

ASSESSMENT OF BIOACTIVITY OF *ALIX BABYLONICA* EXTRACT IN THAI NGUYEN PROVINCE

Hoang Phu Hiep, Pham Hong Chuyen, Tu Quang Trung, Pham Van Khang*

TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 21/12/2022 Revised: 18/4/2023 Published: 20/4/2023	Willows (<i>Salix babylonica</i>) are trees and shrubs that are widely distributed in Africa, North America, Europe, and Asia. This species is used in folk medicine and contains many biologically active substances, including salicin, a precursor of salicylic acid. In this study, we extracted 500g of ethanol extract from 6kg of fresh willow leaves using the reflux extraction method to determine its chemical composition and evaluate its antibacterial and antioxidant activities. The results showed that the ethanol extract of willow leaves contains phenolic, alkaloid, flavonoid, coumarin, and steroid groups. It also exhibits high antioxidant activity, with an average IC₅₀ value of 5.65 µg/ml. Moreover, the ethanol extract of willow leaves exhibits strong antibacterial activity, especially against Gram-positive bacteria such as <i>Staphylococcus aureus</i>. However, its antibacterial activity against Gram-negative bacteria such as <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Citrobacter freundii</i> is comparatively weaker. These research findings highlight the potential of willow trees as a natural alternative to antibiotics in the treatment of bacterial diseases in humans.
KEYWORDS <i>Salix babylonica</i> Ethanol extract Biological activity Antibacterial Antioxidant	

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT LIỄU (*SALIX BABYLONICA*) THU TẠI THÁI NGUYÊN

Hoàng Phú Hiệp, Phạm Hồng Chuyền, Từ Quang Trung, Phạm Văn Khang*

Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 21/12/2022 Ngày hoàn thiện: 18/4/2023 Ngày đăng: 20/4/2023	Liều (<i>Salix Babylonica</i>) là cây thân gỗ, cây bụi phân bố rộng rãi ở Châu Phi, Bắc Mỹ, Châu Âu và Châu Á. Loài này được sử dụng trong y học dân gian và có nhiều các chất có hoạt tính sinh học, trong đó có salicin, một tiền chất của axit salicylic. Trong nghiên cứu này, 500 g cao ethanol chiết xuất từ 6kg lá Liều tươi bằng phương pháp chiết hồi lưu được xác định thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả cho thấy, trong cao chiết ethanol của lá Liều có các nhóm phenolic, alkaloid, saponin, flavonoid, coumarin, steroid. Cao chiết ethanol của lá Liều có hoạt tính oxy với giá trị IC₅₀ trung bình là 5,65 µg/ml. Cao chiết ethanol Liều có khả năng kháng khuẩn mạnh nhất với các chủng vi khuẩn Gram dương như <i>Staphylococcus aureus</i>. Đối với các vi khuẩn Gram âm như <i>Pseudomonas aeruginosa</i> và <i>Citrobacter freundii</i>, hoạt tính kháng khuẩn kém hơn. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng của cây Liều có thể thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh do vi khuẩn gây ra ở người.
TỪ KHÓA Liều Cao chiết ethanol Hoạt tính sinh học Kháng oxy hoá Kháng khuẩn	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7157>

* Corresponding author. Email: khangpv@tnue.edu.vn

1. Giới thiệu

Liễu (*Salix Babylonica*) là cây thân gỗ hay cây bụi, phân bố rộng rãi ở Châu Phi, Bắc Mỹ, Châu Âu và Châu Á. Loài này được sử dụng trong y học cổ truyền và có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó có salicin, một tiền chất của axit salicylic. Trong Liễu có khoảng 322 chất chuyển hóa thứ cấp như flavonoid, glycoside, procyanidin, axit hữu cơ và các dẫn xuất của chúng, phenol, sterol và terpen, lignans, chất bay hơi và axit béo. Lá Liễu chủ yếu chứa flavonoid, axit phenolic, các dẫn xuất của chúng và glycoside phenolic, trong khi vỏ thân chủ yếu chứa procyanidin [1].

Cây Liễu chứa nhiều loại flavonoid, đặc trưng cho từng loài như: flavon, flavonols, flavanones, dihydroflavonols, isoflavone, chalcones, dihydrochalcones, flavan-3-ols và anthocyanins. Các loại flavonoid được phát hiện nhiều nhất trong lá và hiếm khi ở rễ. Các flavon như apigenin và các glycoside của nó là thành phần chính của lá loài *S. acutifolia* Willd., *S. matsudana* Koidz. và loài *S. babylonica* L. Kaempferol và dẫn xuất 7,4-dimethyl của nó được tìm thấy là thành phần chính trong loài *S. bordensis* Turcz. Ngoài ra, kaempferol-7-O-glucoside là một hợp chất chính trong lá và rễ của loài *S. babylonica* L. [2]. Glycoside là chất chuyển hóa thứ cấp chính trong họ *Salicaceae* [3]. Các phenolic glycoside thường chiếm tới 30% trong khối lượng thực vật khô. Hàm lượng phenolic glycoside cao nhất là trong lá Liễu, tiếp theo là cành, thân và vỏ cây. Salicin, tremuloidin, tremulacin được tìm thấy là những thành phần chính trong thân và vỏ cây non *S. Acutifolia* Willd., trong lá *S. chaenomeloides* Kimura, cành loài *S. routeulosa* Seemen và lá loài *S. tetrasperma* Roxb. Một số phenolic glycoside được xác định là dấu hiệu phân loại cho các loài Liễu khác nhau. Ví dụ như Acemophyllin A và acemophyllin B được xác định là chỉ thị phân loại đối với lá *S. acmophylla* Boiss. [4]. Chaenomeloidin, cochinchiside A0, lasiandrin, leonuriside A, salicin-7-sulfate được xác định là dấu hiệu phân loại cho lá *S. chaenomeloides*, *S. koriyanagi* Kimura. Stems [5].

Cây Liễu đã được sử dụng trong y học từ thời cổ đại và có liên quan đến việc phát hiện ra axit acetylsalicylic và aspirin. Theo truyền thống, những cây này được sử dụng để điều trị các chứng đau nhức cơ xương khớp, viêm và sốt. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy khả năng kháng nấm, kháng khuẩn [6], ức chế HIV [7], chống oxy hóa [8], [9], chống ung thư [10]. Salicin là một chất chuyển hóa có hoạt tính được lý chính trong Liễu và thủy phân trong đường tiêu hóa để tạo thành rượu salicyl và D-glucose. Sau khi hấp thụ, chất này bị oxy hóa thành axit salicylic, một loại thuốc có hoạt tính ức chế cyclooxygenase (COX I, II) [11]. Nhiều nghiên cứu trước đây đã đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cây Liễu và các thành phần tích cực trong chiết xuất của chúng chống lại các loại vi khuẩn khác nhau như *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis*, vi khuẩn hình thành màng sinh học nha khoa (*Streptococcus mutans* và *Lactobacillus*) và *Salmonella enterica*. Một nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng, chiết xuất vỏ thân và hoa của *S. tetrasperma* Roxb. có khả năng kháng lại *P. aeruginosa*. Cả hai chất chiết xuất đều ức chế sự phát triển của vi khuẩn *P. aeruginosa* ở mức 40 mg/ml [6]. Sử dụng các phương pháp khác nhau, các nhà khoa học đã chứng minh được khả năng kháng nấm của cây Liễu với các chủng như *Candida guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* và *Fusarium oxysporum* [1].

Trong nghiên cứu này, cao chiết Liễu được xác định hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính oxy hóa nhằm góp phần cho thấy tiềm năng sử dụng cao Liễu trong y dược.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Lá Liễu được thu hái tại phường Quang Trung, thành phố Thái Nguyên trong tháng 05/2022. Cây Liễu được định danh bởi PGS. TS. Sỹ Danh Thường, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên. Sau khi thu hái, lá Liễu được rửa sạch cắt nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong 72 giờ để tạo cao chiết.

Các chủng vi khuẩn kiểm định: *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* được cung cấp bởi khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

2.2. Phương pháp

Lá Liễu được rửa sạch, sấy khô ở 50°C đến trọng lượng không đổi, tiếp theo mẫu được ngâm với ethanol 99,5% ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 4 giờ (lặp lại 3 lần). Sau đó, lọc dịch chiết của 3 lần và tiến hành cô quay chân không để thu hồi dung môi dưới áp suất thấp và nhiệt độ -10°C. Cao chiết được lưu giữ ở 4°C để tiến hành nghiên cứu tiếp theo.

Thành phần hoá học cao chiết ethanol của Liễu được định tính bằng phản ứng nhận biết [12]: polyphenol (sử dụng FeCl_3 5% và H_2SO_4 đặc), flavonoid (sử dụng Mg/HCl đặc), alkaloid (sử dụng thuốc thử Dragendoff và Mayer), saponin (sử dụng antimoin trichlorid và thuốc thử Liebermann-Burchardt), coumarin (sử dụng dung dịch NaOH 10%), steroid (phản ứng Liberman-Bourchar).

Khả năng chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp DPPH- Diphenylpicrylhydrazyl [13]. Dung dịch DPPH nồng độ 0,1 mM, các mẫu cao chiết hòa tan với methanol (MeOH) để đạt nồng độ ban đầu 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, đối chứng dương axit ascorbic nồng độ 10; 20; 30; 40; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ được pha loãng bằng methanol. Các mẫu cao chiết được tiến hành khảo sát ở 5 nồng độ và lặp lại 3 lần. Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch thử với 5 nồng độ thử vào ống nghiệm đã có sẵn 3 mL MeOH, tiếp theo đó là 0,5 mL dung dịch DPPH 0,6 mM. Đối với mẫu đối chứng, thay dung dịch thử bằng MeOH, ống nghiệm của mẫu trắng chỉ chứa MeOH. Các ống nghiệm sau khi pha được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng 30 phút, sau đó đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Hoạt tính kháng oxy hóa (%) = $((A_c - A_t)/A_c) \times 100$; trong đó, A_c : Giá trị hấp thụ quang phổ của mẫu đối chứng; A_t : Giá trị hấp thụ quang phổ của mẫu thử. Từ kết quả tính được và nồng độ mẫu, tiến hành vẽ phương trình đường thẳng tuyến tính giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính kháng oxy hóa để tính IC_{50} . Giá trị IC_{50} càng thấp tương ứng với hoạt tính kháng oxy hóa càng cao và ngược lại.

Hoạt tính kháng khuẩn của cao Liễu được xác định bằng phương pháp đo đường kính vòng kháng khuẩn [14]. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết được xác định dựa trên vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch (6 mm) có chứa cao chiết. Cao Liễu được hoà tan trong dung dịch DMSO 2% (DMSO 2%, Tween 80 0,2% H_2O 97,8%) thành các tỷ lệ 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL. Dịch vi khuẩn (10^6 vi khuẩn/mL) được trải đều trên bề mặt đĩa thạch môi trường LB (môi trường Luria-Bertani: Peptone 10g/L + Yeast Extract 5g/L + Muối NaCl 10g/L) với thể tích dịch vi khuẩn là 100 μL . Tiến hành đục lỗ tạo giếng thạch và nhỏ vào mỗi giếng thạch 50 μL cao chiết ở các nồng độ khác nhau, giữ các đĩa thí nghiệm trong 4 giờ ở nhiệt độ 10°C, tới khi dịch chiết từ các giếng khuếch tán ra môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Đường kính vòng kháng vi khuẩn được đo bằng thước đo đơn vị mm sau 24 giờ ủ mẫu ở nhiệt độ 30°C. Đối chứng âm là dung dịch DMSO 2%, đối chứng dương là kháng sinh Ampicilline 100 mg/mL.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo cao chiết và định tính thành phần hóa học

6 kg mẫu lá Liễu tươi được đem cắt nhỏ, sấy khô thu được 3,0 kg khô và chiết hồi lưu với ethanol 90% ở nhiệt độ 80°C trong thời gian là 4 giờ, cất thu hồi dung môi được cao chiết 500 g ethanol. Tiếp theo, cao chiết ethanol được lưu ở 4°C để sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

Để định tính thành phần hoá học của cao chiết Liễu, chúng tôi tiến hành phản ứng nhận biết màu. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Qua bảng 1 ta thấy, trong cao chiết ethanol có các hợp chất hữu cơ như phenolic, alkaloid, saponin, flavonoid, coumarin và steroid. Các nhóm hợp chất này có mặt trong nhiều loài thực vật đã được ứng dụng làm thuốc chữa bệnh. Kết quả này hoàn toàn phù hợp các các nghiên cứu trước đây của tác giả González-Alamilla và cộng sự. Ngoài các thành phần tương tự như hydroxyl phenol, coumarin, lacton, flavonols, quinon, saponin polyphenol; tác giả González-Alamilla còn xác định được sự có mặt của triterpenes và các hợp chất steroid [15].

Bảng 1. Kết quả định tính một số nhóm chất hữu cơ có trong cao Liễn

STT	Nhóm chất	Phản ứng	Phản ứng màu cao chiết ethanol
1	Phenolic	dd FeCl ₃ 5% H ₂ SO ₄ đặc	Màu xanh Màu nâu đỏ
2	Alkaloid	Dragendoff Mayer	Tủa, vàng nhạt Tủa, vàng nhạt
3	Saponin	Antimoin trichlorid trong dung dịch chloroform Liebermann-Burchardt	Màu vàng Màu xanh
4	Flavonoid	Mg/HCl đặc	Màu hồng nhạt
5	Coumarin	NaOH đặc	Tủa, vàng
6	Steroid	Lieberman-Bourchar	Màu tím đỏ

3.2. Hoạt tính chống oxy hoá cao chiết ethanol Liễn

Hoạt tính chống oxy hoá là một trong những tính chất rất tốt đối với con người nhằm chống lại các tác nhân oxy hoá DNA và lipid trong cơ thể. Hoạt tính chống oxy hoá cao chiết ethanol Liễn bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH. Nguyên tắc của phương pháp: DPPH là gốc tự do có màu tím, độ hấp thụ quang cực đại tại bước sóng 517 nm. Khi cho dung dịch chất có khả năng chống oxy hóa vào dung dịch DPPH thì các gốc tự do bị khử và mất màu tím. Dựa vào khả năng làm mất màu tím gốc tự do DPPH của dung dịch, ta xác định được khả năng chống oxy hóa của mẫu thông qua đường chuẩn Trolox. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết ethanol lá Liễn có hoạt tính chống oxy khá cao với giá trị IC₅₀ trung bình là 5,65 µg/ml, trong khi đối chứng, chúng tôi sử dụng Vitamin C có giá trị IC₅₀ là 1,70 µg/ml. Như vậy, so với vitamin C, hoạt tính chống oxy của cao chiết Liễn thấp hơn 3,3 lần.

Năm 2013, Ishikado và cộng sự đã chứng minh được chiết xuất vỏ cây Liễn tạo ra các enzyme chống oxy hoá và ngăn ngừa quá trình oxy hoá thông qua hoạt hoá enzyme mã hoá bởi gen Nrf2. Tác giả đã chứng minh được rằng, chiết xuất vỏ cây Liễn có tác dụng chống oxy hoá trong tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người [16].

Năm 2018, Wahab và cộng sự cũng đã xác định hoạt tính oxy hoá của cao chiết. Tác giả sử dụng nhiều dung môi trên rễ, thân và lá. Kết quả cho thấy, chiết xuất của lá kém hơn so với chiết xuất vỏ cây. Cao chiết sử dụng dung môi etyl axetat và petroleum ether có hoạt tính chống oxy hóa thấp nhất. Theo Wahab và cộng sự, các hợp chất polyphenolic trong Liễn có vai trò chính trong hoạt tính chống oxy hoá, các chất này có nhiều công dụng như chống ung thư và lão hoá. Các chất polyphenol có khả năng trung hoà các gốc tự do, duy trì sự ổn định của bộ gen và hình thành bảo vệ DNA. Tác giả cũng xác định được hàm lượng polyphenol của phân đoạn tách chiết etyl acetate của lá và vỏ là cao nhất đạt 35,063 µg/mg và 59,788 µg/mg [17].

3.3. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết ethanol Liễn

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết ethanol Liễn

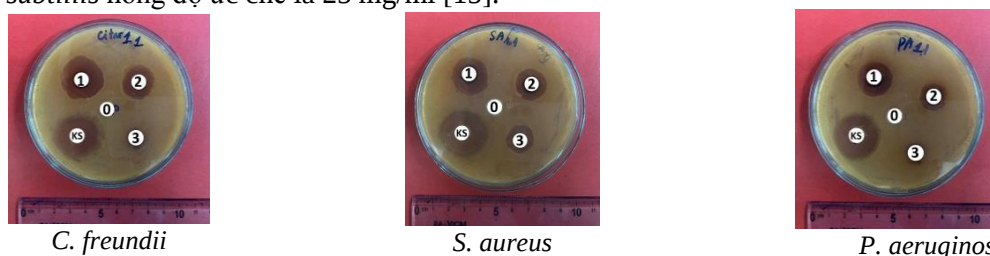
		Đơn vị: mm		
Nồng độ	Vi khuẩn	<i>C. freundii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicilline (100 mg/mL)		16,63 ^a	18,93 ^c	18,00 ^b
Chiết ethanol 100 mg/mL		18,30 ^c	14,14 ^b	12,67 ^a
Chiết ethanol 50 mg/mL		14,33 ^c	11,17 ^b	8,70 ^a
Chiết ethanol 25 mg/mL		0,00 ^a	8,07 ^b	0,00 ^a

Chú thích: Các giá trị mang chữ mũ khác nhau theo hàng thì sự sai khác có ý nghĩa thống kê nhỏ hơn 5% với phép thử Duncan

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết ethanol Liễn trên từng chủng vi khuẩn được thể hiện trên bảng 2 và hình 1. Kết quả cho thấy, cao chiết ethanol Liễn có khả năng ức chế tốt sự phát triển của cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Mức độ kháng khuẩn phụ thuộc nồng độ sử dụng. Trong đó, nồng độ 100 mg/mL có khả năng kháng khuẩn tốt nhất. Hiệu quả kháng khuẩn của cao chiết

ethanol Liễu tốt nhất trên chủng vi khuẩn *C. freundii*, sau đó đến *P. aeruginosa* và thấp với *S. aureus*. Ở nồng độ 25 mg/ml, cao chiết Liễu không có khả năng kháng vi khuẩn *C. freundii* và *S. aureus*. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Wahab và cộng sự vào năm 2018 [17].

Năm 2013, Sulaiman và cộng sự đã đánh giá hoạt tính kháng khuẩn cao chiết ethanol từ vỏ cây *S. alba*. Kết quả cho thấy, cao chiết có hoạt tính kháng khuẩn tốt đối với *S. aureus*; hoạt tính trung bình đối với *P. aeruginosa* và không có tác dụng đối với *E. coli* và *Klebsiella pneumoniae* [18]. Theo nghiên cứu của Wahab G. và cộng sự (2018) cho thấy, cao chiết Liễu có khả năng kháng khuẩn tốt với các nhóm vi khuẩn Gram dương (*S. aureus*), vi khuẩn Gram âm (*E. coli*, *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa*) và nấm gây bệnh *C. albicans* [17]. Năm 2020, González-Alamilla và cộng sự cũng đã xác định được khả năng kháng khuẩn của cao chiết Liễu, kết quả cho thấy cao chiết có nồng độ 50 mg/ml có khả năng ức chế đối với các chủng vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* và *S. aureus*, còn đối với *B. subtilis* nồng độ ức chế là 25 mg/ml [15].



Hình 1. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết ethanol Liễu

Chú thích: KS: Ampicilline 100 mg/mL, 0: Đối chứng âm; 1: 100 mg/mL; 2: 50 mg/mL; 3: 25 mg/mL

Theo các nghiên cứu trước đây, khả năng kháng khuẩn của cao chiết methanol của Liễu có hoạt tính tốt đối với vi khuẩn Gram dương như *S. aureus*, *L. monocytogenes* và *B. subtilis*, nhưng lại kém đối với vi khuẩn Gram âm như *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, *P. aeruginosa*. Kết quả này là do cấu trúc màng của vi khuẩn Gram âm có lớp màng phospholipid bên ngoài thành ngăn không cho các chất như kháng sinh hay các chất thứ cấp đi vào trong tế bào [19], [20].

Năm 2020, González-Alamilla và cộng sự đã xác định được 3 phân đoạn có khả năng kháng khuẩn tốt nhất đối với *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, trong đó 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone (luteolin) và 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-7-O-glucoside (luteoloside) là các hợp chất chính cho hoạt tính kháng khuẩn của loài *S. babylonica* [15].

4. Kết luận

Đã chiết xuất được 500g cao chiết ethanol từ lá Liễu. Trong cao chiết ethanol của cây Liễu có chứa các nhóm hợp chất phenolic, alkaloid, saponin, flavonoid, steroid, đây là những nhóm hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học tốt. Cao chiết ethanol của lá Liễu có hoạt tính oxy với giá trị IC₅₀ trung bình là 5,65 µg/ml. Cao chiết ethanol của cây Liễu có khả năng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *C. Freundii*, tiếp theo là *S. aureus*. và cuối cùng là *P. Aeruginosa*.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu đánh giá thành phần hoá học và hoạt tính sinh học tinh dầu Liễu (*Salix Babylonica*) thu tại khu vực miền núi phía Bắc” mã số TNUE-2022-08 do Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên quản lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] N. Tawfeek *et al.*, “Phytochemistry, pharmacology and medicinal uses of plants of the genus *Salix*: an updated review,” *Front. Pharmacol.*, vol. 12, no. February, pp. 1-30, 2021, doi:

- 10.3389/fphar.2021.593856.
- [2] H. Singh, R. Raturi, and P. Badoni, "Isolation of secondary metabolites from the roots of *Salix Babylonica*," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 225, p. 12094, Aug. 2017, doi: 10.1088/1757-899X/225/1/012094.
 - [3] C. Fernandes *et al.*, "Salicylates isolated from leaves and stems of *Salix martiana* Leyb. (*Salicaceae*)," *Quim. Nova*, vol. 32, pp. 983-986, Dec. 2008, doi: 10.1590/S0100-40422009000400029.
 - [4] Z. A. Shah *et al.*, "Cytotoxic and anti-inflammatory salicin glycosides from leaves of *Salix acmophylla*," *Phytochem. Lett.*, vol. 17, pp. 107-113, 2016, doi: 10.1016/j.phytol.2016.07.013.
 - [5] C. Noleto-Dias, Y. Wu, A. Bellisai, W. J. Macalpine, M. H. Beale, and J. L. Ward, "Phenylalkanoid glycosides (non-salicinoids) from wood chips of *Salix triandra* × *dasyclados* hybrid willow," *Molecules*, vol. 24, no. 6, 2019, Art. no. 1152, doi: 10.3390/molecules24061152.
 - [6] I. Mostafa *et al.*, "Polyphenols from *Salix tetrasperma* Impair Virulence and Inhibit Quorum Sensing of *Pseudomonas aeruginosa*," *Molecules*, vol. 25, no. 6, Mar. 2020, Art. no. 1341, doi: 10.3390/molecules25061341.
 - [7] Y. Eftekhari, A. Rustaiyan, M. Monajjemi, and R. A. Khavarinejad, "Study of anti-retroviral effects of *Salix aegyptiaca* L. Herbal extract on HIV-1 in vitro," *Int. J. Mol. Clin. Microbiol.*, vol. 4, no. 1, pp. 398-405, 2014. [Online]. Available: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=438917>.
 - [8] E. Gligorić, R. Igić, L. Suvajdžić, and N. Grujić-Letić, "Species of the genus *Salix* L.: Biochemical screening and molecular docking approach to potential acetylcholinesterase inhibitors," *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 9, 2019, doi: 10.3390/app9091842.
 - [9] M. Sobeh *et al.*, "*Salix tetrasperma* Roxb. extract alleviates neuropathic pain in rats via modulation of the NF-κB/TNF-α/NOX/iNOS pathway," *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, vol. 8, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.3390/antiox8100482.
 - [10] K. Hostanska, G. Jürgenliemk, G. Abel, A. Nahrstedt, and R. Saller, "Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells," *Cancer Detect. Prev.*, vol. 31, no. 2, pp. 129-139, 2007, doi: 10.1016/j.cdp.2007.03.001.
 - [11] J. G. Mahdi, "Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin discovery," *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 14, no. 3, pp. 317-322, 2010, doi: 10.1016/j.jscs.2010.04.010.
 - [12] V. D. Nguyen and V. T. Nguyen, *Chemistry research methods of medicinal plants*. Science and Technics Publishing House, 1978.
 - [13] J. Tabart, C. Kevers, J. Pincemail, J. O. Defraigne, and J. Dommes, "Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests," *Food Chem.*, vol. 113, no. 4, pp. 1226-1233, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2008.08.013.
 - [14] F. Hadacek and H. Greger, "Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice," *Phytochem. Anal.*, vol. 11, pp. 137-147, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I.
 - [15] E. González-Alamilla *et al.*, "Antibacterial effect of the methanol extract of *Salix babylonica* against important bacteria in public Health," *Abanico Vet.*, vol. 10, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.21929/ABAVET2020.1.
 - [16] A. Ishikado *et al.*, "Willow bark extract increases antioxidant enzymes and reduces oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *Caenorhabditis elegans*," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 65, pp. 1506-1515, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2012.12.006.
 - [17] G. Wahab, A. Sallam, A. Elgaml, M. F. Lahloub, and M. Afif, "Antioxidant and antimicrobial activities of *Salix babylonica* extracts," *World J. Pharm. Sci.*, vol. 6, pp. 1-6, Apr. 2018.
 - [18] G. M. Sulaiman, N. N. Hussien, T. R. Marzoog, and H. A. Awad, "Phenolic content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanolic extract of *Salix Alba*," *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 41-46, 2013, doi: 10.3844/ajbbsp.2013.41.46.
 - [19] K. S. Kaye, J. J. Engemann, H. S. Fraimow, and E. Abrutyn, "Pathogens resistant to antimicrobial agents: Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 18, no. 3, pp. 467-511, Sep. 2004, doi: 10.1016/J.IDC.2004.04.003.
 - [20] A. R. Ndhlala *et al.*, "Antimicrobial, anthelmintic activities and characterisation of functional phenolic acids of *Achyranthes aspera* Linn.: A medicinal plant used for the treatment of wounds and ringworm in east Africa," *Front. Pharmacol.*, vol. 6, 2015, doi: 10.3389/FPHAR.2015.00274.