

NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY *IN VITRO* NGUỒN NGUYÊN LIỆU CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA CÂY THỎ TAM THẮT (*GYNURA PSEUDOCHINA* (L) DC)

Vũ Thị Bạch Phượng*, Quách Ngô Diễm Phương, Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Thỏ tam thất (*Gynurapseudo-china* (L) DC) hay còn có tên gọi khác như Nam bạch truật, Kim thất giả, Bàu đất dạn, Có tàu bay, Ngải rì là cây thuốc của Việt Nam. Tất cả các bộ phận của cây Thỏ tam thất đều được dùng để chữa bệnh. Tuy nhiên, hiệu quả chữa bệnh của cây Thỏ tam thất chỉ được truyền miệng trong dân gian mà chưa có tài liệu khoa học nào công bố về hoạt tính sinh học cụ thể của cây. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp thử năng lực khử của Yen và Duh (1993) của các bộ phận rễ, thân, lá, củ trong cây Thỏ tam thất *in vitro*. Kết quả cho thấy rễ *in vitro* của cây Thỏ tam thất có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất và có $IC_{50} = 1,003$ mg/ml khi định lượng hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH. Trong rễ *in vitro* được chứng minh chứa chủ yếu nhóm hợp chất saponin và flavonoid. Trong đó, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết saponin rễ *in vitro* ($IC_{50} = 0,446$ mg/ml) lớn hơn của cao chiết flavonoid rễ *in vitro* ($IC_{50} = 3,649$ mg/ml). Các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho việc tăng sinh khối rễ *in vitro* Thỏ tam thất cũng đã được khảo sát trong nghiên cứu này.

Từ khóa: Thỏ tam thất (*Gynurapseudo-china* (L) DC), hoạt tính kháng oxy hóa, DPPH

MỞ ĐẦU

Gốc tự do đóng một vai trò quan trọng trong sự phát sinh bệnh và lão hóa của con người vì chúng có khả năng tấn công các tế bào khỏe mạnh của cơ thể, và làm mất đi cấu trúc và chức năng của các tế bào. Chất chống oxy hóa là chất có khả năng ức chế hoặc ngăn chặn một cách hiệu quả quá trình oxy hóa của các gốc tự do. Do đó, việc nghiên cứu và sản xuất ra một lượng lớn các hợp chất chống oxy hóa đang là vấn đề được nhiều người chú ý. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy các chất chống oxy hóa tổng hợp có thể gây hại cho cơ thể con người. Vì vậy, việc nghiên cứu các hợp chất chống oxy hóa có nguồn gốc từ tự nhiên đang là mối quan tâm của nhiều nhà khoa học.

Thỏ tam thất có tên khoa học là *Gynura Pseudochina* (L) DC, thuộc họ Cúc (Asteraceae), cây thảo mọc đứng, rễ củ có hình dạng giống như củ Tam thất. Cây được dùng làm dược liệu ở nhiều nước như: Ấn Độ, Indonesia, Thái Lan, Trung Quốc, Việt Nam. Tất cả các bộ phận của Thỏ tam thất đều được dùng làm thuốc chữa các bệnh như viêm quầng, làm dịu đau, tan sưng, tiêu viêm các vết thương. Trong dân gian, lá được giã nát đắp trên các mụn nhọt để làm tan sưng và trị viêm quầng, dịch lá dùng làm thuốc súc miệng trị viêm họng. Củ được cắt lát mỏng, phơi hay sấy khô làm thuốc sắc uống. Và Thỏ tam thất cũng được dùng làm thuốc bổ trong điều hòa khí huyết, nhất là cho phụ nữ sinh nở. Ngoài ra, Thỏ tam thất còn được sử dụng như là một loại rau để ăn và làm cây cảnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung khảo sát và sàng lọc những bộ phận có hoạt tính kháng oxy hóa cao của cây Thỏ tam thất *in vitro* nhằm chủ động tạo ra nguồn nguyên liệu có hoạt tính kháng oxy hóa với khối lượng lớn như mong muốn.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Cây Thỏ tam thất (*Gynura pseudochina*) trồng ngoài tự nhiên được thu hái ở huyện Hóc Môn, thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp

Tạo nguồn nguyên liệu *in vitro* cây Thỏ tam thất

Đốt thân Thỏ tam thất ngoài tự nhiên được khử trùng bằng dung dịch calcium hypochlorite $Ca(OCl)_2$ 3% trong 10 phút, được nhân thành cụm chồi trên môi trường MS bổ sung BA (3mg/l) và tạo củ *in vitro* bằng môi trường MS bổ sung 7% sucrose kết hợp BA (2mg/l).

Sàng lọc nguồn vật liệu có hoạt tính kháng oxy hóa

So sánh hoạt tính kháng oxy hóa của các loại cao ethanol đã điều chế từ các bộ phận khác nhau bằng phương pháp thử năng lực khử của Yen và Duh (1993): Cao ethanol tổng của các bộ phận rễ, thân, lá, củ được điều chế theo phương pháp ngâm dầm, và được đem đi xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp thử năng lực khử của Yen và Duh (1993) [4] theo quy trình sau: 1ml chất thử nghiệm, 2,5ml dung dịch đệm sodium phosphate 0,2M pH 6,6, lắc đều, thêm 2,5ml dung dịch potassium ferricyanide 1%. Hỗn hợp phản ứng được ổn định ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 20 phút. Sau đó, thêm vào hỗn hợp phản ứng 2,5ml acid trichloroacetic 10%, lắc đều, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ kết tủa, thu lấy dịch nổi. Lấy 1ml dịch nổi, thêm 2ml nước cất và 0,5ml dung dịch $FeCl_3$ 1%, lắc đều, để yên trong 5 phút. Sau cùng, đo độ hấp thụ ở bước sóng 700nm. Độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 700nm càng cao thể hiện năng lực khử của dung dịch thử nghiệm càng cao. So sánh năng lực khử giữa các mẫu cao để chọn mẫu có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất.

Đánh giá sự hiện diện của nhóm hợp chất thứ cấp chính trong nguồn nguyên liệu có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất:

Alkaloid: Nhỏ vài giọt thuốc thử Wagner vào dung dịch acid loãng có chứa alkaloid, nếu có alkaloid sẽ xuất hiện tủa vàng nâu. Trong đó, thuốc thử Wagner gồm 1,27g I₂, 2g KI trong 20ml nước cất, hòa trộn cho đủ trong 100ml bằng nước cất.

Alinon, coumarin: Phun xit lên băng sắc ký bản mỏng dung dịch 5% KOH trong methanol và sấy bán 5 phút ở 90°C. Các quinon, coumarin cho vết có màu đỏ, tím hoặc xanh lục.

Anthraquinon: Đun khô cao trong cốc có đáy một tấm thủy tinh. nếu có tinh thể bám trên tấm thủy tinh (do thăng hoa) thì đó là anthraquinon.

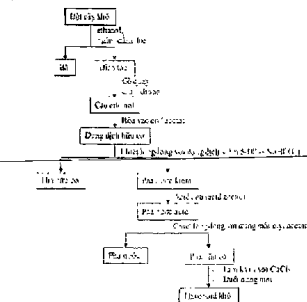
Saponin: Hòa tảo vào 5ml cồn 25% trên bếp cách thủy, lọc vào ống nghiệm. Thêm 5 ml nước và lắc mạnh theo chiều dọc ống. Nếu có bọt bền là có saponin.

Tanin: Phản ứng dương tính có tanin khi xuất hiện trầm hiện màu đỏ với thuốc thử Stasny (Formol 36% (20ml), HCl đậm đặc (10ml)).

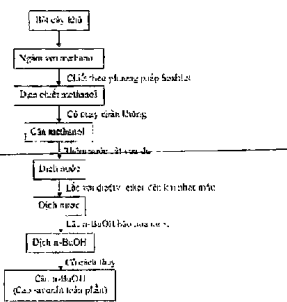
Flavonoid: Hòa tan chất cần thử nghiệm trong H₂SO₄ đậm đặc; hợp chất flavonol cho màu vàng đậm đến màu cam và có phát huỳnh quang đặc biệt; Chalcon, auron cho màu đỏ hoặc xanh dương – đỏ; Flavanon cho màu từ cam đến đỏ.

Thu nhận và sàng lọc (bằng hoạt tính kháng oxy hóa) cao tổng của nhóm hợp chất chính để xác định:

Cao của nhóm hoạt chất chính đã định tính có trong rễ *in vitro* được thu nhận theo sơ đồ ở Hình 1 và 2. Sàng lọc cao có hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn bằng phương pháp DPPH: cao được pha thành các nồng độ khác nhau, hỗn hợp phản ứng gồm 0,5ml mẫu thử, 3ml ethanol, 0,5ml DPPH, lắc hỗn hợp trong 15 giây, để tối ở nhiệt độ phòng 30 phút. Đo mật độ quang ở bước sóng 517 nm. Nồng độ IC₅₀ được nội suy từ đồ thị biến thiên của hoạt tính chống oxy hóa so với nồng độ chất thử nghiệm, IC₅₀ càng thấp chứng tỏ hoạt tính kháng oxy càng cao. Trong đó, hoạt tính chống oxy hóa (%) (HTCO %) = $\frac{(OD_{chứng} - OD_{thử})}{OD_{chứng}}$.



Hình 1. Sơ đồ quy trình tách chiết cao flavonoid



Hình 2. Sơ đồ quy trình tách chiết cao saponin toàn phần

Khảo sát điều kiện tăng sinh khối rễ trong nuôi cấy *in vitro*

Tăng sinh rễ cây con *in vitro*: Đốt thân của cây con *in vitro* 1 tháng tuổi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung NAA (1; 1,5; 2; 2,5; 3 mg/l) kết hợp với sucrose (3; 5; 7%). Sau 4 tháng, quan sát và ghi nhận kết quả về chiều dài rễ (cm) và khối lượng rễ (g) tạo thành.

Tăng sinh rễ bất định *in vitro*: Các mẫu lá, lông thân được cắt thành lát mỏng (theo chiều ngang của cây) khoảng 2-3mm và đặt trên môi trường MS bổ sung NAA (0, 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 mg/l). Sau 4 tuần, theo dõi và ghi nhận tỉ lệ tạo rễ của mẫu (%) và khối lượng rễ (mg) tạo thành.

Khảo sát điều kiện thích hợp trong nuôi cấy rễ độc lập nhằm hướng đến việc nhân sinh khối rễ ở quy mô lớn: Rễ bất định *in vitro* được cắm ứng từ lá trên môi trường MS bổ sung 2mg/l NAA. Quan sát sau 3 tuần nuôi cấy, rễ (1,5g) được nuôi trong bình thủy tinh có cùng thể tích chứa môi trường MS bổ sung 0,5 mg/ml NAA với các điều kiện thay đổi như sau:

- Chứa 50ml môi trường lỏng tinh
- Chứa 50ml môi trường lỏng tinh có sục khí
- Chứa 50ml môi trường lỏng lắc ở 120 vòng/phút
- Chứa 50ml môi trường rắn có bổ sung 8g agar/l môi trường.
- Chứa 15ml môi trường lỏng tinh và cứ sau 1 tuần thay 15 ml môi trường mới một lần

Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng chương trình SPSS 16.0 (Copyright SPSS Inc.) với độ tin cậy là 95%. Biểu đồ, đồ thị được vẽ bằng chương trình Microsoft Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo nguồn nguyên liệu *in vitro* cây Thổ tam thất

Cụm chồi được cảm ứng tạo thành trên môi trường MS bổ sung 3mg/l BA (Hình 3A). Chồi con phát triển trên môi trường MS sau 4 tuần có thể phát triển đầy đủ các bộ phận lá, thân, rễ mà không cần bổ sung bất kì chất điều hòa tăng trưởng thực vật nào. Sự tạo củ *in vitro* được tạo thành trên môi trường MS bổ sung 7% sucrose kết hợp 2mg/l BA (Hình 3B).



Hình 3: Sự hình thành cụm chồi *in vitro* (Hình A), củ *in vitro* (B)

Sàng lọc nguồn vật liệu có hoạt tính kháng oxy hóa

So sánh hoạt tính kháng oxy hóa của các loại cao ethanol đã điều chế từ các bộ phận khác nhau bằng phương pháp thử năng lực khử của Yen và Duh (1993)

Bảng 1. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các loại cao ethanol

Loại dịch chiết	Kí hiệu	Kết quả đo OD (700nm)	
Vitamin E (Chứng dương)	VII E	2,459 ± 0,030 ^a	
Ethanol (Chứng âm)	ĐC	0,000 ± 0,000 ^a	
(5mg/ml)	Là <i>in vitro</i>	Li	0,283 ± 0,008 ^b
	Thân <i>in vitro</i>	Ti	0,268 ± 0,008 ^b
	Rễ <i>in vitro</i>	Ri	0,367 ± 0,007 ^b
	Củ <i>in vitro</i>	Ci	0,248 ± 0,010 ^{a,b}



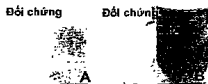
Hình 4. Kết quả thử năng lực khử theo phương pháp Yen and Duh của các loại cao ethanol.

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy, cao rễ *in vitro* là nguồn nguyên liệu có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất nên rễ *in vitro* được chọn để tiếp tục khảo sát ở các thí nghiệm tiếp theo.

Định tính sự hiện diện của nhóm hợp chất thứ cấp chính trong nguồn nguyên liệu có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất

Bảng 2. Kết quả định tính sự hiện diện của một số nhóm hợp chất thứ cấp trong cao ethanol rễ *in vitro*

Nhóm hợp chất	Kết quả
Saponin	+
Flavonoid	+
Anthraquinon	-
Tanin	-
Alkanoïd	-
Quinon, Coumann	-



Hình 5. Kết quả định tính saponin dương tính (A) và flavonoid dương tính (B).

Kết quả thí nghiệm ở Bảng 2 cho thấy, trong rễ *in vitro* Thổ tam thất, chỉ có saponin và flavonoid là cho kết quả dương tính rõ ràng. Các phản ứng định tính còn lại không có dấu hiệu dương tính.

Thu nhận và sàng lọc (bảng hoạt tính kháng oxy hóa) cao tổng của nhóm hợp chất chính đã xác định

Bảng 3. Kết quả định lượng hoạt tính kháng oxy hóa của cao saponin và cao flavonoid rễ *in vitro* bằng phương pháp DPPH

Cao ethanol rễ <i>in vitro</i>			Cao saponin rễ <i>in vitro</i>			Cao flavonoid rễ <i>in vitro</i>		
Nồng độ (mg/ml)	OD trung bình (517 nm)	HTCO (%)	Nồng độ (mg/ml)	OD trung bình (517 nm)	HTCO (%)	Nồng độ (mg/ml)	OD trung bình (517 nm)	HTCO (%)
0,0	0,611 ± 0,006 ^a	0	0,0	0,614 ± 0,021 ^a	0	0,0	0,656 ± 0,007 ^a	0
0,3	0,506 ± 0,016 ^b	17,185	0,1	0,531 ± 0,039 ^{a,b}	13,518	0,4	0,621 ± 0,007 ^a	5,335
0,6	0,428 ± 0,023 ^b	29,951	0,2	0,469 ± 0,034 ^b	23,616	0,8	0,562 ± 0,007 ^b	14,330
0,9	0,274 ± 0,020 ^b	55,155	0,3	0,440 ± 0,049 ^{b,c}	28,339	1,2	0,535 ± 0,003 ^b	18,445
1,2	0,222 ± 0,005 ^b	63,666	0,4	0,338 ± 0,023 ^{b,c}	44,951	1,6	0,520 ± 0,010 ^b	20,732
1,5	0,220 ± 0,006 ^b	63,993	0,5	0,256 ± 0,029 ^c	58,306	2,0	0,475 ± 0,007 ^b	27,591
IC ₅₀ = 1,003 (mg/ml)			IC ₅₀ = 0,446 (mg/ml)			IC ₅₀ = 3,649 (mg/ml)		

Cao saponin và flavonoid sau khi được tách chiết từ rễ *in vitro* theo các quy trình đã trình bày ở Hình 1 và Hình 2 được mang đi định lượng hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH so với cao ethanol tổng. Giá trị IC₅₀ được nội suy từ phương trình tuyến tính của hoạt tính chống oxy hóa và nồng độ chất thử nghiệm được tổng kết trong Bảng 3. Kết quả cho thấy đối với rễ *in vitro* của cây Thổ tam thất, nhóm hợp chất saponin đóng vai trò quan trọng quyết định nên hoạt tính kháng oxy hóa của chúng.

Khảo sát điều kiện tăng sinh khối rễ trong nuôi cấy *in vitro*

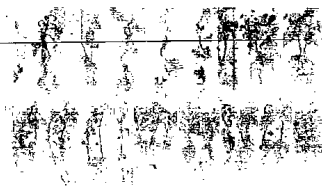
Tăng sinh rễ cây con in vitro

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của NAA và đường sucrose lên sự tạo rễ của đốt thân *in vitro* sau 4 tháng nuôi cấy được trình bày trong Bảng 4 và Hình 6.

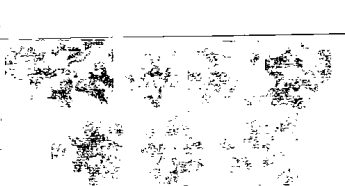
Bảng 4. Khảo sát ảnh hưởng của NAA và đường sucrose lên sự tạo rễ cây con *in vitro* từ mẫu đốt thân

Nghiệm thức	Môi trường	Khối lượng rễ (g)	Chiều dài rễ (cm)
R0	0 mg/l NAA	0,839 ± 0,968 ^a	4,067 ± 0,296 ^a
R1	1,0 mg/l NAA	2,167 ± 0,145 ^{bc}	12,767 ± 0,555 ^a
R2	1,5 mg/l NAA	3,267 ± 0,176 ^b	8,433 ± 0,448 ^b
R3	2,0 mg/l NAA	3,533 ± 0,088 ^b	6,733 ± 0,273 ^{def}
R4	2,5 mg/l NAA	2,533 ± 0,089 ^{cd}	6,167 ± 0,176 ^{cd}
R5	3,0 mg/l NAA	2,433 ± 0,088 ^{cd}	5,567 ± 0,176 ^{def}
R6	0 mg/l NAA	0,867 ± 0,145 ^a	5,000 ± 0,265 ^{ab}
R7	1,0 mg/l NAA	2,667 ± 0,120 ^{cd}	6,633 ± 0,260 ^{def}
R8	1,5 mg/l NAA	2,567 ± 0,176 ^{cd}	5,067 ± 0,318 ^{abc}
R9	2,0 mg/l NAA	2,367 ± 0,176 ^{bc}	6,933 ± 0,240 ^b
R10	2,5 mg/l NAA	2,033 ± 0,120 ^b	7,533 ± 0,376 ^{gh}
R11	3,0 mg/l NAA	2,233 ± 0,145 ^{bc}	5,233 ± 0,233 ^{bc}
R12	0 mg/l NAA	1,000 ± 0,153 ^a	5,833 ± 0,176 ^{cd}
R13	1,0 mg/l NAA	2,833 ± 0,120 ^d	7,267 ± 0,433 ^b
R14	1,5 mg/l NAA	2,667 ± 0,088 ^{cd}	5,767 ± 0,376 ^{cd}
R15	2,0 mg/l NAA	2,733 ± 0,166 ^d	5,967 ± 0,406 ^{cd}
R16	2,5 mg/l NAA	2,867 ± 0,145 ^d	6,067 ± 0,523 ^{cd}
R17	3,0 mg/l NAA	2,533 ± 0,145 ^{cd}	6,167 ± 0,203 ^{cd}

Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%



Hình 6. Ảnh hưởng của NAA và đường sucrose lên sự tạo rễ của đốt thân *in vitro*



Hình 7. Ảnh hưởng của NAA lên sự tạo rễ bất định của lớp màng lá *in vitro*

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy, đường sucrose khi ở nồng độ cao sẽ hạn chế cảm ứng tạo rễ; có lẽ lúc này lượng cacbon hữu cơ (đường sucrose) dư trong môi trường có xu hướng tích lũy tạo tinh bột và kích thích sự tạo củ hơn là phát triển tạo rễ. Khi NAA vượt quá nồng độ thích hợp, NAA càng cao thì khối lượng rễ tạo thành càng giảm và chiều dài rễ cũng giảm. Do vậy, môi trường tối ưu cho sự tạo sinh khối rễ trong loạt các nghiệm thức ở thí nghiệm này là môi trường MS bổ sung 2mg/l NAA (nghiệm thức R3).

Tăng sinh rễ bất định *in vitro*

Sau 4 tuần quan sát sự tạo rễ ở lớp màng lá, kết quả được trình bày ở Bảng 5 và Hình 7.

Bảng 5. Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của NAA lên sự tạo rễ bất định của lớp màng lá

Nghiệm thức	Môi trường	Tỉ lệ tạo rễ (%)	Khối lượng rễ/mẫu (mg)
N1	MS	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0
N2	MS + 0,5 mg/l NAA	100,0 ± 0,0 ^d	19,7 ± 4,6
N3	MS + 1,0 mg/l NAA	100,0 ± 0,0 ^d	21,9 ± 2,8
N4	MS + 1,5 mg/l NAA	100,0 ± 0,0 ^d	26,4 ± 4,0
N5	MS + 2,0 mg/l NAA	100,0 ± 0,0 ^d	42,9 ± 1,0
N6	MS + 2,5 mg/l NAA	86,7 ± 3,3 ^c	31,5 ± 2,0
N7	MS + 3,0 mg/l NAA	33,3 ± 3,3 ^b	12,2 ± 2,3

Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi tăng nồng độ NAA từ 0,5 mg/l đến 2 mg/l thì khối lượng rễ tạo thành tăng. Tuy nhiên, tiếp tục tăng nồng độ NAA từ 2mg/l đến 3mg/l thì khối lượng rễ tạo thành giảm. Kết quả này cho thấy, nồng độ 2mg/l NAA là ngưỡng giới hạn về nồng độ cho sự tạo rễ bất định ở lớp màng lá của cây Thổ tam thất. Tại ngưỡng giới hạn

2mg/l NAA này, khối lượng rễ đạt giá trị cao nhất (42,9 mg) (nghiệm thức N5). Đối với mẫu lát mỏng lóng thân, sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường NAA (0,5 - 3 mg/l), tất cả các mẫu đều tạo sẹo, không tạo rễ. Vậy trong thí nghiệm này, dưới tác động của NAA (2mg/l), lá là nguồn vật liệu thích hợp cho cảm ứng tạo rễ bất định.

Khảo sát điều kiện thích hợp trong nuôi cấy rễ độc lập nhằm hướng đến việc nhân sinh khối rễ ở quy mô lớn

Bảng 6. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy khác nhau lên sự tăng sinh khối rễ bất định *in vitro*

Nghiệm thức	Điều kiện nuôi cấy rễ bất định <i>in vitro</i>	Δ sinh khối rễ (g)
A	Lồng sục khí (50ml môi trường)	0,933 ± 0,145 ^a
B	Lồng lắc (120 vòng/phút) (50ml môi trường)	0,800 ± 0,173 ^a
C	Lồng tĩnh (50ml môi trường)	0,633 ± 0,120 ^a
D	Lồng tĩnh 1 tuần thay môi trường 1 lần (15ml môi trường)	8,733 ± 0,410^b
E	Môi trường rắn (bổ sung 8g/l agar) (50ml môi trường)	5,567 ± 0,406 ^b

Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.



Hình 8. Rễ bất định *in vitro* được nuôi cấy độc lập ở các điều kiện khác nhau. A: lồng sục khí. B: lồng tĩnh. C: lồng lắc. D: lồng thay môi trường mỗi tuần. E: rắn (agar).

Kết quả ở Bảng 6 cho thấy, ở điều kiện nuôi cấy lồng tĩnh, lồng sục khí và lồng lắc rễ không phát triển. Điều này có thể là do rễ bị ngập chìm trong môi trường lỏng nên lượng oxy không đáp ứng đủ để nhu cầu cho rễ. Ở môi trường rắn (agar), rễ sống và phát triển (Δ sinh khối rễ = 5,567g), nhưng chậm hơn so với điều kiện nuôi cấy lồng ở thể tích ít và thay môi trường mỗi tuần ở nghiệm thức D (Δ sinh khối rễ = 8,733 g) (Hình 8). Mặc dù trên môi trường rắn, rễ có thể tiếp xúc với không khí nhưng do agar làm hạn chế sự tiếp xúc của rễ với môi trường nên sự phát triển của rễ chậm hơn so với môi trường lỏng ở nghiệm thức D. Ở nghiệm thức D này, rễ vừa có thể tiếp xúc với không khí (thu nhận oxy) và vừa có thể hấp thu dinh dưỡng của môi trường lỏng một cách tốt nhất.

Thẩm định hoạt tính kháng oxy hóa của rễ nuôi cấy *in vitro* và nguồn nguyên liệu ngoài tự nhiên

Kết quả xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp Yen và Duh của, rễ cây con *in vitro*, rễ bất định *in vitro*, rễ ngoài tự nhiên, lá ngoài tự nhiên của cây Thổ tam thất được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả xác định hoạt tính kháng oxy hóa của các mẫu

Loại dịch chiết	Kết quả đo OD (700nm)
Ethanol (Chứng âm)	0,000 ± 0,000
Vitamin E (Chứng dương)	1,302 ± 0,030
Rễ bất định <i>in vitro</i>	0,263 ± 0,010
Rễ cây con <i>in vitro</i>	0,365 ± 0,013
Rễ ngoài tự nhiên	0,224 ± 0,008
Lá ngoài tự nhiên	0,177 ± 0,005

Kết quả cho thấy, hoạt tính kháng oxy hóa của cả rễ cây con *in vitro* và rễ bất định *in vitro* được tạo ra trong phòng thí nghiệm đều có hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn hẳn so với rễ và lá ngoài tự nhiên mà người dân thường hay sử dụng. Điều này càng chứng minh thêm ưu điểm của việc nghiên cứu nuôi cấy rễ *in vitro* so với việc trồng và thu hái lá ngoài tự nhiên của cây Thổ tam thất, đó là có thể chủ động tạo ra một lượng rễ lớn trong thời gian ngắn và nguồn rễ này lại còn có hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn hẳn các bộ phận khác của cây. Do vậy, việc nuôi cấy *in vitro* rễ Thổ tam thất là một hướng nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng và cần được khai thác.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được rễ *in vitro* của cây Thổ tam thất có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất và trong rễ *in vitro* có chứa nhóm hợp chất saponin và flavonoid, đồng thời xác định được NAA 2mg/l thích hợp cho sự tạo rễ ở cây Thổ tam thất. Rễ *in vitro* độc lập được phát triển tốt trong điều kiện lồng tĩnh với thể tích môi trường thích hợp và được thay mỗi tuần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Molyneux P. (2004). The use of the Stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. *Songklanakorn Journal of Science and Technology*, 26 (2), pp. 211-219.
- Nguyễn Kim Phi Phụng. (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP.HCM.
- R.H.M.J. Lemmens, L.P.A. Oyen (2004) *Plant resources of tropical Africa 2*, Prota foundation/ Backhuys Publishers/CTA, Wageningen, Netherlands.
- Yen G.C. and Duh P.D. (1993). *Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls*, Journal of the American Oil Chemists' Society, 70 (4), pp. 383-386, DOI: 10.1007/bf02552711.
- Zuofa Zhang, Jie jin, Liangen Shi (2008). *Antioxidant activities of the derivatives of polysaccharide extracted from a Chinese medicinal herb (Ramulus mori)*, Food Sci. Technol. Res., vol. 14, pp 160-168.

STUDY ON *IN VITRO* CULTURE OF *GYNURA PSEUDOCHINA* (L.) DC. FOR ANTIOXIDANT MATERIAL PRODUCTION

Vu Thi Bach Phuong*, Quach Ngo Diem Phuong, Bui Van Le
 University of Science, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Gynura pseudochina (L.) DC is the medicinal plant in Vietnam. The whole parts of plant are used in treatment. However, there has not been any published scientific material on its biological activities. In this study, the antioxidant activity of *Gynura pseudochina in vitro* is determined by Yen and Duh's method (1993) and DPPH. The results show that the highest antioxidant is obtained from *in vitro* root with $IC_{50} = 1.003$ mg/ml in comparison with other parts of plant. Root contains saponin and flavonoid, particularly, the antioxidant activity in saponin extracts ($IC_{50} = 0.446$ mg / ml) is greater than in flavonoid extracts ($IC_{50} = 3.649$ mg/ml). The optimal condition to increase root biomass is studied in this research.

Keyword: *Gynurapseudo-china* (L.) DC, antioxidant activity, DPPH

* Author for correspondence: Tel: 01693807950; Email: vtphuong@hcmus.edu.vn