

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.141

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG SINH CỦA CAO CHIẾT TỪ LOÀI HẢI MIỀN *Petrosia* (Blue) SP.

Lưu Vũ Phương¹, Quách Kim Huỳnh Hoa¹, Hà Tất Toàn¹, Bùi Minh Phúc¹, Lê Minh Trí¹, Võ Duy An² và Tôn Nữ Liên Hương^{3*}

¹Sinh viên Hoá Dược K44, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Học viên cao học Hoá Hữu cơ K27, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Tôn Nữ Liên Hương (email: tnlhuong@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/06/2021

Ngày nhận bài sửa: 27/08/2021

Ngày duyệt đăng: 29/10/2021

Title:

Investigation of antibiotic activity of sponge extract from *Petrosia* sp. (blue)

Từ khóa:

Kháng oxy hóa, kháng vi sinh vật kiểm định, *Petrosia* (blue) sp.

Keywords:

Antioxydant, antimicroorganism, *Petrosia* (blue) sp.

ABSTRACT

Among the sponge species in Southwestern Vietnam, *Petrosia* sp. (blue) is relatively abundant and little studied. Surveying the biological activities of sponge harvested at a depth of 10 m in Kien Giang waters gave a lot of useful information. Testing for microorganism, 3 out of 4 samples, were well inhibited both Gram-negative and Gram-positive bacteria species; that are the total ethanol extract, the remaining ethanol extract, and dichloromethane extract, with IC₅₀ less than 40 µg/mL. However, these extracts are neither antioxidant nor anti-*Candida albican*.

TÓM TẮT

Trong số các loài hải miên của vùng biển Tây Nam Việt Nam, loài *Petrosia* (blue) sp. có số lượng tương đối phong phú và ít được nghiên cứu. Khảo sát hoạt tính sinh học của các cao chiết từ loài hải miên *Petrosia* (blue) sp. được thu gom ở độ sâu khoảng 10 m tại vùng biển Kiên Giang đã cho những thông tin hữu ích. Khi thử nghiệm kháng vi sinh vật, trong số 4 mẫu thử có 3 mẫu ức chế tốt các loài vi khuẩn Gram âm lẫn Gram dương, một loài nấm men; đó là các mẫu cao ethanol tổng, cao ethanol còn lại, cao dichloromethane, với IC₅₀ < 40 µg/mL. Tuy nhiên, các cao của loài hải miên này không kháng oxy hóa và không có tác dụng với nấm men *Candida albican*.

1. GIỚI THIỆU

Nghiên cứu thành phần hoá học của các sinh vật biển thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học vì đã phát hiện nhiều cấu trúc hợp chất biển dưỡng thứ cấp độc đáo trong cơ thể chúng mà không tìm thấy từ các nguồn sinh vật trên cạn (Ryu et al., 1996). Do điều kiện vật lý và hóa học đặc biệt của môi trường biển, các hợp chất hữu cơ được sinh tổng hợp đa dạng và có nhiều hoạt tính (Blunt et al., 2011). Hải miên (bọt biển) là một trong những động vật nguyên

sinh cổ xưa nhất, là nguồn phân lập được gần 50% các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học (Gul & Hamann, 2005). Hải miên được biết đến là nguồn hợp chất tự nhiên phong phú với hơn 5.000 loài có khắp vùng biển trên thế giới, có tiềm năng dược lý quý giá (Alarif et al., 2016). Trong số các loài của ngành Porifera, các nhà khoa học Đài Loan nghiên cứu *Petrosia* sp. và từ chiết xuất thô EtOAc (ethyl acetate) của nó (dịch chiết EtOAc thể hiện độc tính đáng kể với sáu dòng tế bào khối u ở người), đã tách các polyacetylene mạch hở khác nhau có hoạt tính

sinh học mạnh gây độc tế bào ung thư trong thử nghiệm *in vitro* (Juan et al., 2014).

Việc khảo sát khả năng kháng oxy hóa và kháng vi sinh vật của các hợp chất phân lập từ loài hải miên còn ít được quan tâm và công bố so với khảo sát gây độc tế bào ung thư (Shen et al., 2006). Các loài hải miên rất có tiềm năng kháng oxy hóa và kháng khuẩn. Các pyrimidine phân lập từ loài hải miên tại Philippines thể hiện hoạt tính kháng khuẩn Gram âm tốt (Alma et al., 2013). Các dẫn xuất indole bao gồm bromoindole đã được phân lập từ hải miên vùng Thái Bình Dương: *Rhopaloeides odorabile* và *Hyrtios* sp. đều thể hiện kháng oxy hoá mạnh (Longeon et al., 2011). Cụ thể, dẫn xuất 5,6-dibromo-L-hypaphorine được phân lập từ *Hyrtios* sp. có giá trị hấp thụ gốc oxy (oxygen radical absorbance capacity): ORAC = 0,22 ($\mu\text{g TE/mL}$ dung dịch mẫu), ngoài ra, cũng phân lập được sesquiterpene là aureol với ORAC = 0,29. Trong nghiên cứu gần đây, cao acetone từ loài *Aaptos* sp. ở vùng biển Indonesia thể hiện khả năng kháng oxy hoá tốt trong thử nghiệm DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) với $\text{IC}_{50} = 16,10 \mu\text{g/mL}$ (Fristiohady et al., 2020).

Nội dung bài báo này trình bày kết quả khảo sát sơ bộ khả năng oxy hoá và kháng vi sinh vật kiểm định nhằm cung cấp thêm chứng cứ khoa học về hoạt tính sinh học của loài hải miên *Petrosia (blue)* sp. để khai thác, thu gom được tại vùng biển Tây Nam Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP, PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện, vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật liệu: hải miên thuộc chi *Petrosia*, tên là *Petrosia (blue)* sp., được thu gom tại độ sâu 5-10 m vùng biển Kiên Giang, Việt Nam, ở tọa độ N 09°58'17.8"(E 104°01'34.4"), được định danh bởi TS. Thái Minh Quang công tác tại Viện Hải dương học Nha Trang. Mẫu tiêu bản số Sp10-2018, lưu tại phòng thí nghiệm Hữu cơ 2, khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

Hóa chất sử dụng điều chế cao chiết: ethanol, dichloromethane, *n*-hexane (Chemsol, Việt Nam) và dùng thử hoạt tính kháng oxy hóa: DPPH, DMSO (dimethyl sulfoxide), methanol (Merck). Chất hấp phụ Diaion HP-20 (Sigma-Aldrich). Bộ cô quay Heidolph, máy UV-Vis (Biotek), các dụng cụ phân tích vi sinh, micropipette và eppendorf.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thực hiện định danh khoa học mẫu nguyên liệu và chiết cao ethanol, sau đó dùng phương tiện chiết lỏng lỏng để phân đoạn cao theo độ phân cực khác nhau, tại khoa Khoa học tự nhiên (KHTN)

Thử nghiệm kháng oxy hoá được thực hiện tại khoa KHTN, trường Đại học Cần Thơ

Thử nghiệm kháng vi sinh vật kiểm định theo phương pháp pha loãng nồng độ trên môi trường lỏng, thực hiện tại phòng Hoá Sinh ứng dụng, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam.

2.2.1. Điều chế cao chiết

Mẫu hải miên *Petrosia (blue)* sp. sau khi thu về được rửa thật sạch để ráo, tiếp theo ngâm dầm, chiết kiệt với dung môi ethanol. Dịch chiết sau khi cô quay loại bớt dung môi được cao chiết ethanol tổng và được loại muối qua cột Diaion. Thực hiện chiết phân đoạn lỏng lỏng với các dung môi có độ phân cực khác nhau và cô đặc dung dịch thu được các cao chiết, gồm cao ethanol tổng (EtOH tổng), cao *n*-hexane (cao Hex), cao dichloromethane (cao DC) và cao ethanol còn lại (EtOH còn lại).

2.2.2. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) là chất tạo ra gốc tự do được dùng để thực hiện sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính kháng oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng $\lambda = 517 \text{ nm}$.

Cách tiến hành: Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1mM trong methanol. Chất thử được pha trong DMSO 100% sao cho cuối cùng đạt được một dãy các nồng độ theo cấp số nhân từ 4 đến 256 $\mu\text{g/mL}$. Để thời gian phản ứng 30 phút ở 37°C, đọc mật độ hấp phụ của DPPH chưa phản ứng bằng máy đọc Biotek ở bước sóng 517 nm. (Cuendet et al., 1997; Burits & Bucar, 2000; Marxen et al., 2007) Từ đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ DPPH và mật độ quang học lập được có thể ngoại suy các giá trị phần trăm bắt gốc tự do, kháng oxy hoá.

% bắt gốc tự do DPPH (SC%) của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\text{SC\%} = (\text{OD}_{\text{trắng}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}) / \text{OD}_{\text{trắng}} (\%)$$

Trong đó, $\text{OD}_{\text{trắng}}$: giá trị mật độ quang đo của mẫu trắng;

OD thử: giá trị mật độ quang đo của mẫu thử

EC₅₀ được tính theo giá trị SC tương quan với các nồng độ khác nhau của chất thử nghiệm, thí nghiệm được lặp lại với n = 3.

2.2.3. *Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định*

Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633): là trực khuẩn Gram dương, sinh bào tử, thường không gây bệnh. *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709): cầu khuẩn Gram dương, gây mũ các vết thương, vết bỏng, gây viêm họng, nhiễm trùng có mũ trên da và các cơ quan nội tạng *Lactobacillus fermentum* (N4): vi khuẩn Gram dương, là loại vi khuẩn đường ruột lên men có ích, thường có mặt trong hệ tiêu hóa của người và động vật.

Escherichia coli (ATCC 25922): vi khuẩn Gram âm, gây một số bệnh về đường tiêu hóa như viêm dạ dày, viêm đại tràng, viêm ruột, viêm lỵ trực khuẩn. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442): vi khuẩn Gram âm, trực khuẩn mũ xanh, gây nhiễm trùng huyết, các nhiễm trùng ở da và niêm mạc, gây viêm đường tiết niệu, viêm màng não, màng trong tim, viêm ruột. *Salmonella enterica*: vi khuẩn Gram âm, gây bệnh thương hàn, nhiễm trùng đường ruột ở người và động vật. *Candida albicans* (ATCC 10231): nấm men, thường gây bệnh tưa lưỡi ở trẻ em và các bệnh phụ khoa.

Các kháng sinh thương mại được sử dụng như chất tham chiếu gồm kháng sinh Ampicillin, Cefotaxim và kháng nấm Nystatin. Môi trường nuôi cấy: MHB (Mueller-Hinton Broth), MHA (Mueller-Hinton Agar); TSB (Tryptic Soy Broth); TSA (Tryptic Soy Agar) cho nuôi cấy vi khuẩn; SDB (Sabourand-2% dextrose broth) và SA (Sabourand-4% dextrose agar) cho nuôi cấy nấm.

Phương pháp pha loãng nồng độ trên môi trường lỏng được sử dụng trong thí nghiệm hoạt tính kháng

vi sinh vật kiểm định, đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua độ đục của môi trường nuôi cấy. Các giá trị thể hiện hoạt tính là IC₅₀ (50% Inhibitor Concentration: nồng độ ức chế 50%), MIC (Minimum Inhibitor Concentration: nồng độ ức chế tối thiểu), MBC (Minimum Bactericidal Concentration: nồng độ diệt khuẩn tối thiểu) và MFC (Minimum Fungicidal Concentration: nồng độ diệt nấm tối thiểu), (Ania et al., 2017; Cos et al., 2006; Hadacek & Greger, 2007)

Cách tiến hành:

Pha loãng mẫu thử:

Mẫu ban đầu được pha loãng 2 bước trong DMSO 100% và nước cất tiệt trùng thành một dãy 4 nồng độ. Nồng độ thử cao nhất trong thí nghiệm là 256 µg/mL với dịch chiết.

Thử hoạt tính:

– Vi sinh vật kiểm định được lưu giữ ở -80°C. Trước khi thí nghiệm, vi sinh vật kiểm định được hoạt hóa bằng môi trường nuôi cấy sao cho nồng độ vi khuẩn đạt 5.10⁵ CFU/mL;

nồng độ nấm đạt 10³ CFU/mL.

– Lấy 10 µl dung dịch mẫu thử ở các nồng độ vào đĩa 96 giếng, thêm 190 µl dung dịch vi khuẩn và nấm đã được hoạt hóa ở trên, ủ ở 37°C/ 16-24 giờ.

Xử lý kết quả

– Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật. Giá trị MBC/MFC được xác định bằng cách cấy dung dịch tại giếng đã xác định có giá trị MIC lên đĩa thạch và không có vi sinh vật kiểm định nào mọc trở lại sau 24 giờ. IC₅₀ được xác định thông qua giá trị % ức chế vi sinh vật phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$\% \text{ ỨC CHẾ TẾ BÀO} = \frac{(OD_{\text{chúng (+)}} - OD_{\text{mẫu thử}})}{OD_{\text{chúng (+)}} - OD_{\text{chúng (-)}}} \times 100\%$$

$$IC_{50} = High_{\text{Conc}} - \frac{(High_{\text{Inh\%}} - 50) \times (High_{\text{Conc}} - Low_{\text{Conc}})}{High_{\text{Inh\%}} - Low_{\text{Inh\%}}}$$

(Trong đó, High_{Conc}/Low_{Conc}: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; High_{Inh%}/Low_{Inh%}: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp).

– Đánh giá hoạt tính: dịch chiết có IC₅₀ < 100 µg/mL; chất sạch có IC₅₀ < 25 µM. Hoặc mẫu thô có MIC ≤ 200 µg/mL; chất sạch có MIC ≤ 50 µg/mL.

Chất tham chiếu

– Kháng sinh Ampicillin cho các chủng vi khuẩn Gram dương với các giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,001-0,500 µg/mL; các giá trị MIC trong khoảng 0,004-1,200 µg/mL.

– Kháng sinh Cefotaxim cho các chủng vi khuẩn Gram âm với các giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,025-15,75 µg/mL; với giá trị MIC trong khoảng 0,05-19,5 µg/mL.

– Kháng nấm Nystatin cho chủng nấm *Candida* với giá trị IC_{50} trong khoảng 2-2,5 $\mu\text{g/ml}$; với giá trị MIC trong khoảng 2,8-5,0 $\mu\text{g/mL}$.

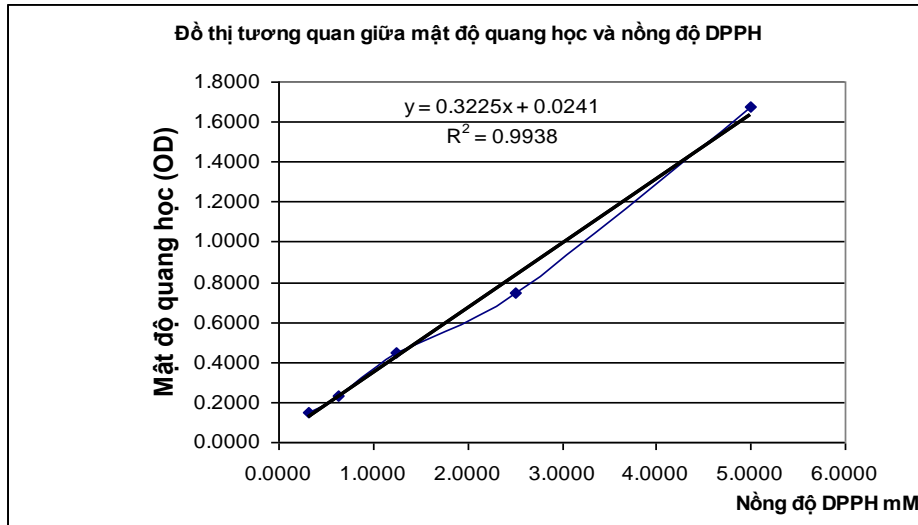
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thử hoạt tính kháng oxy hóa

Thực hiện pha loãng các mẫu cao theo các thang nồng độ tăng dần từ 4 đến 16, 64 và 256 $\mu\text{g/mL}$ và

ở mỗi nấc nồng độ cho mẫu cao pha với DPPH để hình thành mẫu thử, đo độ hấp thụ quang và xây dựng đồ thị tương quan giữa mật độ quang và nồng độ mẫu như Hình 1.

Từ phần trăm bất gốc tự do DPPH của mẫu thử có được, đã tính giá trị EC_{50} của các mẫu sau 3 lần thử nghiệm. Kết quả thử nghiệm được tóm tắt trình bày trong Bảng 1.



Hình 1. Đồ thị tương quan giữa mật độ quang và nồng độ DPPH

Bảng 1. Khả năng bất gốc tự do (%) theo từng nồng độ của các cao chiết

Tên mẫu	Khả năng bất gốc tự do (%) theo nồng độ thử nghiệm				EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	256 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	
Cao EtOH tổng	18%	0%	0%	0%	>256
Cao EtOH còn lại	21%	7%	0%	0%	>256
Cao DC	19%	3%	0%	0%	>256
Cao Hex	17%	0%	0%	0%	>256

Theo bảng kết quả, cao chiết của hải miên *Petrosia (blue)* sp không bất gốc tự do ở nồng độ nhỏ, các giá trị EC_{50} của cao lớn hơn 256 $\mu\text{g/mL}$, không có khả năng kháng oxy hóa ứng dụng được trong thực tế.

Trong cùng chi *Petrosia*, chỉ có loài *Petrosia contignata* có khả năng kháng oxy hóa yếu, với giá trị $IC_{50} = 89,59 \mu\text{g/mL}$ (Abdillah et al., 2013). Trong các loài khác chi *Petrosia*, như hải miên thuộc họ Superitade ở khu vực biển Philippine, loài *Aaptos suberitoides* kháng oxy hoá tốt $IC_{50} = 27,42 \mu\text{g/mL}$, (Alma et al., 2013).

3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật

Hiệu quả ức chế các chủng vi sinh vật kiểm định được trình bày ở Bảng 2. Kết quả cho thấy, trừ cao Hex, các cao phân cực trung bình đến phân cực mạnh của hải miên *Petrosia (blue)* sp. đều có khả năng ức chế đối với 6 dòng vi khuẩn: *S. aureus*, *B. subtilis*, *L. fermentum*, *S. enterica*, *E. coli* và *P. aeruginosa* ở các nồng độ khác nhau. Đặc biệt cao DC ít ảnh hưởng tới lợi khuẩn Gram dương *L. fermentum*. Các cao phân cực như: cao EtOH tổng, cao EtOH còn lại sau khi tách loại các chất phân cực yếu, đều cho kết quả ức chế mạnh vi khuẩn Gram dương, $IC_{50} < 28,9 \mu\text{g/mL}$, mức nồng độ áp dụng rất tốt vào thực tế.

Bảng 2. Hiệu quả ức chế các chủng vi sinh vật kiểm định của các loại cao chiết

Tên mẫu	Giá trị	Nồng độ ức chế VSV Gram dương (µg/mL)			Nồng độ ức chế VSV Gram âm (µg/mL)			Nấm men
		S. aureus	B. subtilis	L. fermentum	E. coli	S. enterica	P. aeruginosa	
Cao EtOH tổng	IC ₅₀	12,60	15,33	12,17	10,00	141,84	34,96	>256
	MIC	256	256	256	16,00	>256	64,00	>256
Cao EtOH còn lại	IC ₅₀	11,08	28,86	43,00	9,55	117,58	35,67	>256
	MIC	64,00	256	>256	16,00	>256	64,00	>256
Cao DC	IC ₅₀	99,26	>256	218,28	154,22	>256	>256	>256
	MIC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Cao Hex	IC ₅₀	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
	MIC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256

Đối với các khuẩn Gram âm gây các bệnh lý bất lợi đường ruột, các cao phân cực đều có khả năng kháng khuẩn tốt, trong đó cao ethanol tổng và cao ethanol còn lại ức chế mạnh vi khuẩn *Escherichia coli* (IC₅₀ < 10,0 µg/mL) và trực khuẩn mủ xanh *P. aeruginosa*, (IC₅₀ < 35,9 µg/mL), mức nồng độ có giá trị ứng dụng tốt vào thực tế. Tất cả các cao không ức chế chủng nấm men *Candida albican*.

Nhìn chung, khả năng ức chế tất cả các chủng vi khuẩn Gram dương lẫn Gram âm rất mạnh ở hai loại cao phân cực là cao ethanol tổng và ethanol còn lại (cao tổng đã loại béo), khả năng này chỉ hơi yếu đối với chủng khuẩn *Salmonella enterica* gây bệnh tả lỵ. Các giá trị IC₅₀ của 2 loại cao ethanol này khoảng 9,55-10,0 (µg/mL) và MIC 16,0 (µg/mL) xấp xỉ với các số liệu của chất tham chiếu Cefatoxim ức chế *Escherichia coli*, chứng tỏ chế phẩm từ hải miên *Petrosia blue* rất nhiều tiềm năng ứng dụng là kháng sinh có giá trị an toàn sinh học.

Hải miên là sinh vật biển không có giá trị thương phẩm như san hô, nhưng có khả năng kháng sinh mạnh như trường hợp của loài *Petrosia (blue) sp.* này là một nguồn lợi đặc thù của vùng biển Việt Nam.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên các cao chiết phân cực khác nhau của loài hải miên *Petrosia (blue) sp.* cho những kết quả bước đầu rất khả quan. Trong số 4 cao thử nghiệm, có 3 loại gồm cao dichloromethane, cao ethanol sau khi loại béo và cao ethanol tổng thể hiện khả năng kháng khuẩn tốt với cả 3 chủng khuẩn Gram âm gây bệnh nguy hiểm, ức chế mạnh 2 khuẩn Gram dương, ức chế tương đối yếu với vi khuẩn đường ruột *Lactobacillus fermentum*. Cao ethanol tổng có khả năng kháng sinh tốt nhất với 3 chủng khuẩn Gram âm là *Staphylococcus aureus* (IC₅₀ = 11,08 µg/mL), *Escherichia coli* (IC₅₀ = 9,55 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (IC₅₀ = 35,67 µg/mL). Tuy

các cao chiết của loài hải miên *Petrosia sp. (blue)* không thể hiện khả năng kháng oxi hóa và kháng nấm men, nhưng đây là một nguồn cung cấp các hợp chất có khả năng kháng vi sinh vật tốt, có tiềm năng ứng dụng trong đời sống.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Trường Đại học Cần Thơ đã cấp kinh phí thực hiện đề tài Sinh viên NCKH, mã số TSV2021-53, Bộ môn Hóa học, Khoa Khoa học tự nhiên đã hỗ trợ thiết bị nghiên cứu, chân thành cảm ơn TS. Thái Minh Quang (Viện Hải dương học Nha Trang) đã nhiệt tình hỗ trợ định danh các loài hải miên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdillah, S., Nurhayati, A., Nurhatika, S., Setiawan, E. & Heffen, W. L. (2013). Cytotoxic and antioxidant activities of marine sponge diversity at Pecaron Bay Pasir Putih Situbondo East Java, Indonesia. *Journal of Pharmacy Research*, 6(7), 685-689.

Alarif, W. M., Lihaibi, S. S. A., Ghandourah, M. A., Orif, M. I., Basaif, S. A. & Ayyad, S. E. N. (2016). Cytotoxic scalarane-type sesterterpenes from the Saudi Red Sea sponge *Hyrtios erectus*. *J. Asian Natural Product Research*, 18(6), 611-617.

Alma, M., Quiao, D. & Mylene, M. U. (2013). Pyrimidines from the Philippine marine sponge *Aptos suberitoides*, *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4(1), 1-4.

Ania, O. P., Arranz, J. C. E., Beaven, M., Renato P. R., Yordania, M. G., Miladis, I. C. P., Maury, G. L., Macedo, M. B., Cos, P., Tavares, J. F. & Silva, M. S. D. (2017). Bioassay-guided-*in vitro* study of the antimicrobial and cytotoxic properties of the leaves from *Excoecaria lucida* Sw. *Pharmacognosy Research*, 9(4), 396-400.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. (2011). Marine natural products. *Natural Product Report*, 28(2), 196-268.

- Burits, M. & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, **14**(5), 323–328. DOI: 10.1002/1099-1573(200008)
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Vanden, B. D. & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of nature products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, **106**(3), 290-302. DOI: 10.1016/j.jep.2006.04.003.
- Cuendet, M., Hostettmann, K. & Potterat, O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*, *Helvetica Chimica Acta*, **80**(4), 1144–1152.
- Fristiohady, A., Sadarun, A., Wahyuni, W., Malaka, M. H., Ahmad, F., Malik, F., Purnama, L. O. M. J. & Sahidin, I. (2020). Isolation and identification of secondary metabolite acetone extract *Aptos sp.* and its antioxidant properties and acute toxicity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **10**(06), 81-89.
- Gul, W. & Hamann, M. T. (2005). Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. *Life Science*, **78**(5), 442–453. doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.007
- Hadacek, F. & Greger, H. (2000). Test of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, **11**(3), 137-147.
- Juan, Y. S.; Lee, C. C., Tsao C. W., Lu M. C., Mohamed E. S, Shih H. C., Chen C. Y, Wu Y. C., & Su J. H. (2014). Structure elucidation and cytotoxic evaluation of new polyacetylenes from a marine sponge *Petrosia sp.* *Int. J. Mol. Sci.*, **15**(9), 16511-16521. <https://doi.org/10.3390/ijms150916511>
- Longeon, A., Brent, R., Copp, E. Q., Roué, M., Kientz, B., Cresteil, T., Petek, S., Debitus, C. & Bourguet-Kondracki, M. L. (2011). Bioactive Indole derivatives from the South Pacific marine sponges *Rhopaloeides odorabile* and *Hyrtios sp.* *Marine drugs*, **9**(5), 879-888. DOI: 10.3390/md9050879
- Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., & Hansen, U. P. (2007). Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, **7**(10), 2080-2095.
- Ryu, G., Matsunaga, S., & Fusetani, N. (1996). Three new cytotoxic sesterterpenes from the marine sponge *Hyrtios cf. erectus*. *Journal of Natural Product*, **59**(5), 515-517.
- Shen, Y. C., Liaw, C., Ho, J. R., Khalil, A. T., & Kuo, Y. H. (2006). Isolation of aureol from *Smenospongia sp.* and cytotoxic activity of some aureol derivatives. *Nat. Prod. Res.*, **20**(6), 578–585. <https://doi.org/10.1080/14786410500185253>.