

DOI:10.22144/ctujos.2024.355

## KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHÁNG VIÊM *in vitro* CỦA CÁC DÒNG VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY CÚC CHỈ THIÊN MỀM (*Elephantopus mollis*)

Trần Chí Linh<sup>2</sup>, Nguyễn Phương Phi Trúc<sup>1</sup> và Đái Thị Xuân Trang<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ<sup>2</sup>Bộ môn Hóa sinh, Khoa Y, Trường Đại học Nam Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): dtxtrang@ctu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 25/03/2024

Sửa bài (Revised): 21/05/2024

Duyệt đăng (Accepted): 30/06/2024

**Title:** Investigating the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of endophytic bacterial strains in *Elephantopus mollis*

**Author(s):** Tran Chi Linh<sup>2</sup>, Nguyen Phuong Phi Truc<sup>1</sup> and Dai Thi Xuan Trang<sup>1\*</sup>

**Affiliation(s):** <sup>1</sup>Can Tho University, <sup>2</sup>Nam Can Tho University

### TÓM TẮT

Vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chỉ thiên mềm có khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm *in vitro* được phân lập và tuyển chọn. Hoạt tính kháng oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định nhờ vào phương pháp kháng oxy hóa tổng số, năng lực khử và trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Hoạt tính kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định dựa vào khả năng ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò. Các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng sản sinh chất kháng oxy hóa với hàm lượng dao động từ 1,04±0,31 đến 358,7±17,9 mg ascorbic acid equivalent (AAE)/mL. Hàm lượng chất kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh dao động từ 0,40±0,01 đến 4,16±0,06 mg diclofenac equivalent (DE)/mL. Hàm lượng polyphenol và flavonoid của các dòng vi khuẩn nội sinh tạo ra lần lượt dao động từ 12,9±0,2 đến 23,8±0,1 mg gallic acid equivalent (GAE)/mL và 13,9±2,8 đến 252,8±2,8 quercetin equivalent (QE)/mL. Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cúc chỉ thiên mềm cho thấy tiềm năng sản sinh các các hợp chất kháng oxy hóa và kháng viêm.

**Từ khóa:** Cúc chỉ thiên mềm, kháng oxy hóa, kháng viêm, vi khuẩn nội sinh

### ABSTRACT

The study aimed to identify endophytic bacterial strains in *Elephantopus mollis* with anti-oxidant and anti-inflammatory properties *in vitro*. Endophytic bacterial strains' antioxidant activity was determined using the method of total antioxidant capacity, reducing power, and neutralizing 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical. The anti-inflammatory activity of endophytic bacterial strains was assessed by their ability to inhibit bovine serum albumin denaturation. Endophytic bacterial strains could produce antioxidants with concentrations ranging from 1.04±0.31 to 358.7±17.9 mg AAE/mL. Endophytic bacterial strains' anti-inflammatory content ranged from 0.40±0.01 to 4.16±0.06 mg DE/mL. The findings of the research indicate that the polyphenol and flavonoid content of endophytic bacterial strains relates to their antioxidant and anti-inflammatory. The polyphenol and flavonoid content of the endophytic bacterial strains ranged from 12.9±0.2 đến 23.8±0.1 mg gallic acid equivalent (GAE)/mL và 13.9±2.8 đến 252.8±2.8 quercetin equivalent (QE)/mL, respectively. *Elephantopus mollis* endophytic bacterial strains have the capacity to generate secondary metabolites that have anti-inflammatory and antioxidant abilities.

**Keywords:** Anti-inflammatory, antioxidant, endophytic bacteria, *Elephantopus mollis*

## 1. GIỚI THIỆU

Viêm là một cơ chế phòng thủ của cơ thể con người đối với các tác động có hại từ bên ngoài và nội sinh do sự phá hủy tế bào cơ học, hóa học hoặc sinh học. Cytokine tham gia vào phản ứng viêm được đặc trưng là các cytokine tiền viêm như interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 và TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) và các cytokine kháng viêm (interleukin-1R $\alpha$ , interleukin-4, interleukin-10) và TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1) (Han & Yu, 2014; Matsuda et al., 2019). Các cytokine tiền viêm tăng cường nhiễm trùng toàn thân và bắt đầu phản ứng miễn dịch với bệnh tật, trong khi các cytokine kháng viêm chống lại những tác động này để giảm viêm và thúc đẩy quá trình lành vết thương. Ngoài ra, tình trạng viêm còn thúc đẩy và điều chỉnh nhiều phản ứng sinh học như apoptosis, hoại tử và tự thực bào do stress oxy hóa (He et al., 2016). Stress oxy hóa và viêm được chứng minh có mối liên quan mật thiết với nhau. Sự hiện diện của các tế bào viêm dẫn đến quá trình nitrat hóa và oxy hóa các đại phân tử sinh học như protein, lipid, DNA và RNA. Quá trình này tạo ra nhiều gốc tự do, bao gồm cả các loại oxy phản ứng (reactive species oxygen, ROS) và nitơ phản ứng (reactive species nitrogen, RNS) là nguyên nhân của stress oxy hóa. Quá trình viêm và stress oxy hóa kết hợp với nhau dẫn đến nguy cơ mắc các bệnh lý về tim mạch, ung thư, đái tháo đường, viêm gan, suy thận và thoái hóa thần kinh (Vona et al., 2021; Scarian et al., 2024). Viêm và stress oxy hóa có thể được kiểm soát bằng cách bổ sung các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc từ thực vật. Tuy nhiên, số lượng các hoạt chất chuyển hóa thứ cấp do thực vật tạo ra trong môi trường sống tự nhiên thường thấp và phụ thuộc vào các yếu tố môi trường, trạng thái sinh lý và tuổi của thực vật. Bên cạnh đó, thực vật bị khai thác để ly trích các hợp chất chuyển hóa thứ cấp quá mức dễ thương mại hóa dẫn đến nguy cơ cạn kiệt. Quá trình tổng hợp nhân tạo các chất chuyển hóa thứ cấp thực vật thường không đạt hiệu quả cao do các phản ứng trao đổi chất phức tạp (Pyne et al., 2019; Ogbe et al., 2020). Do đó, các nhà khoa học đang quan tâm tìm kiếm nguồn cung cấp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp mới có tác dụng tương tự như thực vật làm thuốc.

Những phát triển mới trong hệ sinh thái vi sinh vật cho thấy rằng một số khả năng chịu đựng hoặc đề kháng của thực vật không chỉ bắt nguồn từ thực vật mà còn từ vi khuẩn nội sinh. Vi khuẩn nội sinh không chỉ giúp kích thích sinh trưởng ở thực vật mà còn có khả năng sản xuất ra các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có lợi cho thực vật (Ogbe et al., 2020; Wu et al., 2024). Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp này

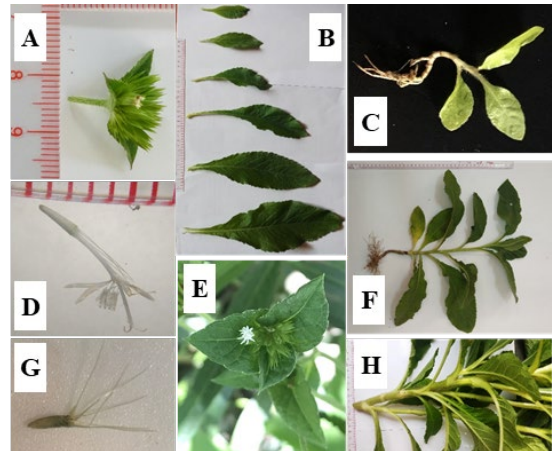
cũng sở hữu nhiều hoạt tính sinh học có giá trị đối với con người. Nhiều nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh trên các loài thực vật khác nhau đã được thực hiện. Tuy nhiên, các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh có hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm trong và ngoài nước của cây cúc chi thiên mem vẫn chưa được thực hiện.

Cúc chi thiên mem là một cây thuốc có công dụng điều trị cảm, sốt, ho, họng sưng đau, đau bụng, viêm kết mạc, viêm thận, tiêu chảy, vàng da, mụn nhọt thanh nhiệt, giải độc, khoan trung hạ khí và lợi tiểu. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy, cúc chi thiên mem có khả năng kháng oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, bảo vệ gan và gây độc tế bào ung thư (Ngoc et al., 2020; Phuc et al., 2020; Thanh và ctv., 2022, Tam et al., 2023). Nghiên cứu này tập trung vào hoạt tính sinh học của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mem, bước đầu nhằm tìm ra dòng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính sinh học tiềm năng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

Cây cúc chi thiên mem được thu vào tháng 6 năm 2021 tại Thiên Cẩm Sơn, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang. Cây cúc chi thiên mem được nhận diện dựa vào đặc điểm hình thái theo mô tả trong bộ sách cây cỏ Việt Nam của Phạm Hoàng Hộ (2003). Đặc điểm hình thái của cây cúc chi thiên mem được trình bày trong Hình 1.



**Hình 1. Hình thái cúc chi thiên mem**

Ghi chú: A, E là hoa đầu kép; B là lá non đến lá trưởng thành; C, F là toàn bộ cây; D là bộ nhị đực và nhụy cái; G là hạt; H là thân và lá.

## 2.2. Thiết bị và hóa chất

Hóa chất: môi trường potato dextrose broth (Himedia, Ấn Độ), ethanol (Cemeco, Việt Nam), hydrogen peroxide (Xilong, Trung Quốc, bộ nhuộm Gram (Nam Khoa, Việt Nam), agar (Hải Long, Việt Nam), Folin-ciocalteu (Merck, Đức), sodium carbonate (Xilong, Trung Quốc), gallic acid (Meck, Đức), aluminum chloride hexahydrate (Xilong, Trung Quốc), natri hydroxide (Merck, Đức), quercetin (Merck, Đức), kali ferricyanide (Merck, Đức), ferric chloride (Merck, Đức), trichloroacetic acid (Merck, Đức), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (Sigma-Aldrich, Mỹ), ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Mỹ) và sodium nitrite (Xilong, Trung Quốc) và một số hóa chất khác.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mền

Vi khuẩn nội sinh được phân lập từ các mẫu rễ, thân và lá của cây cúc chi thiên mền theo mô tả của Patle et al. (2018). Mẫu từ các bộ phận của cây được cắt thành những đoạn có chiều dài từ 2-3 cm, rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Khử trùng bề mặt mẫu bằng ethanol 70% trong 5 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng, ngâm trong NaClO 2% trong 3 phút và rửa lại ba lần bằng nước vô trùng. Sự hiện diện của vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng được kiểm tra bằng cách hút 50  $\mu$ L nước cất rửa mẫu lần cuối cùng trải vào môi trường potato dextrose agar (PDA) và ủ ở 30°C. Nếu sau 24 giờ không phát hiện các khuẩn lạc trên đĩa petri thì chúng tỏ bề mặt mẫu đã được vô trùng tuyệt đối. Vi khuẩn phân lập được từ các mẫu này chính là vi khuẩn nội sinh trong rễ, thân và lá của cây cúc chi thiên mền. Mẫu sau khi khử trùng được nghiền trong dung dịch đệm phosphate (pH 7) và để lắng trong 10-12 phút trong tủ cây vô trùng. Tiếp theo sau đó, 100  $\mu$ L phần dịch bên trên cho vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường PDA bán đặc đã được chuẩn bị trước, ủ 24-48 giờ ở 30°C. Sự phát triển của vi khuẩn nội sinh tạo thành vòng trắng đục (vòng pellicle) cách bề mặt môi trường 2-4 mm. Vi khuẩn từ vòng trắng đục được thu nhận, nuôi cấy và tách rỗng cho đến khi thuần chủng. Độ thuần chủng của các dòng vi khuẩn được xác định dựa trên các đặc điểm kiểu hình như hình thái khuẩn lạc, màu sắc, kích thước và phản ứng Gram. Đặc điểm tế bào vi khuẩn được quan sát bằng kính hiển vi quang học (Olympus, Japan).

Dịch ngoại bào của các dòng vi khuẩn được thu bằng cách nuôi tăng sinh 200  $\mu$ L vi khuẩn trong 9800  $\mu$ L môi trường potato dextrose broth (PDB)

(OD<sub>600</sub>=0,5), pH 7, 24 giờ ở 30°C trên máy lắc ngang 200 vòng/phút. Sau 24 giờ, dịch nuôi tăng sinh được ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút loại bỏ tế bào thu được dịch ngoại bào. Dịch ngoại bào được lưu trữ ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm trong nghiên cứu.

### 2.3.2. Định lượng polyphenol và flavonoid tổng

#### Định lượng polyphenol tổng

Polyphenol tổng (TPC) được định lượng theo Dai et al. (2024) có điều chỉnh. Ống nghiệm được cho vào lần lượt 50  $\mu$ L nước khử ion, 50  $\mu$ L dịch ngoại bào, 50  $\mu$ L thuốc thử Folin-Ciocalteu và lắc đều; tiếp tục thêm vào 50  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% và ủ ở 40°C, 30 phút trong bể điều nhiệt. Cuối cùng hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 765 nm. Hàm lượng TPC được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic acid (với đơn vị là mg gallic acid equivalent (GAE)/mL dịch ngoại bào).

#### Phương pháp định lượng flavonoid tổng

Flavonoid tổng (TFC) được định lượng theo mô tả của Dai et al. (2024) như sau: Lắc đều ống nghiệm chứa 1 mL dịch ngoại bào, 1 mL nước khử ion, rồi thêm vào 200  $\mu$ L NaNO<sub>2</sub> 5% để yên 5 phút, tiếp tục thêm 200  $\mu$ L AlCl<sub>3</sub> 10% và lắc đều. Sau khi ủ 6 phút, hỗn hợp phản ứng được thêm 2 mL NaOH 1 M, tiếp tục thêm nước cho đủ 5 mL. Độ hấp thụ quang phổ của phản ứng được đo ở bước sóng 510 nm. Hàm lượng TFC trong 1 mL dịch ngoại bào được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn quercetin (với đơn vị là mg quercetin equivalent (QE)/mL dịch ngoại bào).

### 2.3.3. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa in vitro

#### Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của dịch ngoại bào được thực hiện theo mô tả của Sharma and Bhat (2009) có hiệu chỉnh. Phản ứng gồm 20  $\mu$ L DPPH (nồng độ 1000  $\mu$ g/mL) phản ứng với 480  $\mu$ L dịch ngoại bào ở nhiệt độ 30°C, 30 phút trong điều kiện tối. Sau khi ủ 30 phút, độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 517 nm.

#### Khảo sát năng lực khử (Reducing power, RP)

Khả năng kháng oxy hóa được đánh giá dựa vào năng lực khử được thực hiện theo mô tả của Oyaizu (1986), có điều chỉnh; lần lượt cho vào ống eppendorf 100  $\mu$ L dịch ngoại bào, 100  $\mu$ L đệm phosphate (0,2 M, pH 6,6) và 100  $\mu$ L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1%, và ủ ở 50°C trong 20 phút. Sau khi ủ, 100  $\mu$ L

$CCl_3COOH$  10% được thêm vào hỗn hợp phản ứng và ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút; 150  $\mu L$  phân dịch sau khi ly tâm được sử dụng phản ứng với 150  $\mu L$   $FeCl_3$  0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm.

**Khảo sát khả năng kháng oxy hóa tổng (total antioxidant capacity, TAC)**

Phương pháp phosphomolybdenum theo mô tả của Prieto et al. (1999) được sử dụng để khảo sát khả năng kháng oxy hóa tổng số. Dịch ngoại bào được sử dụng là 300  $\mu L$  để phản ứng với 900  $\mu L$  dung dịch TAC trong 90 phút ở nhiệt độ 95°C. Độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 695 nm.

Ascorbic acid được sử dụng làm chất đối chứng dương và môi trường PDB được sử dụng làm đối chứng âm cho các phương pháp kháng oxy hóa nêu trên. Dựa trên phương trình đường chuẩn ascorbic acid, hàm lượng chất kháng oxy hóa có trong dịch ngoại bào được biểu diễn dưới dạng mg ascorbic acid equivalent (AAE)/mL dịch ngoại bào.

**2.3.4. Khảo sát khả năng kháng viêm in vitro**

Khả năng kháng viêm của dịch ngoại bào được xác định dựa trên sự ức chế sự biến tính protein albumin theo phương pháp của Shah et al. (2017) có hiệu chỉnh; sử dụng 150  $\mu L$  albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin, BSA) 5% phản ứng với 150  $\mu L$  dịch ngoại bào ở 27°C trong 15 phút. Protein BSA trong phản ứng bị biến tính bằng cách ủ ở 80°C trong 10 phút. Sau khi làm mát, mật độ quang của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 660 nm. Diclofenac được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Khả năng kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh được biểu diễn dưới dạng hàm lượng chất kháng viêm có trong dịch ngoại bào tương đương diclofenac (mg diclofenac equivalent (DE)/mL dịch ngoại bào).

**2.3.5. Định danh một số dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm**

Sau khi khảo sát khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, cũng như khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm, dòng vi khuẩn thể hiện hoạt tính cao

được tuyển chọn để định danh. Trình tự gene *16S rRNA* của các dòng vi khuẩn nội sinh được khuếch đại bằng phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) theo mô tả của Aravind et al. (2009). Các đoạn mồi được sử dụng cho phản ứng PCR để khuếch đại gene *16S rRNA* của các dòng vi khuẩn nội sinh là 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3). Phản ứng PCR được thực hiện ở 95°C (5 phút), 35 chu kỳ như sau: 94°C (1 phút), 53°C (1 phút), 72°C (1,5 phút) và 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR của gene *16S rRNA* được giải trình tự tại công ty MacroGen (MacroGen, Inc. Seoul, Hàn Quốc). Các so sánh BLASTN được thực hiện để chọn ra các dòng vi khuẩn có độ tương đồng cao. Cây phát sinh chủng loài của các dòng vi khuẩn nội sinh dựa vào trình tự gene *16S rRNA* được xây dựng bằng phần mềm Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.0.13 (MEGA 11.0.13).

**2.3.6. Thống kê phân tích số liệu**

Kết quả được xử lý thống kê theo phương pháp ANOVA (kiểm định Tukey's) bằng phần mềm Minitab 16.0. Số liệu được trình bày dưới dạng MEAN $\pm$ SEM.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm**

Từ rễ, thân và lá của cây cúc chi thiên mèm phân lập được 19 dòng vi khuẩn nội sinh. Trong đó có 4 dòng phân lập từ rễ chiếm 21,1%, 10 dòng phân lập từ thân chiếm 52,6% và 5 dòng phân lập từ lá chiếm 26,3%. Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm được mã hóa cụ thể như sau: EM-Rx, EM-Sx, EM-Lx với MP: *Elephantopus mollis*, R: Root (rễ), S: Stem (thân) và L: Leaf (lá). Các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập trong nghiên cứu này đều có đặc tính là sinh trưởng và phát triển trong điều kiện vi hiếu khí, khi phát triển tạo thành màng mỏng pellicle cách mặt môi trường khoảng 0,5-1 cm. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm được liệt kê và mô tả cụ thể trong Bảng 1 và Bảng 2.

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái và tế bào của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mề**

Dòng vi khuẩn	Hình dạng khuẩn lạc	Dạng bia	Độ nổi	Kích thước (mm)	Màu sắc	Hình dạng tế bào/Gram
EM-L1	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,1	Trắng sữa	Que/Âm
EM-L2	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	1,0	Trắng ngà	Que/Dương
EM-L3	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,5	Trắng sữa	Que/Dương
EM-L4	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,1	Trắng ngà	Que/Âm
EM-L5	Tròn to	Nguyên	Lài	3,0	Trắng ngà	Cầu/Dương
EM-S1	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	1,5	Trắng ngà	Que/Dương
EM-S2	Tròn to	Răng cưa	Lài	2,0	Trắng ngà	Que/Dương
EM-S3	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	1,5	Trắng sữa	Que/Dương
EM-S4	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	0,1	Trắng ngà	Que/Dương
EM-S5	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,1	Trắng đục	Que/Dương
EM-S6	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,5	Trắng sữa	Cầu/Âm
EM-S7	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	1,5	Trắng ngà	Cầu/Âm
EM-S8	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	1,5	Trắng sữa	Cầu/Dương
EM-S9	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,1	Trắng ngà	Cầu/Âm
EM-S10	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,1	Trắng đục	Que/Âm
EM-R1	Tròn nhỏ	Nguyên	Lài	1,5	Trắng ngà	Que/Âm
EM-R2	Tròn to	Nguyên	Lài	2,0	Trắng ngà	Que/Dương
EM-R3	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,5	Trắng sữa	Cầu/Dương
EM-R4	Tròn nhỏ	Nguyên	Mô	0,1	Trắng ngà	Cầu/Dương

Kết quả ở Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy, khuẩn lạc các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được đều có dạng hình tròn. Kích thước khuẩn lạc trong khoảng 0,5 mm đến 3 mm. Khuẩn lạc màu trắng ngà có 11 dòng (chiếm 57,89%), màu trắng sữa có 6 dòng (chiếm 31,58%) và trắng đục có 2 dòng (chiếm 10,53%). Tế bào vi khuẩn hình que có 12 dòng (chiếm 63,16%) và hình cầu có 7 dòng (chiếm 36,84%). Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mề có cả Gram dương (12 dòng, chiếm 63,16%) và Gram âm (7 dòng, chiếm 36,84%).

**Bảng 2. Tỷ lệ đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn nội sinh**

Chỉ tiêu	Mô tả	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn nhỏ (< 2 mm)	16	84,2
	Tròn lớn (≥ 2mm)	3	15,8
Hình dạng tế bào	Que	12	63,2
	Cầu	7	36,8
Gram	Âm	7	36,8
	Dương	12	63,2
Màu sắc	Trắng ngà	11	57,9
	Trắng đục	2	10,5
	Trắng sữa	6	31,6
Độ nổi	Mô	10	52,6
	Lài	9	47,4
Bia	Nguyên	18	94,7
	Răng cưa	1	5,3

### 3.2. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng

Polyphenol và flavonoid là những nhóm chất thiên nhiên có tác dụng tăng cường sức khỏe tiềm năng. Mối tương quan giữa việc sử dụng polyphenol, flavonoid và việc giảm các yếu tố nguy cơ mắc các bệnh mạn tính đã được chứng minh (Di Lorenzo et al., 2021). Polyphenol, flavonoid có nguồn gốc từ thực vật đã được nghiên cứu và sử dụng để bảo vệ sức khỏe con người từ rất lâu. Bên cạnh nguồn polyphenol và flavonoid có nguồn gốc từ thực vật, các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mề cũng có thể sản sinh ra polyphenol và flavonoid. Hàm lượng polyphenol và flavonoid do các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mề sản sinh ra được trình bày trong Bảng 3. Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mề có khả năng sản sinh polyphenol với hàm lượng dao động từ 12,9±0,2 đến 23,8±0,1 mg GAE/mL dịch ngoại bào và hàm lượng flavonoid dao động từ 13,9±2,8 đến 252,7±2,8 mg QE/mL dịch ngoại bào. Dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10 có khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid nhiều hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các dòng vi khuẩn còn lại.

### 3.3. Hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro*

Chất kháng oxy hóa là các hợp chất có khả năng ngăn ngừa, trì hoãn hoặc ức chế quá trình oxy hóa deoxyribonucleic acid, lipid màng và protein, do đó

bảo vệ trực tiếp tế bào khỏi tổn thương oxy hóa (Rao et al., 2021). Khả năng kháng oxy hóa của dịch ngoại bào từ các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm đã được xác định dựa trên phương pháp TAC, RP và DPPH, đây là các thử nghiệm kháng oxy hóa phổ biến đã được sử dụng rộng rãi để đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa trên nhiều đối tượng. Khả năng kháng oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm được khảo sát và trình bày trong Bảng 3.

Hoạt tính kháng oxy hóa tổng số TAC dựa trên sự khử Mo(VI) thành Mo(V), được thể hiện thông qua sự tạo phức Mo(V)-phosphate có màu xanh lá đặc trưng ở môi trường acid. Hàm lượng chất kháng oxy hóa tổng số của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập trong cây cúc chi thiên mèm khác nhau (Bảng 3), thay đổi từ 19,1±0,9 đến 358,7±17,9 mg AAE/mL dịch ngoại bào. Hàm lượng chất kháng oxy hóa TAC cao nhất ở dòng vi khuẩn EM-L1 (358,7±17,9 mg AAE/mL dịch ngoại bào) cao hơn 18,8 lần so với dòng vi khuẩn có hàm lượng chất kháng oxy hóa TAC thấp nhất là EM-S4 (19,1±0,9 mg AAE/mL dịch ngoại bào).

Năng lực khử RP thường được xem là một chỉ thị hoạt động cho điện tử và cũng là một cơ chế trong hoạt động kháng oxy hóa quan trọng. Chất kháng oxy hóa sẽ khử Fe<sup>3+</sup> trong phức K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> trở thành Fe<sup>2+</sup> trong phức K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, sau đó phức K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> sẽ tác dụng với Fe<sup>3+</sup> có trong FeCl<sub>3</sub>. Hàm lượng chất có năng lực khử của các dòng vi khuẩn khác biệt rất lớn, cụ thể dòng vi khuẩn EM-L1 có khả năng tạo ra chất có năng lực khử cao nhất là 135,4±7,0 mg AAE/mL dịch ngoại bào. Ngược lại, khả năng tạo chất có năng lực khử thấp nhất là dòng vi khuẩn EM-L2 chỉ tạo được 1,04±0,31 mg AAE/mL dịch ngoại bào, thấp hơn dòng EM-L1 130,2 lần (Bảng 3).

Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của các dòng vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu này được khảo sát (Bảng 3). Hàm lượng chất kháng oxy hóa

có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH dao động từ 20,9±1,1 AAE/mL dịch ngoại bào ở dòng vi khuẩn EM-L4 đến 38,4±1,9 mg AAE/mL dịch ngoại bào ở dòng vi khuẩn EM-L1.

Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm đã được chứng minh có khả năng tạo ra chất kháng oxy hóa, trung hòa hoặc khử được nhiều gốc tự do khác nhau. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa còn cho thấy hàm lượng chất kháng oxy hóa ở cả 3 phương pháp RP, TAC và DPPH có sự tỷ lệ thuận với hàm lượng polyphenol, flavonoid. Kết quả nghiên cứu cho thấy, dòng vi khuẩn EM-L1 có khả năng sản sinh hàm lượng chất kháng oxy hóa tổng số và hàm lượng chất có năng lực khử nhiều hơn dòng vi khuẩn MV-R3 lần lượt là 3,17 và 1,19 lần. Dòng vi khuẩn MV-R3 là dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cò sen đã được nhóm nghiên cứu phân lập và công bố (Dai et al., 2024). Như vậy, dòng vi khuẩn EM-L1 cho thấy khả năng cung cấp nguồn chất kháng oxy hóa đầy tiềm năng.

### 3.4. Hoạt tính kháng viêm *in vitro*

Viêm là phản ứng của cơ thể để chống lại nhiễm trùng và tổn thương mô. Cơ chế viêm rất quan trọng đối với chức năng của sinh vật và được kiểm soát chặt chẽ liên quan đến nhiều yếu tố. Viêm sinh lý là kết quả của sự di nhập bạch cầu đến các mô bị tổn thương để loại bỏ mầm bệnh. Tuy nhiên, khi bản chất tự giới hạn của phản ứng viêm và cơ chế kiểm soát không cân bằng, tình trạng viêm mất kiểm soát có thể dẫn đến sự phát triển của nhiều bệnh nghiêm trọng (Scotece & Conde-Aranda, 2022). Nghiên cứu đã tiến hành sàng lọc hoạt tính kháng viêm của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm thông qua phản ứng bảo vệ protein BSA khỏi sự biến tính do nhiệt. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm có khả năng sản sinh chất kháng viêm với hàm lượng dao động từ 0,40±0,01 đến 4,16±0,06 mg DE/mL dịch ngoại bào (Bảng 3).

**Bảng 3. Hàm lượng polyphenol, flavonoid, chất kháng oxy hóa và chất kháng viêm *in vitro* có trong dịch ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mèm**

Dòng vi khuẩn	Polyphenol <sup>(1)</sup>	Flavonoid <sup>(2)</sup>	DPPH <sup>(3)</sup>	RP <sup>(4)</sup>	TAC <sup>(5)</sup>	BSA <sup>(6)</sup>
EM-L1	23,7±0,1 <sup>a</sup>	252,7±2,8 <sup>a</sup>	38,4±1,9 <sup>a</sup>	135,4±7,0 <sup>a</sup>	358,7±17,9 <sup>a</sup>	4,16±0,06 <sup>a</sup>
EM-L2	19,3±0,5 <sup>de</sup>	29,6±1,8 <sup>k</sup>	32,6 ±1.6 <sup>bcd</sup>	1,0±0,3 <sup>j</sup>	42,7±2,1 <sup>kl</sup>	0,51±0,01 <sup>k</sup>
EM-L3	21,9±0,3 <sup>b</sup>	208,4±5,6 <sup>b</sup>	35,4±1,8 <sup>ab</sup>	89,8±4,7 <sup>b</sup>	296,5±14,8 <sup>b</sup>	3,60±0,06 <sup>b</sup>
EM-L4	12,9±0,2 <sup>j</sup>	97,5±2,8 <sup>h</sup>	20,9±1,1 <sup>h</sup>	45,1±2,5 <sup>zfg</sup>	139,9±7,0 <sup>e</sup>	1,61±0,07 <sup>g</sup>
EM-L5	19,1±0,1 <sup>de</sup>	75,1±1,8 <sup>i</sup>	32,1±1,6 <sup>bcd</sup>	46,9±2,6 <sup>cf</sup>	106,8±5,3 <sup>hij</sup>	1,25±0,02 <sup>hi</sup>
EM-S1	19,1±0,1 <sup>def</sup>	158,7±3,6 <sup>c</sup>	32,6±1,6 <sup>bcd</sup>	28,5±1,7 <sup>hi</sup>	222,9±11,1 <sup>cd</sup>	2,66±0,06 <sup>d</sup>
EM-S2	12,9±0,2 <sup>j</sup>	70,9±2,8 <sup>i</sup>	21,4±1,1 <sup>gh</sup>	64,2±3,5 <sup>c</sup>	99,3±5,0 <sup>j</sup>	1,12±0,01 <sup>i</sup>
EM-S3	19,7±0,2 <sup>d</sup>	27,2±2,8 <sup>k</sup>	32,1±1,6 <sup>bcd</sup>	23,7±1,4 <sup>i</sup>	38,9±1,9 <sup>kl</sup>	0,41±0,01 <sup>k</sup>
EM-S4	13,8±0,1 <sup>i</sup>	13,9±2,8 <sup>l</sup>	21,8±1.1 <sup>gh</sup>	26,8±1,6 <sup>hi</sup>	19,1±0,9 <sup>l</sup>	0,40±0,01 <sup>k</sup>

Dòng vi khuẩn	Polyphenol <sup>(1)</sup>	Flavonoid <sup>(2)</sup>	DPPH <sup>(3)</sup>	RP <sup>(4)</sup>	TAC <sup>(5)</sup>	BSA <sup>(6)</sup>
EM-S5	17,6±0,1 <sup>g</sup>	125,4±2,8 <sup>g</sup>	28,5±1,4 <sup>def</sup>	90,0±4,8 <sup>b</sup>	176,6±8,8 <sup>f</sup>	2,06±0,06 <sup>f</sup>
EM-S6	19,3±0,1 <sup>de</sup>	43,6±2,8 <sup>i</sup>	32,4±1,6 <sup>bcd</sup>	25,8±1,6 <sup>hi</sup>	59,7±3,0 <sup>k</sup>	0,70±0,01 <sup>j</sup>
EM-S7	19,5±0,4 <sup>de</sup>	169,0±3,8 <sup>d</sup>	33,1±1,7 <sup>bcd</sup>	3,48±0,43 <sup>j</sup>	237,0±11,8 <sup>c</sup>	2,76±0,02 <sup>d</sup>
EM-S8	18,7±0,08 <sup>ef</sup>	92,7±3,8 <sup>h</sup>	30,4±1,5 <sup>cdef</sup>	52,7±2,9 <sup>def</sup>	127,6±6,4 <sup>ghi</sup>	1,40±0,06 <sup>h</sup>
EM-S9	16,1±0,13 <sup>h</sup>	89,6±4,8 <sup>h</sup>	27,0±1,4 <sup>ef</sup>	54,5±3,0 <sup>cde</sup>	130,4±6,5 <sup>gh</sup>	1,57±0,03 <sup>g</sup>
EM-S10	20,6±0,24 <sup>c</sup>	194,5±3,8 <sup>c</sup>	34,5±1,7 <sup>abc</sup>	85,2±4,5 <sup>b</sup>	273,8±13,7 <sup>b</sup>	3,26±0,06 <sup>c</sup>
EM-R1	15,6±0,33 <sup>h</sup>	93,3±1,8 <sup>h</sup>	25,7±1,3 <sup>fg</sup>	35,3±1,4 <sup>gh</sup>	134,2±6,7 <sup>gh</sup>	1,59±0,01 <sup>g</sup>
EM-R2	18,3±0,80 <sup>fg</sup>	70,2±2,1 <sup>i</sup>	30,5±1,5 <sup>cde</sup>	61,6±3,3 <sup>cd</sup>	100,2±5,0 <sup>ij</sup>	1,16±0,02 <sup>i</sup>
EM-R3	18,7±0,21 <sup>ef</sup>	144,2±3,2 <sup>f</sup>	30,2±1,5 <sup>cdef</sup>	30,6±1,8 <sup>hi</sup>	204,9±10,2 <sup>de</sup>	2,43±0,02 <sup>e</sup>
EM-R4	19,0±0,35 <sup>def</sup>	134,5±3,8 <sup>fg</sup>	32,5±1,6 <sup>bcd</sup>	44,4±2,5 <sup>fg</sup>	189,9±9,5 <sup>ef</sup>	2,33±0,11 <sup>c</sup>

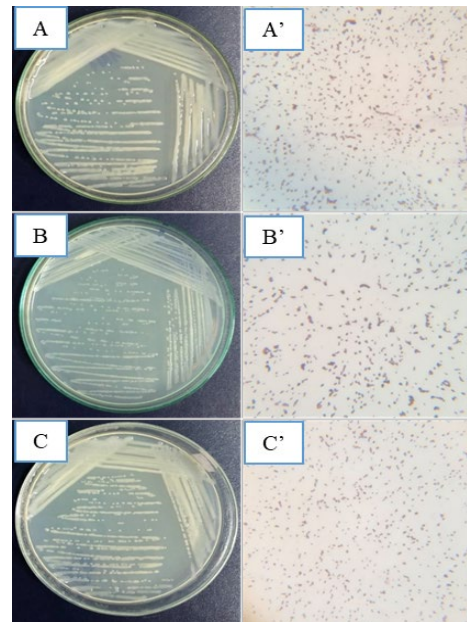
Hàm lượng polyphenol được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn gallic acid có dạng:  $y = 0,0078x + 0,0608$  ( $R^2 = 0,9972$ ), đơn vị mg GAE/mL dịch ngoại bào. (2) Hàm lượng flavonoid được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin có dạng:  $y = 0,0011x + 0,0517$  ( $R^2 = 0,9971$ ), đơn vị mg QE/mL dịch ngoại bào. (3) Hàm lượng chất có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn ascorbic acid có dạng:  $y = -0,8179 + 1,1592$  ( $R^2 = 0,9958$ ), đơn vị mg AAE/mL dịch ngoại bào. (4) Hàm lượng chất có năng lực khử được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn ascorbic acid có dạng:  $y = 0,0119x + 0,0847$  ( $R^2 = 0,9981$ ), đơn vị mg AAE/mL dịch ngoại bào. (5) Hàm lượng chất kháng oxy hóa tổng số được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn ascorbic acid có dạng:  $y = 0,0106x - 0,0024$  ( $R^2 = 0,9978$ ), đơn vị mg AAE/mL dịch ngoại bào. (6) Hàm lượng chất kháng viêm được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn diclofenac có dạng:  $y = 6,5792x - 0,0902$  ( $R^2 = 0,991$ ), đơn vị mg DE/mL dịch ngoại bào. 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 Tukey's.

**3.5. Định danh một số dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cúc chi thiên mềm**

Kết quả khảo sát cho thấy, dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10 có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, kháng oxy hóa và kháng viêm hiệu quả hơn các dòng vi khuẩn còn lại. Do đó, dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10 đã được chọn để giải trình gene *16S RNA*. Trình tự gene *16S RNA* của dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10 được so sánh với trình tự của các dòng vi khuẩn trong ngân hàng gene bằng phần mềm BLASTN của NCBI (National Center for Biotechnology Information). Kết quả định danh được trình bày trong Bảng 4 cho thấy, dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10 có mức độ tương đồng cao lần lượt với dòng vi khuẩn *Enterobacter cancerogenus* strain RCB454, *Bacillus cereus* strain SW9SE và *Enterobacter mori* strain BC1. Như vậy, dòng vi khuẩn EM-L1 và EM-S10 thuộc chi *Enterobacter*, còn dòng vi khuẩn EM-L3 thuộc chi *Bacillus*.

Đặc điểm hình thái và cây phát sinh chủng loài của dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10 lần lượt được trình bày trong Hình 2 và Hình 3. Dòng vi khuẩn EM-L1, EM-S10 được mô tả là có tế bào hình que và Gram âm phù hợp với kết quả định danh (chi *Enterobacter* có tế bào hình que, Gram âm). Dòng vi khuẩn EM-L3 được mô tả tế bào có dạng hình que, Gram dương cho thấy sự phù hợp với kết quả định danh thuộc chi *Bacillus*. Như vậy, các dòng vi khuẩn sống nội sinh trong cây cúc chi thiên mềm có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, kháng oxy

hóa và kháng viêm được định danh là *Enterobacter* sp. EM-L1, *Bacillus* sp. EM-L3 và *Enterobacter* sp. EM-S10.



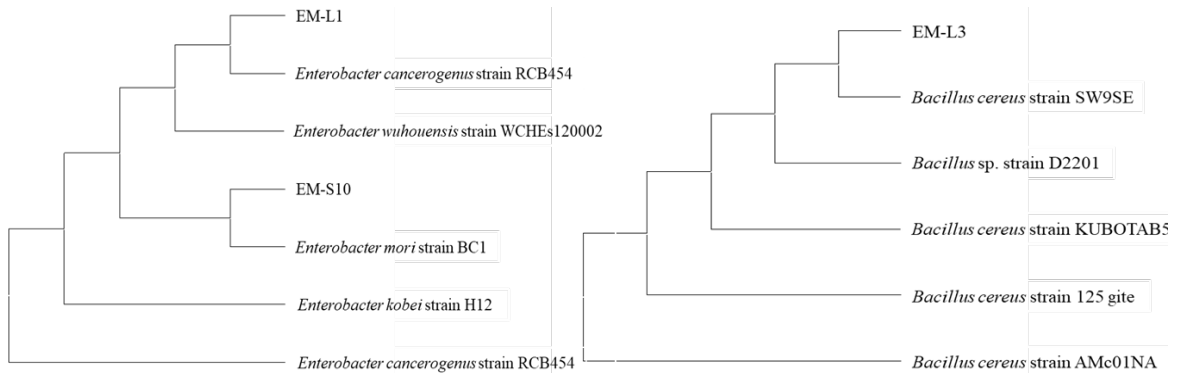
**Hình 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào của một số dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10**

A, B, C, D lần lượt là đặc điểm hình thái khuẩn lạc của dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10

A', B', C', D' lần lượt là đặc điểm hình thái tế bào của dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10 dưới kính hiển vi quang học (Olympus, Japan) ở độ phóng đại 400 lần.

**Bảng 4. Nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cóc chỉ thiên mềm**

Dòng	Loài tương đồng	Chiều dài đoạn gene	Độ phủ (%)	Mức độ tương đồng (%)	Accession number
EM-L1	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain RCB454	819	100	100	KT260666.1
EM-L3	<i>Bacillus cereus</i> strain SW9SE	1439	100	99,9	MN068934.1
EM-S10	<i>Enterobacter mori</i> strain BC1	825	100	100	MT613362.1



**Hình 3. Cây phát sinh chủng loài dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10**

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn nội sinh từ rễ, thân và lá của cây cóc chỉ thiên mềm. Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cóc chỉ thiên mềm đều có thể được nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm và sản sinh polyphenol và flavonoid. Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cóc chỉ thiên mềm có khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm. Trong đó, dòng vi khuẩn EM-L1, EM-L3 và EM-S10 cho thấy khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, hàm lượng chất kháng oxy hóa và kháng viêm vượt trội hơn các dòng vi khuẩn còn lại. Các dòng vi khuẩn được định danh là *Enterobacter* sp.

EM-L1, *Bacillus* sp. EM-L3 và *Enterobacter* sp. S10. Nghiên cứu này nhằm định hướng thêm nguồn các hợp chất tự nhiên từ vi khuẩn nội sinh thực vật có khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm tiềm năng, ứng dụng để bảo vệ sức khỏe con người bên cạnh nguồn hợp chất từ thực vật đang được sử dụng phổ biến hiện nay.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi nguồn kinh phí từ Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam. Đề tài nghiên cứu mã số B2023-TCT-02.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17, 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>.
- Aravind, R., Kumar, A., Eapen, S. J., & Ramana, K. V. (2009). Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: Isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(1), 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02486.x>
- Dai, T. T. X., Chau, T. T., Truong, T. P. T., Tran L. C., & Nguyen N. T. K. (2024). Isolating *Miliusa velutina* endophytic bacteria to generate antioxidants and optimizing culture conditions for antioxidant production, *South African Journal of Botany*, 166, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.01.052>
- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., & Restani, P. (2021). Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 13, 273. <https://doi.org/10.3390/nu13010273>.
- Han, Q., Q., & Yu, J. (2014). Inflammation: a mechanism of depression? *Neuroscience Bulletin*, 30(3), 515–523, 2014. DOI: 10.1007/s12264-013-1439-3
- He, L., Zhang, J., Zhao, J., Ma, N., Kim, S. W., Qiao, S., & Ma, X. (2018). Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress, *Advances in Nutrition*, 9(4), 493–504.
- Hộ, P. H. (2000). *Cây cỏ Việt Nam*. Nhà xuất bản Trê.
- Matsuda, M., Huh, Y., & Ji, R. R. (2019). Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and



- neuroinflammation in pain, *Journal of Anesthesia*, 33(1), 131-139. DOI: 10.1007/s00540-018-2579-4
- Ngoc, T. T. B., Nga, N. T. H., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., Thao, D. T. P. (2020). *Elephantopus mollis* Kunth extracts induce antiproliferation and apoptosis in human lung cancer and myeloid leukemia cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 263, 113222. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113222
- Ogbe, A. A., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2020). The role of endophytes in secondary metabolites accumulation in medicinal plants under abiotic stress, *South African Journal of Botany*, 134, 126-134. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.06.023.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315. <http://dx.doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Patle, P. N., Navnage, N. P., & Ramteke, P. R. (2018). Endophytes in plant system: Roles in growth promotion, mechanism and their potentiality in achieving agriculture sustainability, *International Journal of Chemical Studies*, 6(1), 270-274. <https://www.chemjournal.com/archives/2018/vol6issue1/PartD/5-6-239-675.pdf>
- Phuc, N. T. H., Dat, P. T., Nhien, N. T. T., Hang, P. T., & Khang, D. T. (2020). Acute toxicity, antibacterial and antioxidant abilities of *Elephantopus mollis* H.B.K. and *Elephantopus scaber* L. *Can Tho University Journal of Science*. 12(2), 9-14.
- Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: Specific application for the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- Pyne, M. E., Narcross, L., & Martin, V. J. (2019). Engineering plant secondary metabolism in microbial systems, *Plant Physiology*, 179 (3), 844-861. DOI: 10.1104/pp.18.01291
- Rao, M. J., Wu, S., Duan, M., & Wang, L. (2021). Antioxidant metabolites in primitive, wild, and cultivated citrus and their role in stress tolerance, *Molecules*, 26(19), 5801. DOI: 10.3390/molecules26195801
- Scarian, E., Viola, C, Dragoni, F., Di Gerlando, R., Rizzo, B., Diamanti, L., Gagliardi, S., Bordoni, M., & Pansarasa, O. (2024). New Insights into Oxidative Stress and Inflammatory Response in Neurodegenerative Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (5), 2698. <https://doi.org/10.3390/ijms25052698>
- Scotece, M., & Conde-Aranda, J. (2022). Inflammation in health and disease: New insights and therapeutic avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8392. DOI: 10.3390/ijms23158392
- Shah, M., Parveen, Z., & Khan, M. R. (2017). Evaluation of antioxidant, antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of the stem bark of *Sapindus mukorossi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17 (1), 526-532. DOI: 10.1186/s12906-017-2042-3
- Sharma, O. P. & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113 (4), 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- Tam, T. D. T, Ngoc, T. T. B., Nga, N. T. H., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., & Thao, D. T. P. (2021). Ethyl acetate extract of *Elephantopus mollis* Kunth induces apoptosis in human gastric cancer cells, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 273. DOI: 10.1186/s12906-021-03444-6
- Thanh, N. Q. C., Toan P. D., Tuan N. T., & Giao, D. H. (2022). Khảo sát cơ chế kháng viêm của cao chiết ethanol củ chi thiên mêm (*Elephantopus mollis*) trên mô hình đại thực bào RAW264.7, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 58(2), 163-168. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.133>
- Vona, R., Pallotta, L., Cappelletti, M., Severi, C., & Matarrese, P. (2021). The Impact of oxidative stress in human pathology: focus on gastrointestinal disorders, *Antioxidants*, 10 (2), 201. <https://doi.org/10.3390/antiox10020201>
- Wu, C. D., Fan, Y. B., Chen, X., Cao, J. W., Ye, J. Y., Feng, M. L., Liu, X. X., Sun, W. J., Liu, R. N., & Wang, A. Y. (2024). Analysis of endophytic bacterial diversity in seeds of different genotypes of cotton and the suppression of *Verticillium* wilt pathogen infection by a synthetic microbial community, *BMC Plant Biology*, 24(1), 263. DOI: 10.1186/s12870-024-04910-2