

STUDY ON ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF ETHANOL EXTRACT FROM *Caulerpa racemosa* AT KIEN GIANG PROVINCE

Tran Thanh Men*, Nguyen Hoang Phuc, Nguyen Thi Kim Hue

Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 26/9/2021	The ethanol extract from the green algae <i>Caulerpa racemosa</i> collected at Hon Son island, Kien Giang province was initially investigated its chemical compositions, and evaluated its antioxidant and antibacterial activities. The antioxidant activity of the ethanolic extract <i>C. racemosa</i> was determined by methods of DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-Azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), phosphomolybdenum and RP (Reducing power). The results indicated that ABTS and phosphomolybdenum method showed highest antioxidant activity with EC ₅₀ values of 174±3.48 µg/mL and 206±1.07 µg/mL, respectively. The antimicrobial activity was investigated on six strains of human pathogenic bacteria. This result demonstrated that the extract was effective in antibacterial activity against four strains of <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria innocua</i> , and <i>Staphylococcus aureus</i> . In addition to these biological activities, the study also examined phenolic and flavonoid total contents in the extract with amounts of 56.7±2.34 mg GAE/g and 128±2.69 mg QE/g, respectively. From these preliminarily experimental results, the extract of green algae <i>Caulerpa racemosa</i> has potential applications in production of pharmaceuticals and functional foods.
Revised: 05/01/2022	
Published: 12/01/2022	
KEYWORDS	
Antioxidant	
Antibacteria	
<i>Caulerpa racemosa</i>	
Flavonoid	
Phenolic	

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CHIẾT XUẤT ETHANOL TỪ TẢO LỤC (*Caulerpa racemosa*) TẠI TỈNH KIÊN GIANG

Trần Thanh Mến*, Nguyễn Hoàng Phúc, Nguyễn Thị Kim Huệ

Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 26/9/2021	Chiết xuất ethanol từ tảo lục <i>Caulerpa racemosa</i> được thu thập tại Hòn Sơn, tỉnh Kiên Giang bước đầu được khảo sát thành phần hóa học, đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn. Hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất được xác định bằng phương pháp DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-Azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), phosphomolybdenum và khử sắt RP (Reducing power). Kết quả khảo sát cho thấy, chiết xuất <i>Caulerpa racemosa</i> thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất ở hai phương pháp ABTS và phosphomolybdenum với các giá trị EC ₅₀ lần lượt là 174±3,48 µg/mL, 206±1,07 µg/mL. Hoạt tính kháng vi khuẩn được khảo sát trên sáu chủng vi khuẩn gây bệnh trên người. Kết quả đã chứng minh chiết xuất có hiệu quả trong hoạt động kháng khuẩn trên bốn chủng vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria innocua</i> , và <i>Staphylococcus aureus</i> . Bên cạnh đó, nghiên cứu còn ghi nhận hàm lượng phenolic và flavonoid tổng số trong chiết xuất lần lượt là 56,7±2,34 mg GAE/g chiết xuất và 128±2,69 mg QE/g chiết xuất. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy, tảo lục <i>Caulerpa racemosa</i> có tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm cũng như thực phẩm.
Ngày hoàn thiện: 05/01/2022	
Ngày đăng: 12/01/2022	
TỪ KHÓA	
<i>Caulerpa racemosa</i>	
Flavonoid	
Kháng oxy hóa	
Kháng khuẩn	
Phenolic	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5083>

* Corresponding author. Email: tmen@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

Trong những năm gần đây, các hợp chất tự nhiên ngày càng được quan tâm nghiên cứu vì tác dụng trung hòa các gốc oxy phản ứng (ROS) cũng như có khả năng hỗ trợ điều trị các bệnh lý có liên quan đến gốc oxy tự do [1], [2]. ROS là nguyên nhân gây ra các tổn thương oxy hóa trong các tế bào, dẫn đến sự khởi đầu của các bệnh như Alzheimer, ung thư và lão hóa. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rong biển lớn (rong biển) có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như vitamin, polysaccharid, sterol, phenol, flavonoid và alkaloid; đây là những hợp chất có tác dụng kháng oxy hoá hiệu quả [3]-[5].

Caulerpa racemosa (*C. racemosa*) còn được gọi là rong nho, là loại rong biển thuộc ngành tảo lục (Chlorophyta), được ăn sống như rau và được trồng ở một số quốc gia thuộc khu vực Ấn Độ Dương và Thái Bình Dương [6]. Một số nghiên cứu đã chứng minh về tác dụng chống oxy hóa và kháng khuẩn của rong lục *C. racemosa* thu được tại Malaysia [7], [8], cũng như tác dụng kháng khuẩn của *C. racemosa* hiện diện tại Ấn Độ và Ai Cập [9]-[11]. Nghiên cứu khởi nguồn về các khu hệ rong biển ở phía Nam Việt Nam từ Dawson (1954) về rong biển Vịnh Nha Trang và vùng phụ cận, với 204 loài được liệt kê và mô tả [12]. Hiện nay, một số nghiên cứu đã đánh giá về sự đa dạng và phân bố các loài rong biển thuộc vùng biển Kiên Giang, trong đó khu vực Bãi Nò, Hà Tiên đã xác định được 23 loài rong biển thuộc 14 chi của 10 họ có tiềm năng kinh tế [13]. Tại khu vực đảo Nam Du, Kiên Giang đã xác định được 96 loài rong biển thuộc 35 họ, 20 bộ của 4 ngành rong [14]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về hoạt tính sinh học như kháng oxy hoá và kháng khuẩn từ loài *C. racemosa* hiện diện vùng biển thuộc tỉnh Kiên Giang còn chưa được thực hiện. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sơ bộ thành phần hóa học, đánh giá hoạt tính sinh học kháng oxy hóa và kháng khuẩn của rong lục *C. racemosa* thu tại vùng biển Kiên Giang.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương tiện nghiên cứu

Vật liệu thí nghiệm: Tảo lục *C. racemosa* (Hình 1) thu vào tháng 01/2021 tại Hòn Sơn, huyện Kiên Hải, tỉnh Kiên Giang và được định danh bởi ThS. Phùng Thị Hằng, Bộ môn Sinh học, Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ theo hệ thống phân loại Rong biển Việt Nam [15].



Hình 1. Rong lục *Caulerpa racemose* với tản rong trong môi trường sinh thái (A) và phần nhánh và nhánh phụ của tản rong (B)

Đối tượng thí nghiệm: Các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ATCC23857, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Listeria innocua* ATCC33090, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 và *Staphylococcus aureus* ATCC25923 được cung cấp từ Viện Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Điều chế chiết xuất: Mẫu rong lục *C. racemosa* sau khi thu được rửa sạch, phơi khô và nghiền thành bột, cho vào trong túi vải và ngâm trong ethanol 96°. Mẫu được ngâm trong 48 giờ, dịch chiết được lọc qua giấy lọc và cô quay thu được chiết xuất ethanol tổng.

2.2.1. Định tính các hợp chất tự nhiên

Việc định tính các hợp chất tự nhiên có trong chiết xuất *C. racemosa* bằng dung môi ethanol được thực hiện theo Jasuja và cộng sự (2013) [16] có hiệu chỉnh, được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp định tính thành phần hoá học có trong chiết xuất

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/ cách thực hiện	Phản ứng dương tính
Lipid	Nhỏ dịch chiết lên giấy	Vết mờ trên giấy
Tinh dầu	Bốc hơi tới cạn	Có mùi thơm
Alkaloid	2 mL chiết xuất + 3-4 giọt thuốc thử Mayer	Kết tủa trắng đục
Flavonoid	1 mL chiết xuất + 3-4 giọt H ₂ SO ₄ đậm đặc	Kết tủa cam, đỏ hoặc xanh
Saponin	1 mL chiết xuất + 5 mL nước cất + 3-4 giọt ethanol. Lắc mạnh và để yên 15 phút	Cột bọt trắng bền vẫn còn sau khi để yên 15 phút
Tanin	2 mL chiết xuất + 5 giọt Gelatin 1%	Kết tủa bông trắng
Phenolic	2 mL chiết xuất + 2 mL nước cất + 2-3 giọt FeCl ₃ (10%)	Tủa màu xanh đen hoặc đỏ cam

2.2.2. Định lượng phenolic và flavonoids tổng

Hàm lượng phenolic tổng (TPC) được xác định theo phương pháp Dewanto và cộng sự (2002) [17] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250 µL chiết xuất nồng độ 100 µg/mL, 250 µL nước và 250 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều. Sau đó, thêm vào 250 µL Na₂CO₃ 10% rồi ủ 30 phút ở 40°C. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm. Hàm lượng phenolic tổng trong chiết xuất được xác định dựa trên đường chuẩn acid gallic.

Hàm lượng flavonoid tổng (TFC) được xác định theo phương pháp Zhishen và cộng sự (1999) [18] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 200 µL dung dịch chiết xuất *C. racemosa* (nồng độ 500 µg/mL) được pha trong ethanol (500 µg/mL), 200 mL nước và 40 µL NaNO₂ 5% lắc đều rồi để yên 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được tiếp tục thêm 40 µL AlCl₃ 10%, lắc đều. Hỗn hợp phản ứng sau khi ủ 6 phút được thêm 400 µL NaOH 1 M và nước cho đủ 1 mL. Dung dịch phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Hàm lượng flavonoid tổng trong chiết xuất *C. racemosa* được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

2.2.3. Hoạt tính kháng oxy hóa

Phương pháp DPPH: Thử nghiệm kháng oxy hóa DPPH được tiến hành theo phương pháp của Sharma và cộng sự (2009) [19] có hiệu chỉnh. Chiết xuất được pha loãng trong ethanol theo dãy nồng độ từ 0 – 2000 µg/mL, thể tích sử dụng là 100 µL được lần lượt cho vào các giếng đã có 100 µL DPPH. Hỗn hợp được ủ trong tối 60 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó hỗn hợp được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. Giá trị EC₅₀ (hiệu quả kháng oxy hóa 50%) được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của cao chiết khảo sát. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH được tính theo công thức sau:

$$E(\%) = (Absc - Absm) / Absc \times 100$$

Trong đó:

E: Hiệu quả kháng oxy hóa (%)

Absc: Giá trị Abs của mẫu đối chứng âm

Absm: Giá trị Abs của mẫu thử

Phương pháp ABTS: Thử nghiệm kháng oxy hóa ABTS^{•+} được tiến hành theo phương pháp của Nenadis và cộng sự (2004) [20] có hiệu chỉnh. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách cho 10 µL chiết xuất (nồng độ khảo sát từ 0 – 300 µg/mL) vào 990 µL gốc tự do ABTS^{•+} và ủ 6 phút ở nhiệt độ phòng, đo độ hấp thụ ở bước sóng 734 nm. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp phosphomolybdenum: Phương pháp này dựa trên khả năng khử Mo (VI) thành Mo (V) của chất kháng oxy hóa và sự hình thành phức hợp màu xanh lá cây. Thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Prieto và cộng sự (1999) [21]. Cho 100 µL mẫu thử ở các nồng độ khảo sát từ 0 - 650 µg/mL vào 1000 µL dung dịch A gồm có H₂SO₄ 0,6 M, sodium phosphate

28 mM, ammonium molybdate 4 mM. Ủ 95°C trong 90 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 695 nm. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp năng lực khử sắt (RP: reducing power): Năng lực khử sắt của chiết xuất ethanol được thực hiện theo phương pháp Zhu và cộng sự (2002) [22]. Hỗn hợp phản ứng lần lượt gồm 0,5 mL chiết xuất nồng độ khảo sát từ 0 - 1000 µg/mL, 0,5 mL dung dịch đệm phosphate (0,2 M, pH = 6,6) và 0,5 mL K₃Fe(CN)₆ 1%. Sau khi hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50°C trong 20 phút, thêm 0,5 mL CCl₃COOH 10% rồi ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch sau khi ly tâm được lấy 0,5 mL lớp trên cho vào 0,5 mL nước và 0,1 mL FeCl₃ 0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm.

2.2.4. Hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất ethanol từ *C. racemosa* được khảo sát ở các nồng độ khác nhau từ 1 – 32 mg/mL bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Môi trường LB (Luria Bertani Broth) được sử dụng để thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn. Đối chứng âm là dung dịch DMSO 10%.

Chuẩn bị vi khuẩn thử nghiệm: Vi khuẩn trước khi sử dụng cho thử nghiệm được nuôi tăng sinh trên môi trường LB lỏng trong 24 giờ ở 37°C, lắc 100 vòng/phút. Huyền phù vi khuẩn được pha loãng để đạt độ đục tương đương 0,5 MC Farland (mật độ vi khuẩn là 10⁶ CFU/mL) [23].

Xác định hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết được thực hiện như sau: Cho vào mỗi đĩa petri 20 mL môi trường LB đặc vô trùng, để yên khoảng 45 phút cho môi trường đông đặc. Trải đều trên bề mặt môi trường LB đặc 100 µL dung dịch vi khuẩn mật độ 10⁶ CFU/mL. Đĩa thạch được để khô 10-15 phút và sau đó đục các giếng có đường kính 6 mm. Chiết xuất pha trong DMSO 10% (nồng độ từ 1 – 32 mg/mL) được cho vào các giếng thạch với thể tích 100 µL. Các đĩa được ủ ở 32°C trong 16-20 giờ. Đường kính vòng ức chế vi khuẩn được đo bằng thước đo đơn vị mm và trừ đường kính giếng thạch [24], [25].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thành phần hóa học có trong chiết xuất ethanol tảo lục *C. racemosa*

Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hợp chất có trong chiết xuất ethanol từ rong lục *C. racemosa* cho thấy sự hiện diện của một số hợp chất có hoạt tính sinh học như phenolic, flavonoid, tanin, lipid và tinh dầu. Các thành phần như alkaloid và saponin đều không thấy hiện diện trong chiết xuất ethanol. Kết quả định tính được thể hiện chi tiết trong Bảng 2.

Bảng 2. Thành phần một số hợp chất hiện diện trong chiết xuất ethanol *C. racemosa*

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/ cách thực hiện	Phản ứng dương tính	Kết quả
Lipid	Nhỏ dịch chiết lên giấy	Vết mờ trên giấy	+
Tinh dầu	Bốc hơi tới cạn	Có mùi thơm	+
Alkaloid	Mayer	Kết tủa trắng	-
Phenolic	FeCl ₃ (10%)	Kết tủa bông trắng	+
Tanin	Gelatin 1%	Kết tủa xanh đen/đỏ cam	+
Flavonoid	Mg/H ₂ SO ₄ đậm đặc	Dung dịch có màu hồng	+
Saponin	Nước cất+3-4 giọt ethanol.	Bọt trắng bền	-

Ghi chú: + có hiện diện; - không hiện diện.

Rong biển có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như polyphenol, sterol, alkaloid, flavonoid, tannin, protein với các acid amin thiết yếu, acid béo không bão hòa đa [3]-[5]. Các hợp chất hoạt tính sinh học này giúp chống lại các tác nhân có hại mà còn có giá trị đối với sức khỏe con người. Các hợp chất phenolic được cấu tạo từ một vòng thơm đơn mang một hoặc nhiều nhóm hydroxyl với cấu trúc cao phân tử thể hiện nhiều hoạt tính sinh học [26], [27]. Dung môi tách chiết có thể ảnh hưởng đến sự hiện diện của một số hợp chất, chiết xuất methanol từ *C.*

racemose thu được từ Vịnh Mannar (Ấn Độ) lại có sự hiện diện của alkaloid và saponin, nhưng lại không có mặt của hợp chất flavonoid và tannin [11].

3.2. Hàm lượng phenolic và flavonoids tổng số

Hàm lượng phenolic tổng ⁽¹⁾ được xác định vào phương trình đường chuẩn của acid gallic: $y = 0,0822x - 0,0677$; $R^2 = 0,9955$. Tương tự, hàm lượng flavonoids tổng ⁽²⁾ được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của quercetin: $y = 0,0064x + 0,0002$; $R^2 = 0,9994$. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng có trong chiết xuất ethanol *C. Racemosa*

Định lượng	Chiết xuất ethanol <i>C. racemosa</i>
TPC (mg GAE/g chiết xuất) ⁽¹⁾	56,7±2,34
TFC (mg QE/g chiết xuất) ⁽²⁾	128±2,69

Ghi chú: TPC = total phenolic content (hàm lượng phenolic tổng số); TFC: total flavonoid content (hàm lượng flavonoid tổng số)

Phenolic và flavonoid hiện được coi là thành phần không thể thiếu trong nhiều ứng dụng trong dược phẩm và mỹ phẩm. Điều này được cho là do các đặc tính kháng oxy hóa, kháng viêm và chống ung thư cùng với khả năng điều hòa chức năng của các enzyme có trong tế bào [28], [29]. Nghiên cứu này đã xác định được hàm lượng TPC và TFC tương ứng có trong chiết xuất ethanol *C. racemosa* là 56,7±2,34 mg GAE/g chiết xuất và 128±2,69 mg QE/g chiết xuất. Kết quả cho thấy hàm lượng TFC chiếm ưu thế hơn so với TPC ở cùng một điều kiện và dung môi tách chiết là ethanol. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rong lục *C. racemosa* chứa hàm lượng TPC và TFC; trong số đó, *C. racemosa* hiện diện tại bờ biển Zhoushan, tỉnh Chiết Giang (Trung Quốc) có hàm lượng TPC tương ứng trong ba loại dung môi đạt 443,2±9,66 mg GAE/100 g (chiết xuất ethanol), 5.051±23,6 mg GAE/100 g (chiết xuất ethyl acetate) và 406,8±8,92 mg GAE/100 g (chiết xuất H₂O) [30]. Rong lục *C. racemosa* thu được từ khu vực ven biển Port Dickson (Hoa Kỳ) có hàm lượng TPC từ ba loại chiết xuất là chloroform, methanol và H₂O tương ứng 13,4±0,86; 10,33±0,02 và 1,74±0,09 mg GAE/g chiết xuất. Tương tự, trong nghiên cứu trên cũng đã xác định được hàm lượng TFC tương ứng 5,46±0,41; 24,5±2,17 và 2,50±0,10 mg QE/g chiết xuất chloroform, methanol và H₂O [31].

3.3. Hoạt tính kháng oxy hoá

3.3.1. Khả năng khử gốc tự do DPPH

Khảo sát khả năng trung hoà DPPH của chiết xuất ethanol *C. racemosa* cho thấy hiệu suất kháng oxy hoá tỷ lệ thuận với nồng độ chiết xuất, khi nồng độ chiết xuất tăng từ 125-2000 µg/mL thì hiệu suất tăng từ 2,85±0,15 đến 22,7±1,24%. Tuy nhiên, hiệu quả kháng oxy hoá không đạt được giá trị EC₅₀ trong phương pháp này. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Hiệu quả trung hoà gốc tự do DPPH của chiết xuất *C. racemosa* theo dãy nồng độ khảo sát

Nồng độ chiết xuất (µg/mL)	Hiệu quả trung hoà DPPH (%)	Hàm lượng acid gallic tương đương (µg/mL)
0	0,00 ^g ±0,00	0,00 ^f ±0,00
125	2,85 ^f ±0,15	3,16 ^e ±0,16
250	5,39 ^e ±0,34	3,48 ^{de} ±0,32
500	8,52 ^d ±0,45	4,21 ^d ±0,30
1000	15,1 ^c ±0,37	6,00 ^c ±0,19
1500	19,0 ^b ±0,96	6,97 ^b ±0,37
2000	22,6 ^a ±1,24	8,50 ^a ±0,34

Ghi chú: Trong cùng một cột các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey

Việc sử dụng các phương pháp kháng oxy hoá khác nhau cung cấp các dữ liệu khách quan hơn khi xác định vai trò của từng thành phần hợp chất có trong chiết xuất *C. racemosa* [32], [33]. Trong nghiên cứu này, ethanol được sử dụng làm dung môi tách chiết các thành phần hợp chất có trong rong lục *C. racemosa*. Mặc khác, hiệu quả kháng oxy hoá đối với các dung môi chiết xuất khác nhau từ rong lục *C. racemosa* cũng đã được thử nghiệm. Cụ thể, giá trị EC_{50} với ba loại dung môi chiết xuất là chloroform, methanol và H_2O tương ứng là $0,65 \pm 0,03$; $2,51 \pm 0,09$ và $7,46 \pm 0,20$ mg/mL [31]. Trong nghiên cứu này, sử dụng chiết xuất ethanol cho thấy hiệu quả kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH khá thấp.

3.3.2. Khả năng khử gốc tự do ABTS

Để xác định khả năng trung hoà gốc tự do ABTS, chiết xuất ethanol *C. racemosa* được khảo sát theo dãy nồng độ từ 25-300 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy, hiệu quả kháng oxy hoá tỷ lệ thuận với nồng độ chiết xuất, hiệu suất từ $7,23 \pm 0,97$ tại nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$ tăng đến $81,7 \pm 0,48$ 300 $\mu\text{g/mL}$. Chi tiết được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Hiệu quả trung hoà gốc tự do ABTS của chiết xuất *C. racemosa* theo dãy nồng độ khảo sát

Nồng độ chiết xuất ($\mu\text{g/mL}$)	Hiệu quả trung hoà ABTS (%)	Hàm lượng acid gallic tương đương ($\mu\text{g/mL}$)
0	$0,00^g \pm 0,00$	$0,00^h \pm 0,00$
25	$7,30^f \pm 0,97$	$8,14^g \pm 0,50$
50	$10,4^f \pm 1,34$	$9,79^f \pm 0,70$
100	$29,4^e \pm 2,10$	$19,8^e \pm 1,00$
150	$44,1^d \pm 1,46$	$27,6^d \pm 0,78$
200	$57,0^c \pm 1,03$	$34,4^c \pm 0,41$
250	$67,0^b \pm 0,92$	$39,7^b \pm 0,26$
300	$81,7^a \pm 0,48$	$47,5^a \pm 0,29$

Ghi chú: Trong cùng một cột các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey

Giá trị EC_{50} phản ánh hiệu quả kháng oxy hóa 50%, giá trị này càng nhỏ chứng tỏ chiết xuất có hoạt tính kháng oxy hóa càng tốt Kusmardiyani và cộng sự (2016) [34]. Theo kết quả nghiên cứu của Belkacemi và cộng sự (2020) [35], dịch chiết chloroform *C. racemosa* đạt hiệu quả nhất trung hoà các gốc DPPH ($1,98 \pm 0,08$ mg/mL) và ABTS ($1,66 \pm 0,05$ mg/mL) so với dịch chiết methanol và hexane. Kết quả khảo sát này cũng đã xác định giá trị EC_{50} của chiết xuất ethanol *C. racemosa* là $174 \pm 3,48$ $\mu\text{g/mL}$.

3.3.3. Hiệu quả phương pháp phosphomolybdenum

Nguyên tắc xác định hoạt tính kháng oxy hóa của phương pháp này dựa trên sự khử Mo (VI) về Mo (V) bởi các hợp chất kháng oxy hóa trong môi trường acid, tạo thành phức hợp phosphate/Mo (V) có màu xanh lá cây. Khả năng kháng oxy hóa được biểu diễn theo độ hấp thụ của mẫu, độ hấp thụ càng lớn thì khả năng kháng oxy hóa càng cao [21]. Giá trị Abs càng lớn chứng tỏ chiết xuất có hoạt tính kháng oxy hóa càng mạnh. Giá trị $Abs_{0,5}$ (khả năng kháng oxy hóa 50%) được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến $y = 0,0023x + 0,0247$, $R^2 = 0,9969$. Kết quả khảo sát đã xác định khả năng khử phức Mo của chiết xuất *C. racemosa* có giá trị $Abs_{0,5}$ là $206 \pm 1,07$ $\mu\text{g/mL}$.

3.3.4. Hiệu quả trung hoà năng lực khử sắt

Chiết xuất ethanol *C. racemosa* trong phương pháp RP được khảo sát ở các nồng độ 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 và 700 $\mu\text{g/mL}$. Giá trị Abs 700 nm được khảo sát theo từng nồng độ. Tương tự như phương pháp DPPH, ABTS và phosphomolybdenum, khả năng khử sắt tỷ lệ thuận với nồng độ chiết xuất. Phương pháp RP dựa theo nguyên tắc chất kháng oxy hóa sẽ khử ion Fe^{3+}

trong phân tử kali ferricyanid thành Fe^{2+} [22]. Kết quả cho thấy khả năng kháng oxy hoá của chiết xuất ethanol *C. racemosa* trong phương pháp RP đều thấp hơn khi so sánh với chất chuẩn là acid gallic ($y = 0,0494x - 0,0054$; $R^2 = 0,993$; $\text{Abs}_{0,5} = 10,2 \mu\text{g/mL}$). Đồng thời, hiệu quả kháng oxy hoá khá thấp và không đạt được giá trị $\text{Abs}_{0,5}$ trong phương pháp này.

3.4. Hoạt tính kháng khuẩn

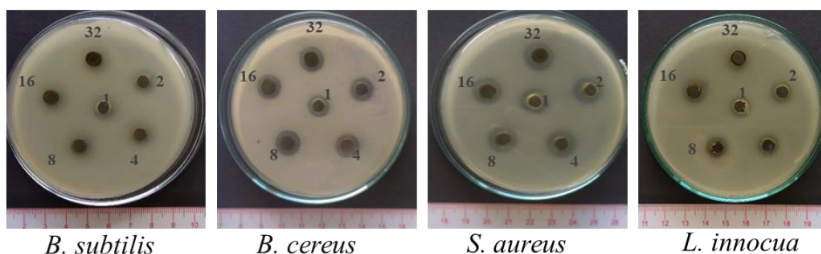
Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất ethanol *C. racemosa* được khảo sát dựa trên phương pháp khuếch tán đĩa thạch và kích thước vòng vô khuẩn. Đường kính vòng vô khuẩn tại các nghiệm thức đã được trừ đường kính của giếng thạch 6 mm. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của chiết xuất *C. racemosa*

Vi khuẩn	Nồng độ chiết xuất (mg/mL)					
	1	2	4	8	16	32
<i>B. cereus</i>	4,00±0,00	4,83±0,29	5,33±0,29	5,83±0,29	6,00±0,00	6,33±0,29
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	7,83±0,29	8,50±0,00	8,67±0,29
<i>L. innocua</i>	3,00±0,00	3,17±0,00	3,83±0,29	4,83±0,29	5,00±0,00	5,00±0,00
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	5,00±0,00	5,67±0,57	5,83±0,29	6,67±0,29	7,17±0,29	8,00±0,00

Ghi chú: -: không kháng khuẩn

Rong biển có khả năng tổng hợp một số hợp chất được gọi là các chất chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp. Những hợp chất này có cấu trúc và chức năng khác nhau, các hợp chất như polyphenols, alkaloids, terpenes, polysaccharides, fatty acids, sterols, lactones, proteins và peptides đều có những hoạt tính sinh học khác nhau [3], [36]. Ulvan là một polysaccharide có tính acid, tồn tại trong thành tế bào của một số loài rong lục như loài *Ulva reticulata* thu được tại vùng biển Nha Trang (Việt Nam) cho thấy hoạt tính kháng khuẩn cao chống lại 4 loài vi khuẩn gram dương (*B. cereus*, *S. faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *S. aureus*) và 3 loài khuẩn gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Vibrio haveyi*) [37].



Hình 2. Khả năng kháng khuẩn của chiết xuất *C. racemosa*

Kết quả nghiên cứu cho thấy chiết xuất *C. racemosa* có khả năng ức chế vi khuẩn *B. subtilis*, *B. cereus*, *L. innocua* và *S. aureus* tăng theo dãy nồng độ khảo sát (Hình 2). Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy hai loài vi khuẩn *E. coli* và *P. aeruginosa* không bị ức chế bởi chiết xuất ethanol *C. racemosa*. Theo nghiên cứu của Kandhasamy và Arunachalam (2008) [38], chiết xuất methanol của hai loài rong lục *C. racemosa* và *Ulva lactuca* (Tamil Nadu, Ấn Độ) có khả năng ức chế 8 chủng vi khuẩn gây bệnh (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogens*, *P. aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *S. aureus* và *B. subtilis*), tuy nhiên chiết xuất từ hai loài rong trên không có khả năng kháng *E. coli*. Nghiên cứu của Nagaraj và Osborne (2014) [11] cũng đã thử nghiệm chiết xuất methanol *C. racemosa* thu thập từ vịnh Mannar (Ấn Độ) và cho thấy hiệu quả kháng khuẩn với kích thước vòng vô khuẩn tương ứng trên các chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* (16 mm), *E. coli* (12 mm) và *Salmonella typhi* (12 mm), *B.*

subtilis (10 mm) và *S. aureus* (8 mm). Sự khác nhau giữa kết quả kháng khuẩn ở các nghiên cứu có thể do một số yếu tố như dung môi chiết xuất, điều kiện thời tiết và vị trí địa lý thu mẫu [39] ảnh hưởng đến hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học có trong chiết xuất.

4. Kết luận

Kết quả khảo sát cho thấy, tảo lục *C. racemosa* có khả năng kháng oxy hóa và kháng một số loài vi khuẩn gây bệnh trên người như *B. subtilis*, *B. cereus*, *L. innocua* và *S. aureus*. Kết quả định tính và định lượng cũng cho thấy tảo lục *C. racemosa* có hiện diện các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học tốt. Từ đó cho thấy, tảo lục *C. racemosa* tại Kiên Giang có nhiều tiềm năng cho ứng dụng trong dược phẩm và thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review," *Journal of functional foods*, vol. 18, pp. 820-897, 2015.
- [2] S. Park, S. S. Han, C. H. Park, E. R. Hahm, S. J. Lee, H. K. Park, and J. H. Lee, "L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms," *The International Journal of biochemistry and cell biology*, vol. 36, no. 11, pp. 2180-2195, 2004.
- [3] M. Farasat, R. A. Khavari-Nejad, S. M. B. Nabavi, and F. Namjooyan, "Antioxidant properties of some filamentous green algae (*Chaetomorpha* Genus)," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 56, pp. 921-927, 2013.
- [4] D. I. Dhinakaran, P. Geetha, and J. S. Rajalakshmi, "Antioxidant activities of marine algae *Valoniopsis pachynema* and *Sargassum swartzii* from the south east coast of India," *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, vol. 3, no. 2, pp. 426-430, 2015.
- [5] Q. B. Aroyehun, S. Abdul Razak, K. Palaniveloo, T. Nagappan, N. S. N. Rahmah, G. W. Jin, and A. P. Kunnath, "Bioprospecting Cultivated Tropical Green Algae, *Caulerpa racemosa*: A Perspective on Nutritional Properties, Antioxidative Capacity and Anti-Diabetic Potential," *Foods*, vol. 9, no. 9, p. 1313, 2020.
- [6] T. Nagappan and C. S. Vairappan, "Nutritional and bioactive properties of three edible species of green algae, genus *Caulerpa* (Caulerpaceae)," *Journal of Applied Phycology*, vol. 26, no. 2, pp. 1019-1027, 2014.
- [7] P. Matanjun, S. Mohamed, N. M. Mustapha, K. Muhammad, and C. H. Ming, "Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo," *Journal of Applied Phycology*, vol. 20, no. 4, pp. 367-373, 2008.
- [8] Y. S. Chan, C. W. Ong, B. L. Chuah, K. S. Khoo, F. Y. Chye, and N. W. Sit, "Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activities of selected marine organisms collected from the coastal areas of Malaysia," *Journal of Marine Science and Technology*, vol. 26, no. 1, p. 13, 2018.
- [9] M. Khandhasamy and K. D. Arunachalam, "Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India," *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 7, pp. 1958-1961, 2008.
- [10] D. Radhika, C. Veerabahu, and R. Priya, "Antibacterial activity of some selected seaweeds from the Gulf of Mannar Coast, South India," *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 5, pp. 89-90, 2012.
- [11] S. R. Nagaraj and J. W. Osborne, "Bioactive compounds from *Caulerpa racemosa* as a potent larvicidal and antibacterial agent," *Front. Biol.*, vol. 9, pp. 300-305, 2014.
- [12] E. Y. Dawson, "Marine plants in the vicinity of the Institut Océanographique de Nha Trang, Viet Nam," *Pac. Sci.*, vol. 8, pp. 373-469, 1954.
- [13] V. T. Nguyen, "Seasonal variation of economic seaweed at Bai No, Ha Tien, Kien Giang province," *Academia Journal of Biology*, vol. 35, no. 3se, pp. 34-40, 2013.
- [14] A. D. Do, T. D. Dinh and D. T. Dam, "Diversity of species and distribution of seaweed in Nam Du archipelago, Kien Giang," *Science Journal of Can Tho University*, vol. 55, no. 4, pp. 71-81, 2019.
- [15] H. H. Pham, "Marine algae of South Vietnam (Vietnam seaweed)," *Ministry of Education and Youth - Center for Learning Publishing*, vol. 1, pp. 495-496, 1969.
- [16] N. D. Jasuja, S. K. Sharma, R. Saxena, J. Choudhary, R. Sharma, and S. C. Joshi, "Antibacterial, antioxidant and phytochemical investigation of *Thuja orientalis* leaves," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 7, no. 25, pp. 1886-1893, 2013.
- [17] V. Dewanto, W. Xianzhong, K. K. Adom, and R. H. Liu, "Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 10, pp. 3010-3014, 2002.

- [18] J. Zhishen, T. Mengcheng, and W. Jianming, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals," *Food chemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 555-559, 1999.
- [19] O. P. Sharma and T. K. Bhat, "DPPH antioxidant assay revisited," *Food chemistry*, vol. 113, no. 4, pp. 1202-1205, 2009.
- [20] N. Nenadis, L. F. Wang, M. Tsimidou, and H. Y. Zhang, "Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 52, no. 15, pp. 4669-4674, 2004.
- [21] P. Prieto, M. Pineda, and M. Aguilar, "Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E," *Anal Biochem*, vol. 269, pp. 337-341, 1999.
- [22] Q. T. Zhu *et al.*, "Antioxydative activities of oolong tea," *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, vol. 50, pp. 6929-6934, 2002.
- [23] A. R. Shahverdi, A. Fakhimi, H. R. Shahverdi, and S. Minaian, "Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 168-171, 2007.
- [24] I. Wiegand, K. Hilpert, and R. E. Hancock, "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances," *Nature protocols*, vol. 3, no. 2, pp. 75-163, 2008.
- [25] M. G. Papich, "Antimicrobials, Susceptibility Testing, and Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) in Veterinary Infection Treatment," *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, vol. 43, pp. 1079-1089, 2013.
- [26] Y. X. Li, I. Wijesekara, Y. Li, and S. K. Kim, "Phlorotannins as bioactive agents from brown algae," *Process biochemistry*, vol. 46, no. 12, pp. 2219-2224, 2011.
- [27] M. Gómez-Guzmán, A. Rodríguez-Nogales, F. Algieri, and J. Gálvez, "Potential role of seaweed polyphenols in cardiovascular-associated disorders," *Marine drugs*, vol. 16, no. 8, p. 250, 2018.
- [28] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, "Flavonoids: an overview," *Journal of nutritional science*, vol. 5, pp. 4-11, 2016.
- [29] P. Karak, "Biological activities of flavonoids: an overview," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 10, no. 4, pp. 1567-1574, 2019.
- [30] Z. Li, B. Wang, Q. Zhang, Y. Qu, H. Xu, and G. Li, "Preparation and antioxidant property of extract and semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*," *Journal of applied phycology*, vol. 24, no. 6, pp. 1527-1536, 2012.
- [31] W. F. Yap, V. Tay, S. H. Tan, Y. Y. Yow, and J. Chew, "Decoding antioxidant and antibacterial potentials of Malaysian green seaweeds: *Caulerpa racemosa* and *Caulerpa lentillifera*," *Antibiotics*, vol. 8, no. 3, p. 152, 2019.
- [32] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *The International Journal of biochemistry and cell biology*, vol. 39, no. 1, pp. 44-84, 2007.
- [33] A. M. Pisoschi and G. P. Negulescu, "Methods for total antioxidant activity determination: a review," *Biochem Anal Biochem*, vol. 1, no. 1, p. 106, 2011.
- [34] S. Kusmardiyani, G. Novita, and I. Fidrianny, "Antioxidant activities from various extracts of different parts of kelakai (*Stenochlaena palustris*) grown in central Kalimantan – Indonesia," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 9, pp. 215-219, 2016.
- [35] L. Belkacemi, M. Belalia, A. C. Djendara, and Y. Bouhadda, "Antioxidant and antibacterial activities and identification of bioactive compounds of various extracts of *Caulerpa racemosa* from Algerian coast," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 10, no. 2, p. 87, 2020.
- [36] M. J. Pérez, E. Falqué, and H. Domínguez, "Antimicrobial action of compounds from marine seaweed," *Marine drugs*, vol. 14, no. 3, p. 52, 2016.
- [37] T. T. V. Tran, H. B. Truong, N. H. V. Tran, T. M. T. Quach, T. N. Nguyen, M. L. Bui, and T. T. T. Thanh, "Structure, conformation in aqueous solution and antimicrobial activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva reticulata*," *Natural product research*, vol. 32, no. 19, pp. 2291-2296, 2018.
- [38] M. Kandhasamy and K. D. Arunachalam, "Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India," *African journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 12, pp. 1959-1960, 2008.
- [39] J. P. Santos, P. B. Torres, D. Y. dos Santos, L. B. Motta, and F. Chow, "Seasonal effects on antioxidant and anti-HIV activities of Brazilian seaweeds," *Journal of Applied Phycology*, vol. 31, no. 2, pp. 1333-1341, 2019.