xác định hàm lượng flavonoid của dịch trích ly.



Hình 1. Mô tả bố trí thí nghiệm.

Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng flavonoid. Phương pháp đánh giá: Xác định hàm lượng flavonoid theo Chang & ctv. (2002) như mục 2.3.2. Xác định hàm lượng flavonoid tổng (TFC).

2.2.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ đến hàm lượng flavonoid trong dịch trích

Thí nghiệm 2 yếu tố lặp lại 3 lần hoàn toàn ngẫu nhiên.

Yếu tố thí nghiệm: Nhiệt độ (40°C, 50°C, 60°C), thời gian (1 giờ, 2 giờ, 3 giờ). (dung môi được sử dụng ở thí nghiệm 1, nồng độ dung môi được sử dụng ở thí nghiệm 2, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi được sử dụng ở thí nghiệm 2).

Cách tiến hành thí nghiệm: Cân 0,25 g mẫu khô cây cỏ lào, xay nhuyễn cho dung môi vào mỗi mẫu. Tiếp theo đó chúng ta đưa vào quy trình trích ly ở các điều kiện khác như:

- Ở nhiệt độ 40°C trong 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ.
- Ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ.
- Ở nhiệt độ 60°C trong 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ.

Sau đó lọc thu dịch, bã được trích ly lần 2 với cùng lượng dung môi. Thu tất cả dịch sau các lần trích ly và tiến hành đuổi dung môi đến khi

dịch còn 50 mL. Tiến hành xác định hàm lượng flavonoid của dịch trích ly.

Chỉ tiêu theo dõi: Hàm lượng flavonoid. Phương pháp đánh giá: Xác định hàm lượng flavonoid theo Chang & ctv. (2002) như mục 2.3.2. Xác định hàm lượng flavonoid tổng (TFC).

2.2.4. Thí nghiệm 4: Chuẩn bị gel từ dịch cây cỏ lào

a. Lựa chọn liều lượng

Để xác định liều lượng tối ưu của công thức gel. Hai tiêu chí quan trọng bao gồm nồng độ và khả năng kháng khuẩn của gel từ dịch trích cây cỏ lào ở các nồng độ khác nhau.

b. Công thức gel bôi

Công thức phối chế gel cây cỏ lào đã được chuẩn bị để nghiên cứu về hiệu quả kháng khuẩn của gel. Quy trình chuẩn bị có sửa đổi phần nhỏ so với nghiên cứu trước đây của Ebrahimi & ctv. (2020). Tổng hợp 60 mL gel được tiến hành như sau: 38 mL dịch trích ở các nồng độ khác nhau (60%, 70% & 80%) được đổ vào becher dung tích 100 mL, sau đó thêm vào 7,5 mL glycerin (chất giữ ẩm trong mỹ phẩm), (Becker & ctv., 2019). Khuấy hỗn hợp bao gồm glycerin và dịch trích

liên tục ở nhiệt độ phòng, tiếp đến cho 4,5 mL chất nhũ hóa Tween 80 (Polysorbate 80). Một lượng vừa đủ natri hydroxit 10% được thêm vào để điều chỉnh pH cuối cùng thành 6. Cuối cùng, 10 mL nước được thêm vào để tạo thành dung dịch thể tích 60 mL, khuấy đều đến khi hỗn hợp trong và đạt được gel đồng nhất.

2.2.5. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch chiết cây cỏ lào

Ngày càng có nhiều nghiên cứu quan tâm đến việc phát hiện ra các hợp chất có vai trò kháng khuẩn từ các cây thuốc, thảo dược (Sieber & ctv., 2020). Đã có khảo sát chỉ ra rằng có 50 chiết xuất từ thực vật có khả năng kháng khuẩn (Zazharskyi, 2019). Trên thực tế thì có nhiều chiết xuất từ thực vật có khả năng kháng khuẩn nhưng chưa được khám phá. Trong bài viết này, khảo sát về khả năng kháng khuẩn từ dịch trích cây cỏ lào đã được thực hiện. Khảo sát này được thực hiện tại phòng thí nghiệm vi sinh Khoa công nghệ Hóa học và Thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

Chuẩn bị mẫu: Sử dụng dịch chiết cây cỏ lào được trích ly theo các điều kiện tối ưu đã khảo sát. Hoạt hóa các chủng vi khuẩn trong ống nghiệm chứa 1 mL môi trường nutrient agar, nuôi cấy trong tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Hút 50 µL dịch mẫu ở nồng độ 70% vào các giếng đã được chuẩn bị có đường kính 6 mm. Các nghiệm thức sẽ được lặp lại 3 lần. Các đĩa thạch sẽ được ủ ở 37°C trong vòng 24 giờ. Quan sát, đo đường kính vòng kháng khuẩn.

Các thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trong nghiên cứu này được thực hiện dựa trên phương pháp khuếch tán đĩa thạch, trên ba chủng vi khuẩn, bao gồm: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*. Nguyên tắc của phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Balouiri & ctv., 2016): chất thử sẽ khuếch tán vào thạch agar có chứa chủng vi khuẩn thử nghiệm. Mức độ nhạy cảm của vi khuẩn với chất thử được biểu hiện bằng đường kính các vòng vô khuẩn theo công thức sau:

$$D_{kk} (\text{đường kính vòng kháng khuẩn}) = D - d$$

Trong đó:

D: đường kính vòng vô khuẩn.

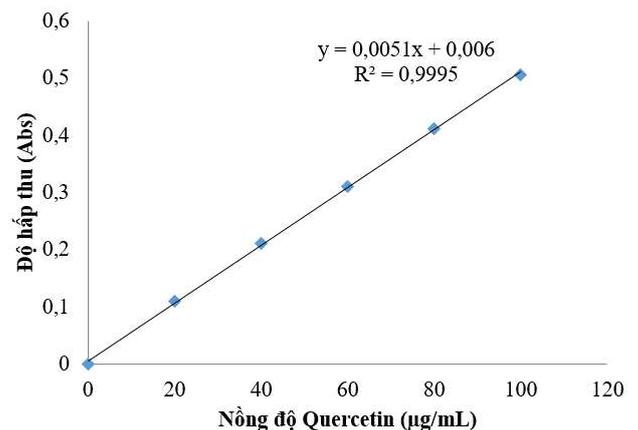
d: đường kính lỗ thạch.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xây dựng đường chuẩn Quercetin

Pha dung dịch quercetin 100 µg/mL trong cồn 80%. Từ dung dịch chuẩn quercetin 100 µg/mL tiếp tục pha ra các dung dịch có nồng độ lần lượt là 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL. Ứng với mỗi nồng độ dung dịch pha loãng hút 0,5 mL cho vào ống nghiệm sau đó thêm vào 1,5 mL ethanol 95%, 0,1 mL AlCl₃ 10%, 0,1 mL CH₃COOK 1M và 2,8 mL nước cất. Lắc đều để yên ở nhiệt độ phòng 30 phút. Đo màu ở bước sóng 415 nM bằng máy UV-vis (Spectro UV 11, Đức).

Từ kết quả Hình 2 cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát, độ hấp thu tăng tuyến tính theo giá trị của hàm lượng flavonoid ở bước sóng cực đại 415 nM. Từ đó phương trình đường chuẩn flavonoid được xây dựng là $y = 0,0051x + 0,006$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9995$.



Hình 2. Đường chuẩn flavonoid tính theo tương đương quercetin.

2.3.2. Xác định hàm lượng flavonoid tổng (TFC)

Theo (Chang & ctv., 2002), flavonoid tổng được xác định theo phương pháp quang phổ theo nguyên tắc: flavonoid tạo phức màu vàng với dung dịch AlCl₃. Cường độ màu tỉ lệ thuận với hàm lượng flavonoid được xác định ở bước sóng 415 nM. Quercetin được dùng làm chất chuẩn tham chiếu. Lấy 0,5 mL dịch chiết cây cỏ lào đã được pha loãng thích hợp cho vào ống nghiệm sau đó thêm vào 1,5 mL ethanol 95%, 0,1 mL AlCl₃ 10%, 0,1 mL CH₃COOK và 2,8 mL nước cất. Lắc đều để yên ở nhiệt độ phòng 30 phút. Đo màu ở bước sóng 415 nM. TFC trong mẫu được tính như sau:

$TFC = (a \times V \times n) / m \times 10^{-3}$ (mg/g, vật chất khô (vck))

Trong đó:

a: hàm lượng flavonoid xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$).

V: tổng thể tích dịch chiết (mL).

n: hệ số pha loãng

m: khối lượng mẫu (g)

2.4. Xử lý số liệu

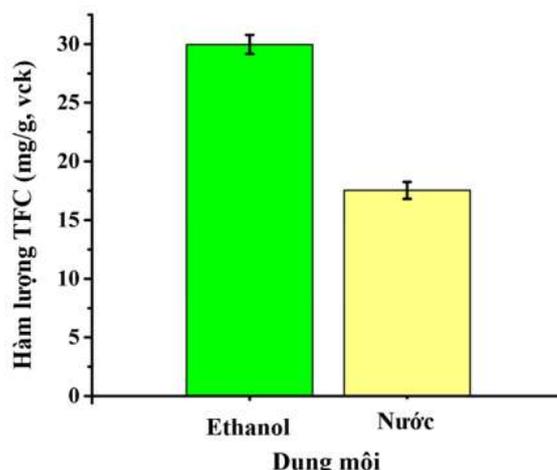
Các thí nghiệm hai yếu tố được lặp lại 3 lần. Kết quả trình bày là giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Dữ liệu được kiểm tra bằng phần mềm SPSS. Phân tích phương sai (ANOVA) và chênh lệch ít có ý nghĩa nhất (LSD) được thực hiện so sánh giá trị trung bình ở mức 0,05.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi trích ly đến hàm lượng flavonoid trong dịch trích

Việc lựa chọn dung môi trích ly là yếu tố chính trong hầu hết các phương pháp chiết xuất (Chaves & ctv., 2020). Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của dung môi trích ly đến hàm lượng flavonoid trong dịch trích được thể hiện ở Hình 3. Xử lý thống kê cho thấy mẫu khô cây cỏ Lào trích ly flavonoid sử dụng dung môi ethanol tăng đáng kể so với mẫu sử dụng dung môi trích ly là nước ($P < 0,05$). Dung môi ethanol được biết là loại dung môi có tính phân cực và hòa tan cao nên có khả năng hòa tan hầu hết các hợp chất sinh học trong mẫu. Etanol gồm nhóm -OH phân cực và nhóm $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ không phân cực, tính chất này giúp khả năng phân tách flavonoid ra khỏi mẫu của ethanol cao hơn nước (Niawanti & ctv., 2019). Hơn nữa một báo cáo trước đây chỉ ra rằng việc chiết xuất các hợp chất phenolic nói chung và các flavonoid nói riêng dễ hòa tan trong dung môi hữu cơ hơn là nước (Kim & Lee, 2002). Cụ thể, hàm lượng TFC đạt được khoảng $29,97 \pm 0,700$ (mg/g, vck) đối với mẫu sử dụng dung môi trích ly là ethanol, trong khi hàm lượng này của mẫu sử dụng dung môi trích ly là nước chỉ đạt khoảng $17,54 \pm 0,718$ (mg/g, vck). Hay nói cách khác, hàm lượng flavonoid trong mẫu trích ly bằng dung môi là ethanol gấp 1,71 lần so mẫu trích ly bằng dung môi là nước. Như vậy, sử dụng dung môi trích ly là ethanol tích cực đến đến hiệu suất trích ly flavonoids từ cây cỏ Lào. Chiết xuất

bằng ethanol đạt hiệu suất tốt hơn so với nước và methanol cũng được báo cáo trước đây bởi Gonfa & ctv. (2020), nghiên cứu đã chỉ ra hiệu suất chiết suất cao nhất khi sử dụng ethanol 80%, tiếp đó là methanol 80% và cuối cùng là nước. Vì vậy, dung môi ethanol được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của dung môi trích ly đến hàm lượng hợp chất sinh học trong dịch trích. TFC: total flavonoid concentration (hàm lượng flavonoid tổng số); vck: vật chất khô.

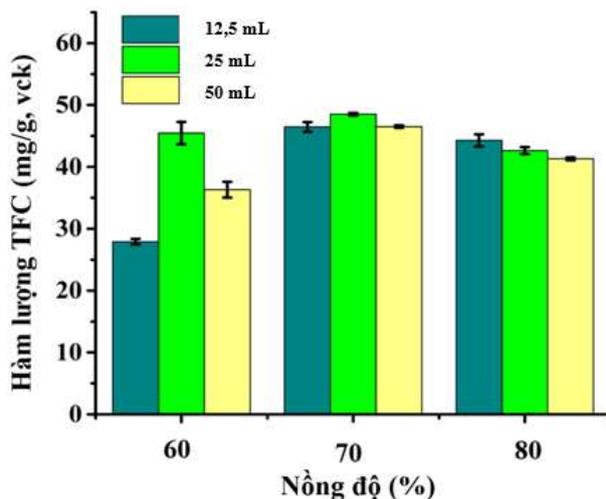
3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ethanol và tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi đến hàm lượng flavonoid trong dịch trích

Sự kết hợp nước và dung môi hữu cơ sẽ tăng tính phân cực của dung môi từ đó cải thiện hiệu suất chiết xuất đối với các hợp chất hòa tan cao trong dung môi hữu cơ và nước (Hapsari & ctv., 2022). Kết quả xử lý thống kê và Hình 4 cho thấy ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng flavonoid có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Khi tăng nồng độ hiệu quả trích ly hàm lượng flavonoid tăng tuyến tính từ nồng độ 60% đến 70% và hàm lượng flavonoid thu được cao nhất ở nồng độ 70% là $48,50 \pm 0,195$ (mg/g, vck). Xu hướng giảm hàm lượng flavonoid này có thể liên quan đến sự hòa tan các flavonoid trong hỗn hợp ethanol/ nước do sự thay đổi sự phân cực của dung môi trích ly. Nói một cách cụ thể rằng hằng số điện môi của nước cao làm cho độ phân cực của hỗn hợp thay đổi theo phần trăm dung môi (Ghasemzadeh & ctv., 2018).

Ngoài nồng độ ethanol thì tỉ lệ dung môi/nguyên liệu cũng là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng trích ly hàm lượng flavonoid.

Giữa các cấu tử trích ly trong nguyên liệu và dung môi trích ly có sự chênh lệch gradient nồng độ và đây chính là động lực chính của quá trình trích ly, khuếch tán chính là cơ chế chính để giải thích sự vận chuyển chất tan bên trong tế bào thực vật ra dung môi, cơ chế này giúp quá trình phân tách các cấu tử trích ly vào dung môi diễn ra nhanh và hiệu quả hơn. Dựa vào Hình 4 ta thấy sau khi khảo sát ở các mức tỉ lệ 1/50, 1/100, 1/200 hàm lượng flavonoid tăng dần và đạt hiệu quả cao nhất ở tỉ lệ 1/200. Điều này có thể giải thích dựa trên nguyên tắc truyền khối, việc sử dụng tỉ lệ dung môi nguyên liệu cao hơn dẫn đến nồng độ gradient cao hơn, khuếch tán được tăng cường và tăng hiệu quả trích ly (Guenneau & Puvirajesinghe, 2013).

Vì vậy, hiệu quả trích ly cao nhất đối với nồng độ và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/200 và nồng độ ethanol được chọn là 70%.

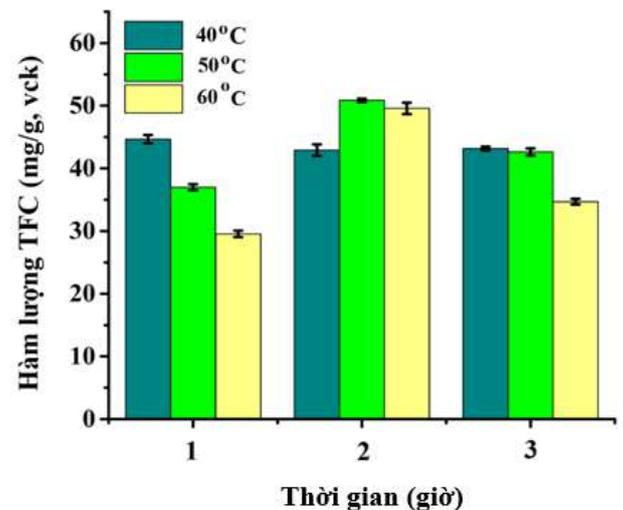


Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng hợp chất sinh học trong dịch trích. TFC: total flavonoid concentration (hàm lượng flavonoid tổng số); vck: vật chất khô.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ đến hàm lượng flavonoid trong dịch trích

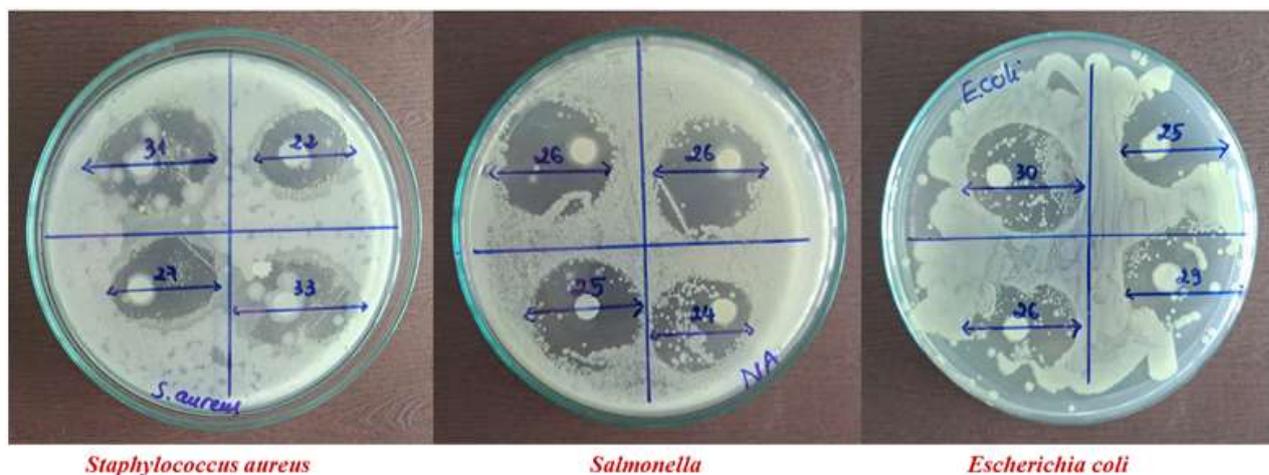
Thời gian và nhiệt độ ảnh hưởng cao đến hàm lượng flavonoid. Kết quả xử lý thống kê và Hình 5 cho thấy ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Các mốc thời gian và nhiệt độ được sử dụng để khảo sát là 1 giờ, 2 giờ

& 3 giờ và 40°C, 50°C & 60°C. Và các yếu tố cố định bao gồm: khối lượng bột cỏ là 0,25 g và thể tích dung môi sử dụng trong tách chiết là 50 mL. Quan sát từ Hình 5 ta thấy hàm lượng flavonoid chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ và thời gian. Nhiệt độ góp phần làm tăng khả năng hòa tan và khuếch tán các hợp chất, đồng thời cũng làm giảm độ nhớt của dung môi, tăng khả năng truyền khối và xâm nhập của dung môi vào thành tế bào thực vật, nhưng cũng không phải nhiệt độ càng cao thì khả năng trích ly các hợp chất sinh học càng tốt (Alide & ctv., 2020).



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ đến hàm lượng flavonoid trong dịch trích. TFC: total flavonoid concentration (hàm lượng flavonoid tổng số); vck: vật chất khô.

Thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 40°C cho thấy có sự giảm tuyến tính hàm lượng flavonoid lần lượt là 44,67 (mg, vck) xuống còn 43,18 (mg, vck) từ 1 đến 3 giờ. Đối với thí nghiệm ở nhiệt độ 50°C và 60°C hàm lượng flavonoid có xu hướng tăng khi tăng thời gian tách chiết từ 1 giờ đến 2 giờ nhưng giảm dần trong giai đoạn từ 2 đến 3 giờ. Điều này có thể được giải thích rằng trong thời gian dài sẽ làm giảm hàm lượng phenolic do các hợp chất này bị oxy hóa khi tiếp xúc lâu với các yếu tố môi trường như ánh sáng và oxy. Thời gian và nhiệt độ tối ưu được chọn là ở khảo sát 2h, 50°C với hàm lượng flavonoid đạt mức cao nhất 50,85 (mg, vck).



Hình 6. Khảo sát khả năng kháng 3 chủng vi khuẩn từ dịch trích cây cỏ lào.

Bảng 1. Đường kính vòng tròn kháng khuẩn

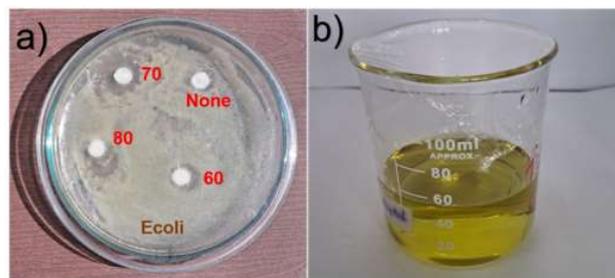
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Escherichia coli</i>
Kích thước vòng kháng khuẩn (mm)			
Dịch trích cỏ lào	28,5 ± 4,8	25,3 ± 0,95	27,5 ± 2,3

3.4. Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết cây cỏ lào

Dựa vào kết quả ở Hình 6 kháng khuẩn và Bảng 1 cho thấy dịch trích cây cỏ lào có khả năng kháng khuẩn cao ở ba chủng vi khuẩn. Dịch trích kháng khuẩn tốt đối với chủng khuẩn *Staphylococcus aureus* hơn các chủng *Salmonella*, *Escherichia coli*. Cụ thể ở chủng khuẩn *Staphylococcus aureus* vòng kháng khuẩn trung bình đạt 28,5 ± 4,8 mm, *Salmonella* đạt 25,3 ± 0,95 mm và *Escherichia coli* đạt 27,5 ± 2,3 mm. Vòng tròn ức chế cho thấy đáng mong đợi hơn so với những nghiên cứu trước đây. Cụ thể, Gogoi & ctv. (2020) đã khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch trích cây cỏ lào ở miền Đông Bắc Ấn Độ trên chủng *Staphylococcus aureus*, kết quả cho thấy vòng tròn kháng khuẩn chỉ đạt 1/2 so với nghiên cứu này. So sánh với một nghiên cứu khác bởi Zhou & ctv. (2019), vòng tròn ức chế vi sinh vật < 13 mm trên cả 2 chủng *S. Aureus* và *S. Paratyphi A* sử dụng dịch trích vanilia và vỏ từ *Quercus variabilis* Blume (Fagaceae).

3.5. Phối chế thử kem bôi da chứa dịch cây cỏ lào

Sau khi phối chế gel, quan sát thấy gel từ dịch trích cây cỏ lào (Hình 7b) có màu ngả vàng, cụ thể là ở nồng độ 70%. Các bước tiến hành tiếp theo



Hình 7. a) Khả năng kháng khuẩn từ gel cây cỏ lào ở các nồng độ khác nhau, b) Thành phẩm và màu sắc sau khi điều chế gel ở nồng độ 70%.

bao gồm: xác định khả năng kháng khuẩn của gel ở các nồng độ khác nhau. Đối với thí nghiệm về khả năng kháng khuẩn, lựa chọn ưu thế nhất ở nồng độ 70% cho thấy vòng tròn kháng khuẩn được tạo ra lớn nhất đối với chủng *Escherichia coli*, tiếp theo đó là 80% và cuối cùng là 60%.

4. Kết Luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy ethanol là dung môi thích hợp để trích ly flavonoid từ cây cỏ lào. Nghiên cứu đã khảo sát các yếu tố trích ly ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid (tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nồng độ, nhiệt độ, thời gian). Các giá trị trích ly cho thấy hàm lượng flavonoid từ cây cỏ lào cao nhất như sau: tỷ lệ nguyên

liệu/dung môi 1:200 g/mL và nồng độ ethanol 70% là $48,50 \pm 0,195$ (mg/g, vck), nhiệt độ 50°C và thời gian 2 giờ là $50,85 \pm 0,266$ (mg/g, vck). Dựa vào kết quả kháng khuẩn của nghiên cứu cho thấy dịch trích cây cỏ lào có khả năng kháng khuẩn tốt nhất đối với chủng khuẩn *Staphylococcus aureus* vòng kháng khuẩn trung bình đạt $(28,5 \pm 4,8 \text{ mm})$. Nghiên cứu phối chế gel từ dịch trích cây cỏ lào và tiến hành thí nghiệm về khả năng kháng khuẩn của gel, ở nồng độ dịch chiết là 70% cho thấy vòng kháng khuẩn được tạo ra lớn nhất đối với chủng *Escherichia coli*. Từ kết quả của nghiên cứu này có thể kiến nghị xu hướng sử dụng chiết xuất từ cây cỏ lào tạo ra các sản phẩm từ thiên nhiên bởi tác dụng kháng khuẩn tốt. Tận dụng nguồn nguyên liệu thiên nhiên hoang dại, rẻ tiền, để ứng dụng cho nhiều lĩnh vực khác nhau trong nghiên cứu và cuộc sống.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Chân thành cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài mã số CS-SV22-HHTP-01.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Alide, T., Wangila, P., & Kiprop, A. (2020). Effect of cooking temperature and time on total phenolic content, total flavonoid content and total in vitro antioxidant activity of garlic. *BMC Research Notes* 13, 564. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05404-8>.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Becker, L. C., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Gill, L. J., & Heldreth, B. (2019). Safety assessment of glycerin as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology* 38(3), 6S-22S. <https://doi.org/10.1177/1091581819883820>.
- Bhuyan, M., Deb, P., & Dasgupta, D. (2019). *Chromolaena odorata*: as nature's wound healer. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 11(4), 63-65. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2019v11i4.34955>.
- Cahyo, A. S. D., Oktavia, S., & Ifora, I. (2021). Anti-inflammatory and analgesic potential of *Chromolaena odorata*: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Medicine* 6(9), 8-16. <https://doi.org/10.47760/ijpsm.2021.v06i09.002>.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3), 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>.
- Chaves, J. O., Souza, M. C. D., Silva, L. C. D., Perez, D. L., Mayanga, P. C. T., Machado, A. P. D. F., Carneiro, T. F., Espinosa, M. V., Peredo, A. V. G. D., Barbero G. F., & Rostagno, M. A. (2020). Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Frontiers in Chemistry* 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.507887>.
- Ghasemzadeh, A., Baghdadi, A., Jaafar, H. Z. E., Swamy, M. K., & Wahab, P. E. M. (2018). Optimization of flavonoid extraction from red and brown rice bran and evaluation of the antioxidant properties. *Molecules* 23(8), 1863. <https://doi.org/10.3390/molecules23081863>.
- Gogoi, R., Sarma, N., Begum, T., Pandey, S. K., & Lal, M. (2020). North-East Indian *Chromolaena odorata* (*L. King Robinson*) aerial part essential oil chemical composition, pharmacological activities - neurodegenerative inhibitory and toxicity study. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 23(6), 1173-1191. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1867009>.
- Gonfa, T., Teketle, S., & Kiros, T. (2020). Effect of extraction solvent on qualitative and quantitative analysis of major phyto-constituents and in-vitro antioxidant activity evaluation of *cadaba rotundifolia* forssk leaf extracts. *Cogent Food and Agriculture* 6(1), 1853867. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1853867>.
- Guenneau, S., & Puvirajesinghe, T. M. (2013). Fick's second law transformed: one path to cloaking in mass diffusion. *Journal of The Royal Society Interface* 10, 20130106. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0106>.
- Hapsari, S., Yohed, I., Kristianita, R. A., Jaidid, N., Aparamarta, H. W., & Gunawan, S. (2022). Phenolic and flavonoid compounds extraction from *calophyllum inophyllum* leaves. *Arabian Journal of Chemistry* 15(3), 103666. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103666>.
- Ifeanacho, M. O., Ikewuchi, J. C., Ikewuchi, C. C., Nweke, P. C., Okere, R., & Nwate, T. L. B. (2021). Prevention of doxorubicin-induced dyslipidaemia, plasma oxidative stress and electrolytes imbalance in wistar rats by aqueous leaf-extracts of *Chromolaena odorata* and *tridax procumbens*. *Scientific African* 11, e00636. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00636>.
- Ikewuchi, C., Ikewuchi, J., & Ifeanacho, M. (2021). Aqueous leafextracts of *Chromolaena odorata* and *tridax procumbens* attenuated doxorubicin-induced pulmonary toxicity in wistar rats. *BioTechnologia* 102(4), 387-398. <https://doi.org/10.5114/bta.2021.111096>.
- Kim, D., & Lee, C. Y. (2002). Extraction and isolation of polyphenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 6(1), 11.2.1-11.2.12. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fai0102s06>.

- Kouamé, P. B. K., Jacques, C., Bedi, G., Silvestre, V., Loquet, D., Nion, S. B., Robins, R., & Tea, I. (2013). Phytochemicals isolated from leaves of *Chromolaena odorata*: Impact on viability and clonogenicity of cancer cell lines. *Phytotherapy Research* 27(6), 835-840. <https://doi.org/10.1002/ptr.4787>.
- Niwanti, H., Lewar, Y. S., & Octavia, N. N. (2019). Effect of extraction time on averrhoa bilimbi leaf ethanolic extracts using soxhlet apparatus. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 543, 012018. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/543/1/012018>.
- Olawale, F., Olofinson, K., & Iwaloye, O. (2022). Biological activities of *Chromolaena odorata*: A mechanistic review. *South African Journal of Botany* 144, 44-57. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.09.001>.
- Onkaramurthy, M., Veerapur, V. P., Thippeswamy, B. S., Reddy, T. N. M., Rayappa, H., & Badami, S. (2013). Anti-diabetic and anti-cataract effects of *Chromolaena odorata* Linn., in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 145(1), 363-372. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.023>.
- Owoyele, V. B., Adediji, J. O., & Soladoye, A. O. (2005). Anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of *Chromolaena odorata*. *Inflammopharmacology* 13, 479-484. <https://doi.org/10.1163/156856005774649386>.
- Sieberi, B. M., Omwenga, G. I., Wambua, R. K., Samoei, J. C., & Ngugi, M. P. (2020). Screening of the dichloromethane: Methanolic extract of centella asiatica for antibacterial activities against *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *The Scientific World Journal* 2020, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2020/6378712>.
- Soosai, M. R., Moorthy, I. M. G., Varalakshmi, P., Syed, A., Elgorban, A. M., Rigby, S. P., Natesan, S., Gunaseelan, S., Joshya, Y. C., Baskar, R., Kumar, R. S., & Karthikumar, S. (2022). Use of activated *Chromolaena odorata* biomass for the removal of crystal violet from aqueous solution: kinetic, equilibrium, and thermodynamic study. *Environmental Science and Pollution Research* 30, 14265-14283. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22822-2>.
- Tungmunnithum, D., Intharuksa, A., & Sasaki, Y. (2020). A promising view of kudzu plant, pueraria montana var. lobata (willd.) sanjappa & pradeep: flavonoid phytochemical compounds, taxonomic data, traditional uses and potential biological activities for future cosmetic application. *Cosmetics* 7(1), 12. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7010012>.
- Vijayaraghavan, K., Rajkumar, J., Bukhari, S. N. A., Sayed, B. A., & Seyed, M. A. (2017). *Chromolaena odorata*: A neglected weed with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecular Medicine Reports* 15, 1007-1016. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6133>.
- Yaouba, A., Nnomo, E. K., Medjap, A. S. Z., & Etoa, L. C. E. (2017). Antibacterial effect of *Chromolaena odorata* extracts on some erwinia isolates, causal agents of tomato fruit rot in Dschang, Cameroon. *Agriculture and Food Security* 6, 55. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0132-6>.
- Zazharskyi, V. V., Davydenko, P. O., Kulishenko, O. M., Borovik, I. V., & Brygadyrenko, V. V. (2019). Antimicrobial activity of 50 plant extracts. *Biosystems Diversity* 27(2), 163-169. <https://doi.org/10.15421/011922>.
- Zhou, D., Liu, Z. H., Wang, D. M., Li, D. W., Yang, L. N., & Wang, W. (2019). Chemical composition, antibacterial activity and related mechanism of valonia and shell from *Quercus variabilis* Blume (Fagaceae) against *Salmonella paratyphi a* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19, 271. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2690-6>.