

Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa và kháng nấm *Trichophyton rubrum* của chiết xuất lá trầu không (*Piper betle* L.) và lá neem (*Azadirachta indica* L.)

Nguyễn Ngọc Quỳnh Anh¹, Hoàng Thùy Dương¹, Lâm Hoàng Anh Thu¹, Ngô Hồng Loan¹,
Phan Thị Kim Ngân¹, Phạm Thanh Hồng², Nguyễn Hữu Tuyển^{1*}

¹Trung tâm Nghiên cứu triển khai Khu Công nghệ cao, phường Tăng Nhơn Phú, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Kỹ thuật Y học, Trường Đại học Văn Lang, 69/68 Đặng Thùy Trâm, phường Bình Lợi Trung, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 31/3/2025; ngày gửi phản biện 2/4/2025; ngày nhận phản biện 2/5/2025; ngày chấp nhận đăng 8/5/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng nấm *Trichophyton rubrum* của chiết xuất lá trầu không (LT-Et96) và lá neem (LN-Et96) với dung môi ethanol. Hàm lượng phenolic tổng (TPC) được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu và flavonoid tổng (TFC) được xác định bằng nhôm clorua. Khả năng kháng oxy hóa được đánh giá bằng phương pháp trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Hiệu quả kháng nấm được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và diệt nấm tối thiểu (MFC). Kết quả ghi nhận hàm lượng TPC là $567,29 \pm 6,81$ mg GAE/g và TFC là $21,59 \pm 0,98$ mg QE/g đối với LT-Et96; ở mẫu LN-Et96 các giá trị này lần lượt là $161,79 \pm 5,12$ mg GAE/g và $21,24 \pm 1,15$ mg QE/g. Khả năng trung hòa 50% gốc tự do DPPH được ghi nhận ở nồng độ $1,005 \pm 0,527$ mg/ml đối với LT-Et96 và $10,301 \pm 2,041$ mg/ml đối với LN-Et96. Nồng độ MIC của LT-Et96 là 1 mg/ml và LN-Et96 là 10 mg/ml. Nồng độ MFC của LT-Et96 và LN-Et96 ở 48 giờ lần lượt là 4 và 40 mg/ml. Hỗn hợp phối trộn của các chiết xuất cho thấy hiệu quả kháng nấm đều đạt 100% ở các nghiệm thức nồng độ LT-Et96 1 mg/ml kết hợp với các nồng độ LN-Et96 khác nhau. Các kết quả cho thấy tiềm năng ứng dụng của các chiết xuất trong phát triển các sản phẩm hỗ trợ phòng ngừa hoặc kiểm soát nhiễm nấm da đầu có nguồn gốc từ nguyên liệu tự nhiên.

Từ khóa: flavonoid, lá neem, lá trầu không, nấm *Trichophyton rubrum*, phenolic.

Chỉ số phân loại: 1.4, 1.6, 3.4

Evaluation of the biological activity and antifungal potential of *Piper betle* L. and *Azadirachta indica* L. leaf extracts against *Trichophyton rubrum*

Ngoc Quynh Anh Nguyen¹, Thuy Duong Hoang¹, Hoang Anh Thu Lam¹, Hong Loan Ngo¹,
Thi Kim Ngan Phan¹, Thanh Hong Pham², Huu Tuyen Nguyen^{1*}

¹Research Laboratories of Saigon Hi-Tech Park, Tang Nhon Phu Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Medical Technology, Van Lang University, 69/68 Dang Thuy Tram Street, Binh Loi Trung Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 31 March 2025; revised 2 May 2025; accepted 8 May 2025

Abstract:

The study was carried out to evaluate the antifungal activity of betel leaf extract (LT-Et96) and neem leaf extract (LN-Et96) against *Trichophyton rubrum* using ethanol solvent. The total phenolic content (TPC) was determined using the Folin-Ciocalteu method while the total flavonoid content (TFC) was measured using the aluminum chloride method. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging assay was used to estimate the antioxidant activity. Antifungal activity was evaluated using the agar diffusion method, with determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). The results revealed that the TPC and TFC values of LT-Et96 were 567.29 ± 6.81 mg GAE/g and 21.59 ± 0.98 mg QE/g, respectively, whereas those of LN-Et96 were 161.79 ± 5.12 mg GAE/g and 21.24 ± 1.15 mg QE/g, respectively. The concentration for neutralising 50% of DPPH free radicals was 1.005 ± 0.527 mg/ml for LT-Et96 and 10.301 ± 2.041 mg/ml for LN-Et96. The MIC values of LT-Et96 and LN-Et96 were 1 and 10 mg/ml, respectively. The MFC values at 48 hours were 4 mg/ml for LT-Et96 and 40 mg/ml for LN-Et96. The combined extracts exhibited 100% antifungal efficacy across all treatments containing LT-Et96 at a concentration of 1 mg/ml in combination with various concentrations of LN-Et96. The results indicated the potential application of these extracts in the development of natural products for the treatment and prevention of scalp fungal infections.

Keywords: flavonoid, neem leaf, phenolic, piper betle leaf, *Trichophyton rubrum*.

Classification numbers: 1.4, 1.6, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: nhtuyen.shp@tphcm.gov.vn

1. Đặt vấn đề

Trichophyton rubrum là loại nấm truyền nhiễm phổ biến gây bệnh nấm da ở người, với tỷ lệ gây bệnh chiếm đến hơn 60%. Đặc điểm điển hình của nấm da là ưa sừng, thường xâm nhập vào các cấu trúc sừng hóa như lớp sừng của da, tóc và móng tay, chân [1]. Hiện nay, các biện pháp kháng nấm thường được sử dụng là các loại thuốc có chứa allylamine, azole hay echinocandins. Mặc dù mang hiệu quả khá cao nhưng vẫn tiềm ẩn các vấn đề về kháng thuốc và các tác dụng phụ khi sử dụng lâu dài. Vì vậy, xu hướng hiện nay đang dần hướng đến sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên để kháng lại các tác nhân nấm bệnh.

Cây trầu không (*Piper betle* L.) từ lâu đã được sử dụng như một nguồn dược liệu với nhiều công dụng tại nhiều quốc gia. Lá trầu có chứa nhiều hoạt chất kháng oxy hóa bao gồm flavonoid, tannin, saponin và nhiều hoạt chất khác có khả năng ức chế và tiêu diệt một số loài nấm gây bệnh như nấm *Candida albicans*, *Aspergillus niger* và *Trichophyton mentagrophytes* [2]. Một nguyên liệu khác đang được quan tâm và ứng dụng rộng rãi là chiết xuất từ cây neem (*Azadirachta indica*). Nhờ vào thành phần giàu chất chống oxy hóa và các hợp chất có hoạt tính sinh học như azadirachtin, salannin, nimbolin; chiết xuất lá và hạt của cây neem đã được thử nghiệm hoạt tính chống nấm da và cho thấy hiệu quả chống lại một số loại nấm da như *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton violaceum*, *Microsporum nanum*, *Epidermophyton floccosum* và *Candida albicans* [3]. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá khả năng kháng nấm *T. rubrum* của chiết xuất lá trầu không và lá neem, cũng như khảo sát hiệu quả khi kết hợp của hai loại chiết xuất này; từ đó tạo tiền đề để phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe có nguồn gốc từ thực vật.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Lá trầu không tươi (*Piper betle* L.) được thu nhận từ cây trầu không 5 năm tuổi tại Bình Dương và lá neem tươi (*Azadirachta indica* L.) được thu nhận từ cây neem 12 năm tuổi thuộc giống neem Ấn Độ trồng tại Ninh Thuận. Mẫu lá tươi được chọn là loại lá già màu xanh đậm, thu hái ngoài tự nhiên bằng dụng cụ cắt trong khoảng 8-10 giờ sáng vào tháng 3/2024. Mẫu lá sau thu nhận được xử lý sơ bộ và rửa loại bỏ bụi bẩn trước khi tiến hành thí nghiệm.

Chủng nấm *T. rubrum* (ATCC 28188) được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ sinh học, Trung tâm Nghiên cứu triển khai Khu công nghệ cao TP. Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu nhận chiết xuất

Chiết xuất được thu nhận theo phương pháp của H.T. Duong và cs (2022) [4] có sửa đổi. Mẫu lá tươi sau khi xử lý sơ bộ được đông khô ở -51°C , trong điều kiện chân không từ 24 đến 48 giờ. Nghiền nhỏ mẫu lá thành dạng bột, cân 10 g bột lá, bổ sung 200 ml dung môi ethanol 96%. Tiến hành đánh siêu âm bằng hệ thống siêu âm dạng thanh Q1375 (Qsonica, Mỹ) với tần số 20 kHz và 80% công suất máy trong 15 phút, lọc và thu nhận chiết xuất bằng giấy lọc Whatman. Loại bỏ dung môi bằng cách đun cách thủy ở 60°C . Hòa tan chiết xuất lá trầu không (LT-Et96) và chiết xuất lá neem (LN-Et96) thu được trong dimethyl sulfoxide (DMSO) và bảo quản ở 4°C trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Công thức tính hiệu suất thu hồi chiết xuất [4]:

$$H(\%) = (W1 \times 100) / W2$$

trong đó: H: hiệu suất thu hồi; W1: khối lượng cao thu được; W2: khối lượng bột lá sử dụng.

2.2.2. Xác định hàm lượng phenolic và flavonoid tổng

Xác định hàm lượng TPC theo phương pháp Folin-Ciocalteu có sửa đổi [5]. Pha loãng các mẫu chiết xuất thành các nồng độ khác nhau. Cho 0,5 ml mẫu vào 2,5 ml dung dịch thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, lắc đều và để 4 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục bổ sung 2 ml dung dịch Na_2CO_3 2% vào hỗn hợp trên. Sau 120 phút phản ứng, tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm (OD_{765}). Acid gallic được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng TPC trong mẫu chiết xuất được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn acid gallic.

Hàm lượng TFC được xác định bằng phương pháp so màu AlCl_3 có sửa đổi [5]. Pha loãng các mẫu chiết xuất thành các nồng độ khác nhau. Cho 0,5 ml mẫu vào 1,5 ml dung dịch ethanol 95%, để yên trong 5 phút. Thêm vào 0,1 ml dung dịch AlCl_3 10% và lắc đều. Sau 6 phút, thêm vào 0,1 ml CH_3COOK 1M và 2,8 ml nước cất, lắc đều, để ổn định ở nhiệt độ phòng. Sau 30 phút, tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 415 nm. Quercetin được sử dụng

như chất đối chứng dương. Hàm lượng TFC trong chiết xuất được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

2.2.3. Xác định khả năng kháng oxy hóa

Khả năng kháng oxy hóa của chiết xuất được xác định bằng phương pháp khử gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [6]. Cho 20 μ l chiết xuất ở các nồng độ khác nhau vào 880 μ l methanol và 100 μ l DPPH 500 μ M, lắc đều và để yên trong 30 phút ở điều kiện tránh sáng. Độ hấp thu được đo ở bước sóng 517 nm. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự, thay thế tích chiết xuất bằng dung môi pha mẫu. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (%) được tính bằng công thức sau:

$$\text{DPPH}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

trong đó: A_c là độ hấp thu của mẫu đối chứng; A_s là độ hấp thu của mẫu khảo sát; IC_{50} là giá trị nồng độ của mẫu chiết xuất tại đó trung hòa 50% các gốc DPPH ban đầu; IC_{50} được tính từ phương trình đường tương quan tuyến tính giữa nồng độ chiết xuất và phần trăm ức chế gốc tự do DPPH.

2.2.4. Xác định hoạt tính kháng nấm *T. rubrum* của các loại chiết xuất

Bước đầu đánh giá khả năng kháng nấm *T. rubrum* của các chiết xuất bằng phương pháp khuếch tán thạch có sửa đổi [7]. Dùng ống đục vô trùng tạo hai giếng có đường kính 7 mm trên mỗi đĩa thạch Sabouraud dextrose agar (SDA). Bổ sung vào các giếng 100 μ l các chiết xuất LT-Et96 và LN-Et96 ở nồng độ 50, 25 và 10 mg/ml, đối chứng âm là dung dịch DMSO 10%. Đặt tản nấm có đường kính 7 mm vào trung tâm đĩa. Ủ các đĩa nấm ở nhiệt độ phòng, quan sát và ghi nhận kích thước của tản nấm ở ngày thứ 10. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.2.5. Xác định nồng độ ức chế nấm tối thiểu của các loại chiết xuất

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các chiết xuất đối với nấm *T. rubrum* được xác định theo mô tả của M. Moslem và cs (2009) [8]. Pha loãng các chiết xuất với DMSO thành các nồng độ khác nhau, bổ sung thêm môi trường SDA sao cho nồng độ DMSO cuối cùng đạt 2%. Đổ các hỗn hợp vào đĩa petri đường kính 60 mm và để đông

ở nhiệt độ phòng. Đặt vào trung tâm mỗi đĩa thạch, tản nấm có đường kính 5 mm, ủ các đĩa ở nhiệt độ phòng, quan sát và ghi nhận kết quả ở ngày thứ 10 kể từ khi tiến hành thí nghiệm. Tỷ lệ ức chế sự phát triển của nấm (I%) được tính bằng công thức sau [8]:

$$I(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

trong đó, C là đường kính khuẩn lạc ở mẫu đối chứng; T là đường kính khuẩn lạc ở mẫu có chứa chiết xuất.

2.2.6. Xác định nồng độ diệt nấm tối thiểu của các chiết xuất

Dựa trên nồng độ MIC của LT-Et96 và LN-Et96, tiến hành xác định nồng độ MFC của các chiết xuất theo mô tả của D.T.M. Thy và cs (2020) [9]. Cắt mẫu nấm có đường kính 5 mm và ngâm trong các nồng độ chiết xuất khác nhau trong 6, 14, 24 và 48 giờ, sau đó rửa sạch và cấy vào môi trường SDA. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Sau ít nhất 3 ngày quan sát, MFC được xác định là nồng độ thấp nhất không có sợi nấm phát triển. Nếu tỷ lệ $MFC/MIC \leq 4$ hợp chất được xác định có khả năng diệt nấm; $MFC/MIC > 4$ hợp chất được xác định là có khả năng ức chế nấm [10].

2.2.7. Khảo sát hiệu quả kháng nấm *T. rubrum* của hỗn hợp phối trộn từ các chiết xuất

Lần lượt phối trộn các nồng độ khác nhau của chiết xuất LT-Et96 và LN-Et96 theo tỷ lệ 1:1 (v:v) (bảng 1). Tổng thể tích của hỗn hợp phối trộn sử dụng cho mỗi nghiệm thức là 0,5 ml và bổ sung thêm 4,5 ml môi trường SDA sao cho nồng độ DMSO được sử dụng là 2%. Đổ hỗn hợp vào đĩa petri có đường kính 60 mm và để đông ở nhiệt độ phòng. Dùng kẹp vô trùng gắp tản nấm có đường kính 5 mm đặt vào trung tâm mỗi đĩa thạch [7, 8]. Quan sát và ghi nhận kết quả ở ngày thứ 10 kể từ khi tiến hành thí nghiệm.

Bảng 1. Nghiệm thức phối trộn các chiết xuất (tỷ lệ 1:1).

Nồng độ LT-Et96 (mg/ml)	Nồng độ LN-Et96 (mg/ml)			
	10 (N_1)	5 (N_2)	2,5 (N_3)	1,25 (N_4)
1 (T_1)	$T_1:N_1$	$T_1:N_2$	$T_1:N_3$	$T_1:N_4$
0,5 (T_2)	$T_2:N_1$	$T_2:N_2$	$T_2:N_3$	$T_2:N_4$
0,25 (T_3)	$T_3:N_1$	$T_3:N_2$	$T_3:N_3$	$T_3:N_4$
0,125 (T_4)	$T_4:N_1$	$T_4:N_2$	$T_4:N_3$	$T_4:N_4$
0,0625 (T_5)	$T_5:N_1$	$T_5:N_2$	$T_5:N_3$	$T_5:N_4$

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hiệu suất thu nhận hai loại chiết xuất thực vật LT-Et96 và LN-Et96

Hiệu suất thu hồi của chiết xuất LT-Et96 và LN-Et96 với dung môi ethanol lần lượt là 13,58 và 15,53% (bảng 2), gần tương đương với nhau. Dung môi ethanol thường được sử dụng phổ biến để tách chiết các hợp chất polyphenol nhờ tính hoà tan có chọn lọc và hoạt chất ít bị phân huỷ trong quá trình cô đặc. Thành phần các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa mạnh như polyphenol thu nhận với dung môi ethanol cũng đa dạng và phong phú hơn so với dung môi nước hay các dung môi khác [11]. Việc kết hợp sử dụng dung môi ethanol với sự hỗ trợ của sóng siêu âm để thu nhận chiết xuất thực vật có ưu điểm chính là thời gian phản ứng ngắn hơn so với phương pháp truyền thống, sử dụng lượng mẫu nguyên liệu nhỏ, giúp tăng hiệu quả và giảm chi phí trong hoạt động sản xuất.

Bảng 2. Hiệu suất thu hồi các chiết xuất.

Mẫu	Khối lượng nguyên liệu (g)	Khối lượng chiết xuất (g)	Hiệu suất thu nhận (%)
LT-Et96	10	1,358±0,02	13,58±0,25
LN-Et96	10	1,553±0,03	15,53±0,33

3.2. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng của các loại chiết xuất

Polyphenol và flavonoid đại diện cho những chất chuyển hóa thực vật thứ cấp với các hoạt tính sinh học độc đáo và đa dạng như kháng viêm, kháng oxy hóa, kháng khuẩn và ngăn ngừa ung thư [12]. Hàm lượng polyphenol (TPC) và flavonoid toàn phần (TFC) có trong hai loại chiết xuất được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng của các chiết xuất.

Mẫu	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)
LT-Et96	567,29±6,81	21,59±0,98
LN-Et96	161,79±5,12	21,24±1,15

Bảng 4. Hiệu suất ức chế gốc tự do DPPH của các chiết xuất.

Mẫu	LT-Et96				LN-Et96			
Nồng độ (mg/ml)	0,5	1	1,5	2	5	10	15	20
Hiệu suất ức chế gốc tự do (%)	29,25±0,057	51,99±0,071	73,84±0,048	93,79±0,011	24,8±0,061	51,13±0,042	76,57±0,004	90,39±0,02
Phương trình hồi quy tuyến tính	$y=46,437x+3,3413$ ($R^2=0,9945$)				$y=4,6498x+2,1003$ ($R^2=0,9898$)			
Giá trị IC_{50} (mg/ml)	1,005±0,527				10,301±2,041			

Hàm lượng TPC của mẫu LT-Et96 là 567,29±6,81 mg GAE/g cao hơn khoảng 4 lần so với mẫu LN-Et96 (161,79±5,12 mg GAE/g). Đối với hàm lượng TFC, hai mẫu LT-Et96 và LN-Et96 có giá trị gần như tương đương nhau với kết quả ghi nhận lần lượt là 21,59±0,98 và 21,24±1,15 mg QE/g. Theo L.T.T. Nguyen và cs (2020) [13] khi thu nhận chiết xuất lá trầu không với các loại dung môi khác nhau cho thấy việc sử dụng dung môi ethanol giúp thu nhận được chiết xuất có hàm lượng TPC và TFC cao nhất lần lượt là 249,96 (mg GAE/g) và 27,82 (mg QE/g). Nghiên cứu của A. Ali và cs (2018) [14] cũng cho thấy việc sử dụng kết hợp sóng siêu âm giúp tăng hiệu suất thu hồi hàm lượng TPC lên 13,71 so với 10,96% khi sử dụng phương pháp chiết ngâm. Trong nghiên cứu này, hàm lượng TPC ghi nhận có giá trị cao hơn so với khảo sát trước đó của nhóm (386,34 mg GAE/g) [4], nguyên nhân có thể do nhóm sử dụng 80% công suất máy siêu âm với giá trị là 1100 W so với chỉ sử dụng 70% công suất máy trước đó. Hàm lượng TPC của lá neem theo nghiên cứu của A.R. Abdulkadir và cs (2017) [15] đạt 136,45 mg GAE/g (dung môi ethanol) và hàm lượng TFC là 77,01 mg QE/g. Các chỉ số TPC và TFC này gần tương đồng với kết quả ghi nhận trên chiết xuất từ lá neem của nhóm.

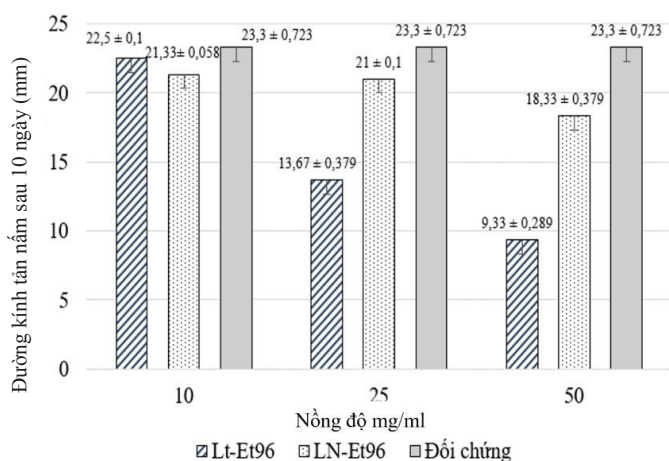
3.3. Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do DPPH

Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do DPPH là một trong những phương pháp phổ biến để đánh giá khả năng kháng oxy hóa của một hợp chất. Hiệu suất ức chế gốc tự do DPPH của các loại chiết xuất được trình bày ở bảng 4.

Giá trị IC_{50} của mẫu LT-Et96 (1,005 mg/ml) nhỏ hơn so với mẫu LN-Et96 (10,30 mg/ml) (bảng 4) cho thấy khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của mẫu LT-Et96 mạnh hơn so với mẫu LN-Et96. Nghiên cứu của I. Ali và cs (2010) [16] đã chứng minh hoạt tính kháng oxy hóa cao của lá trầu nhờ sự hiện diện của hợp chất hydroxychavicol (thuộc nhóm phenolic). Khảo sát trên chiết xuất từ lá và thân cây ké đầu ngựa (*Xanthium strumarium* L.) cho

thấy hàm lượng TPC và TFC tương quan tỷ lệ thuận với giá trị $1/IC_{50}$, đồng nghĩa với hàm lượng TPC và TFC càng cao thì hoạt tính kháng oxy hoá trong nghiên cứu càng mạnh [17].

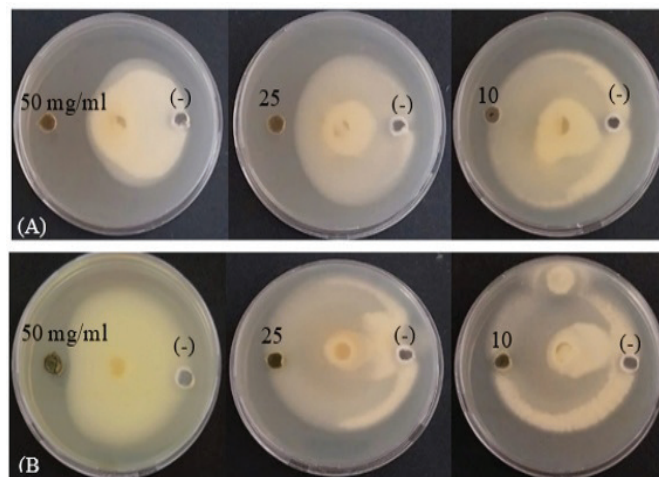
3.4. Xác định hoạt tính kháng nấm *T. rubrum* của các loại chiết xuất



Hình 1. Kết quả kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán thạch.

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch được thực hiện nhằm bước đầu xác định hiệu quả kháng nấm *T. rubrum* của các loại chiết xuất, để làm tiền đề cho các thí nghiệm tiếp theo, kết quả được thể hiện qua hình 1 và 2. Mẫu LT-Et96 ghi nhận hiệu quả kháng nấm cao nhất ở nồng độ 50 mg/ml, kích thước phát triển của nấm đo được là $9,33 \pm 0,289$ mm thấp hơn 2,5 lần so với chứng âm ($23,3 \pm 0,723$ mm). Các nghiên cứu trước đây cho thấy, nồng độ 10-50 mg/ml chiết xuất lá trà có hiệu quả trên nấm *P. oryzae* [18], *C. albicans* và *Aspergillus* sp. [19]. Mẫu LN-Et96 cũng ghi nhận được hiệu quả kháng nấm ở nồng độ 50 mg/ml, kích thước phát triển của nấm đo được là $18,33 \pm 0,379$ mm, thấp hơn xấp xỉ 1,27 lần so với chứng âm. Theo các nghiên cứu trước đây, nồng độ 12,5-50 mg/ml chiết xuất lá neem có hoạt tính kháng lại nấm *A. niger* và *C. albicans* [20]. Kết quả bước đầu cho thấy, mẫu LT-Et96 có tính kháng *T. rubrum* mạnh hơn so với LN-Et96. Nguyên nhân có thể do hàm lượng hoạt chất phenolic, flavonoid và khả năng kháng oxy hóa cao có trong LT-Et96 (bảng 3 và 4). Theo các nghiên

cứu trước đây, hoạt chất chính thuộc nhóm phenolic trong chiết xuất lá trà không bao gồm hydroxychavicol, cavicol, cavibetol, carvacrol và eugenol [21]. Đối với lá neem, các hợp chất có hoạt chất sinh học thường được ghi nhận gồm azadirachtin, nimbin, salanin và một số flavonoid, limonoid khác [22]. Đây được xem là các chất đóng vai trò chủ yếu trong khả năng kháng nấm bệnh của lá trà không và lá neem.

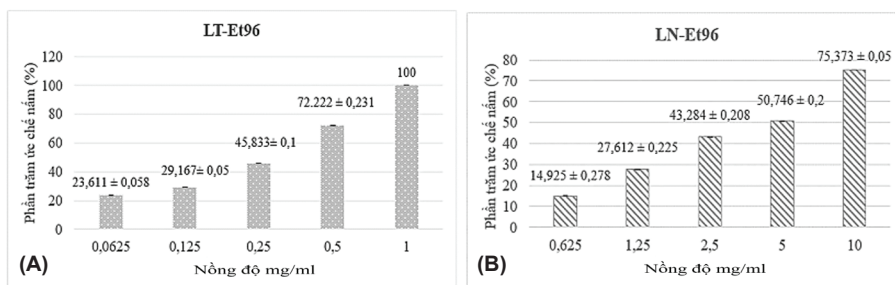


Hình 2. Đánh giá kháng nấm *T. rubrum* của các chiết xuất. (A) LT-Et96; (B) LN-Et96.

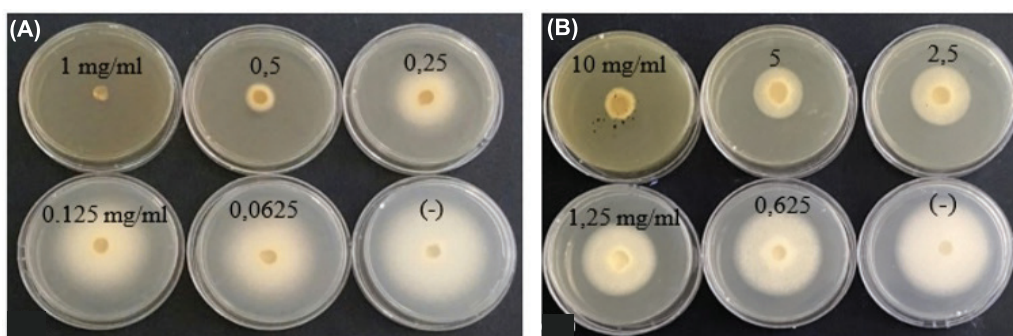
3.5. Nồng độ ức chế nấm tối thiểu của các loại chiết xuất

Từ kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm ở trên, chúng tôi tiếp tục tiến hành xác định nồng độ MIC đối với nấm *T. rubrum* của hai loại chiết xuất; kết quả được thể hiện qua hình 3 và 4.

Chiết xuất LT-Et96 cho kết quả MIC đối với nấm *T. rubrum* ở nồng độ 1 mg/ml với tỷ lệ ức chế ghi nhận được là 100% (hình 3 và 4). Các nghiên cứu trước đây về khả năng kháng nấm của lá trà chủ yếu thực hiện với tinh dầu lá trà tinh khiết như công bố D.C. Ontengco



Hình 3. Hiệu quả ức chế nấm *T. rubrum* của các chiết xuất. (A) LT-Et96; (B) LN-Et96.



Hình 4. Kết quả MIC của các chiết xuất. (A) LT-Et96; (B) LN-Et96.

(2019) [23] với nồng độ MIC $\leq 0,156$ mg/ml cho khả năng ức chế nấm *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* và *T. tonsurans*. Đối với chiết xuất lá neem nồng độ ức chế tối thiểu MIC là 10 mg/ml với tỷ lệ ức chế 75,4%. Tỷ lệ ức chế này cao hơn nghiên cứu của D.I.O. Salazar và cs (2015) [24]: cụ thể chiết xuất lá neem (4 mg/ml) ức chế 29,527% nấm *T. rubrum* và dầu hạt neem (4 mg/ml) tỷ lệ ức chế là 12,5%. Như vậy, tỷ lệ ức chế của các chiết xuất LT-Et96 (nồng độ 1 mg/ml) và LN-Et96 (nồng độ 10 mg/ml) đối với chủng nấm *T. rubrum* đều trên 70%, cho thấy tiềm năng kháng nấm của các chiết xuất thực vật này.

3.6. Nồng độ diệt nấm tối thiểu của các loại chiết xuất

Kết quả khảo sát nồng độ MFC đối với mẫu LT-Et96 ghi nhận ở thời điểm 6, 14 và 24 giờ là 8 mg/ml; ở 48 giờ nồng độ này là 4 mg/ml. Nồng độ MFC của LN-Et96 lần lượt là 50 mg/ml ở 24 giờ và 40 mg/ml ở 48 giờ. Có thể nhận thấy, nồng độ MFC của LT-Et96 thấp hơn rất nhiều so với nồng độ MFC của LN-Et96, cụ thể, xấp xỉ gấp 6 lần ở thời điểm ≤ 24 giờ và gấp 10 lần ở thời điểm 48 giờ. Điều này có thể là do hàm lượng của hoạt chất phenolic, flavonoid và hợp chất kháng oxy hóa cao có trong mẫu LT-Et96 (bảng 3 và 4). Các nghiên cứu trước đây về hoạt tính

kháng nấm của các chiết xuất thực vật đối với các chủng dermatophyte ghi nhận được nồng độ MFC dao động 125-250 mg/ml (chiết xuất từ lá cây *Tetradenia riparia*) [25], nồng độ MFC 0,39-25 mg/ml (chiết xuất từ lá cây *Tapinanthus globiferus*) [26]. Dựa trên tỷ lệ

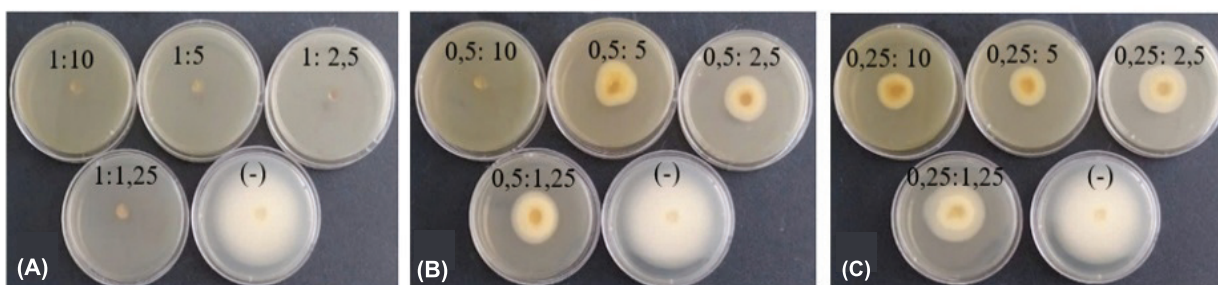
MFC/MIC, ở thời điểm 48 giờ mẫu LT-Et96 (nồng độ 4 mg/ml) và LN-Et96 (nồng độ 40 mg/ml) có khả năng diệt nấm.

3.7. Khảo sát hiệu quả phối trộn của hai loại chiết xuất lá trầu không và lá neem

Trong phạm vi nghiên cứu này, bên cạnh các thử nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm *T. rubrum* riêng lẻ của các chiết xuất, nhóm còn tiến hành khảo sát khả năng kháng nấm của hỗn hợp nhằm xác định xem sự kết hợp này có mang lại hiệu quả kháng nấm tốt hơn riêng lẻ hay không, cũng như có tác dụng bổ trợ nhau trong khả năng kháng nấm hay không. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng 5 và hình 5.

Bảng 5. Hiệu quả ức chế nấm *T. rubrum* của các hỗn hợp.

Mẫu LT-Et96 (mg/ml)	Phần trăm ức chế nấm <i>T. rubrum</i> (%)			
	Mẫu LN-Et96 (mg/ml)			
	10	5	2,5	1,25
1	100	100	100	100
0,5	100	58,805 $\pm$ 0,087	53,779 $\pm$ 0,103	43,034 $\pm$ 0,134
0,25	61,047 $\pm$ 0,156	57,914 $\pm$ 0,124	48,751 $\pm$ 0,126	35,681 $\pm$ 0,114
0,125	70,527 $\pm$ 0,098	59,458 $\pm$ 0,111	40,629 $\pm$ 0,113	33,080 $\pm$ 0,157
0,0625	65,484 $\pm$ 0,135	55,429 $\pm$ 0,113	41,744 $\pm$ 0,166	35,565 $\pm$ 0,156



Hình 5. Kết quả một số mẫu phối trộn. (A) T₁ phối trộn với N₁-N₄; (B) T₂ phối trộn với N₁-N₄; (C) T₃ phối trộn với N₁-N₄.

Trong các nghiệm thức phối trộn LT-Et96 và LN-Et96, chiết xuất lá trầu không ở nồng độ 1 mg/ml kết hợp với chiết xuất lá neem 10-1,25 mg/ml đều đạt hiệu quả kháng nấm 100%, tương đương với khi sử dụng LT-Et96 riêng lẻ. Các tỷ lệ phối trộn còn lại ghi nhận hiệu quả kháng nấm giảm dần theo nồng độ, dao động từ hơn 60% (0,5-0,065 mg/ml LT-Et96 với 10 mg/ml LN-Et96) xuống còn hơn 30% (0,5-0,065 mg/ml LT-Et96 với 1,25 mg/ml LN-Et96); trừ tỷ lệ 0,5 LT-Et96 và 10 mg/ml LN-Et96 cho hiệu quả kháng đạt 100%. Khi so sánh hiệu quả hỗn hợp phối trộn với khả năng kháng nấm *T. rubrum* riêng lẻ của từng loại chiết xuất thì hiệu quả kháng nấm được cải thiện không đáng kể, cụ thể, khi kết hợp nồng độ 0,125-0,0625 mg/ml LT-Et96 và 10 mg/ml LN-Et96 thì khả năng kháng nấm của lá trầu tăng từ 29 lên xấp xỉ 65% nhưng hiệu quả kháng nấm của lá neem lại giảm từ 75 xuống xấp xỉ 65%. Như vậy, kết quả cho thấy không ghi nhận được tác dụng bổ trợ nhau của các chiết xuất trong kháng nấm *T. rubrum*. Các nghiên cứu trước đây cũng từng đánh giá hiệu quả phối trộn chiết xuất neem hoặc lá trầu không với các hoạt chất khác, hiệu quả diệt 100% chủng *Trichophyton tonsurans* khi phối trộn chiết xuất neem với dầu *Eucalyptus citriodora* và *Cymbopogon martini* cho hiệu quả [27]; phối trộn chiết xuất lá trầu với các kháng sinh chloramphenicol cho hiệu quả kháng trên các chủng *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* và *Streptococcus pyogenes* [28].

4. Kết luận

Các kết quả thí nghiệm cho thấy, chiết xuất LT-Et96 và LN-Et96 có hiệu quả khác nhau trong kháng nấm *T. rubrum*; cụ thể, mẫu LT-Et96 có tính kháng nấm cao và mẫu LN-Et96 có tính kháng yếu hơn. Nồng độ MIC đối với nấm *T. rubrum* ghi nhận được của LT-Et96 và LN-Et96 lần lượt là 1 và 10 mg/ml. Nồng độ MFC của LT-Et96 ở 6, 14 và 24 giờ là 8 mg/ml; ở 48 giờ nồng độ là 4 mg/ml. Nồng độ MFC của LN-Et96 lần lượt là 50 mg/ml ở 24 giờ và 40 mg/ml ở 48 giờ. Như vậy, ở thời điểm 48 giờ khảo sát MFC, hai loại chiết xuất đều ghi nhận khả năng diệt nấm. Các nghiệm thức phối trộn ở nồng độ cao của LT-Et96 (1 mg/ml) với các nồng độ của LN-Et96 (10-1,25 mg/ml) ghi nhận hiệu quả kháng nấm đạt 100%; kết quả tương tự khi kết hợp 0,5 (LT-Et96) và 10 mg/ml

(LN-Et96). Ở các nghiệm thức còn lại cho thấy hiệu quả kháng nấm giảm dần theo các nồng độ từ xấp xỉ hơn 60 (0,5-0,0625 mg/ml LT-Et96 với 10 mg/ml LN-Et96) xuống còn hơn 30% (0,5-0,0625 mg/ml LT-Et96 với 1,25 mg/ml LN-Et96).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.P. Liang, X.Z. Huang, J.L. Yi, et al. (2016), "A Trichophyton rubrum infection model based on the reconstructed human epidermis-Episkin®", *Chinese Medical Journal*, **129**(1), pp.54-58, DOI: 10.4103/0366-6999.172573.
- [2] E.S. Armengol, M. Harmanci, F. Laffleur (2021), "Current strategies to determine antifungal and antimicrobial activity of natural compounds", *Microbiological Research*, **252**, DOI: 10.1016/j.micres.2021.126867.
- [3] N. Batra, V.E. Kumar, R. Nambiar, et al. (2022), "Exploring the therapeutic potential of neem (*Azadirachta indica*) for the treatment of prostate cancer: A literature review", *Annals of Translational Medicine*, **10**(13), DOI: 10.21037/atm-22-94.
- [4] H.T. Duong, N.K.T. Kieu, N.H. Loan, et al. (2022), "Evaluation of bioactivities of ultrasound-assisted extraction of betel leaves (*Piper betle* L.)", *Vietnam Journal of Science and Technology-Most*, **64**(3), pp.37-42, DOI: 10.31276/VJST.64(3).37-42 (in Vietnamese).
- [5] D. Mahmoud, N. Hassanein, K. Youssef, et al. (2011), "Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens", *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**, pp.1007-1016, DOI: 10.1590/S1517-838220110003000021.
- [6] P.D. Dellavalle, A. Cabrera, D. Alem, et al. (2011), "Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp.", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **10**(3), pp.218-225.
- [7] M. Balouri, M. Sadiki, S.K. Ibensouda (2016), "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**(2), pp.71-79, DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [8] M. Moslem, E. El-Kholie (2009), "Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds and leaves extract on some plant pathogenic fungi", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **12**(14), pp.1045-1048, DOI: 10.3923/pjbs.2009.1045.1048.
- [9] D.T.M. Thy, T.T.T. Hoa, B.T.B. Hang (2020), "Antifungal activity of extracted herbs on snakehead pathogenic fungal", *CTU Journal of Science*, **56**, pp.129-136, DOI: 10.22144/ctu.jsci.2020.015 (in Vietnamese).
- [10] K.C. Hazen (1998), "Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An *in vitro* comparison", *Journal of the American Academy of Dermatology*, **38**(5), pp.S37-S41, DOI: 10.1016/s0190-9622(98)70482-7.
- [11] S. Arikan (2007), "Current status of antifungal susceptibility testing methods", *Medical Mycology*, **45**(7), pp.569-587, DOI: 10.1080/13693780701436794.

- [12] S. Liga, C. Paul, F. Péter (2023), "Flavonoids: Overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques", *Plants*, **12**(14), p.2732, DOI: 10.3390/plants12142732.
- [13] L.T.T. Nguyen, H.N. Nguyen, Q.T.P. Bui (2020), "Simultaneous determination of active compounds in *Piper betle* Linn. leaf extract and effect of extracting solvents on bioactivity", *Engineering Reports*, **2**(10), DOI: 10.1002/eng2.12246.
- [14] A. Ali, X.Y. Lim, C.H. Chong, et al. (2018), "Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from *Piper betle* using response surface methodology", *LWT*, **89**, pp.681-688, DOI: 10.1016/j.lwt.2017.11.033.
- [15] A.R. Abdulkadir, N. Mat, M.S. Jahan (2017), "In-vitro antioxidant potential in leaf, stem and bark of *Azadirachta indica*", *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, **40**(4), pp.515-526.
- [16] I. Ali, F.G. Khan, K.A. Suri, et al. (2010), "In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L.", *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **9**, pp.1-9, DOI: 10.1186/1476-0711-9-7.
- [17] D.H.N. Trung, H.D. Huy, N.N. An, et al. (2022), "Evaluation of total polyphenol, flavonoid contents and biological activities of the extracts from rambutan rinds (*Nephelium lappaceum* L.)", *CTU Journal of Science*, **58**, pp.74-82, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2022.122 (in Vietnamese).
- [18] S. Sukdee (2023), "Evaluation of antifungal activity against *Pyricularia oryzae*, the cause of rice blast disease, from the extract of *Piper* spp.", *Ramkhamhaeng International Journal of Science and Technology*, **6**(1), pp.1-11.
- [19] M.S. Akthar, G. Birhanu, S. Demisse (2014), "Antimicrobial activity of *Piper nigrum* L. and *Cassia didymobotrya* L. leaf extract on selected food borne pathogens", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **4**, pp.S911-S919, DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60757-X.
- [20] P.A. Arumugam, I. Mohamad, R. Salim, et al. (2015), "Antifungal effect of Malaysian neem leaf extract on selected fungal species causing otomycosis in *in-vitro* culture medium", *Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences*, **11**(2), pp.69-84.
- [21] T. Singh, P. Singh, V.K. Pandey, et al. (2023), "A literature review on bioactive properties of betel leaf (*Piper betel* L.) and its applications in food industry", *Food Chemistry Advances*, **3**, DOI: 10.1016/j.focha.2023.100536.
- [22] S. Sarkar, R.P. Singh, G. Bhattacharya (2021), "Exploring the role of *Azadirachta indica* (neem) and its active compounds in the regulation of biological pathways: an update on molecular approach", *3 Biotech*, **11**(4), DOI: 10.1007/s13205-021-02745-4.
- [23] D.C. Ontengco (2019), "The activity of the leaf essential oil of Philippine *Piper betel* against dermatophytes and *Candida albicans*", *Philippine Journal of Systematic Biology*, **13**(2), pp.15-18, DOI: 10.26757/pjsb2019b13002.
- [24] D.I.O. Salazar, R.A.H. Sánchez, F.O. Sánchez, et al. (2015), "Antifungal activity of neem (*Azadirachta indica*: Meliaceae) extracts against dermatophytes", *Acta Biológica Colombiana*, **20**(3), pp.181-192, DOI: 10.15446/abc.v20n3.45225.
- [25] T. Kakande, Y. Batunge, E. Eilu, et al. (2019), "Prevalence of dermatophytosis and antifungal activity of ethanolic crude leaf extract of *Tetradenia riparia* against dermatophytes isolated from patients attending Kampala International University Teaching Hospital, Uganda", *Dermatology Research and Practice*, **2019**(1), p.9328621, DOI: 10.1155/2019/9328621.
- [26] H. Abubakar, A. Musa, M. Abdullahi, et al. (2020), "Antifungal effects of *Tapinanthus globiferus* growing on *Vitex doniana* against some fungal isolates", *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, **5**(1), pp.42-46, DOI: 10.22270/ujpr.v5i1.361.
- [27] R.H. Tiple, S.R. Jamane, D.S. Khobragade (2024), "Antifungal activity of neem leaf extract with *Eucalyptus citriodora* oil and *Cymbopogon martini* oil against tinea capitis: An *in-vitro* evaluation", *Cureus*, **16**(5), DOI: 10.7759/cureus.59671.
- [28] U. Taukoorah, N. Lall, F. Mahomoodally (2016), "*Piper betle* L. (betel quid) shows bacteriostatic, additive, and synergistic antimicrobial action when combined with conventional antibiotics", *South African Journal of Botany*, **105**, pp.133-140, DOI: 10.1016/j.sajb.2016.01.006.