NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN, TRUNG HÒA VIRUS EV71 CỦA THUỐC NƯỚC CHỨA TINH CHẤT LÁ TRẦU (*PIPER BETLE* L.)

Nguyễn Thị Thanh Thảo, Vũ Thị Quế Hương**, Đỗ Thị Hồng Tươi**, Nguyễn Phương Dung****

TÓM TẮT

***Tình hình và mục tiêu nghiên cứu**: Trầu (Piper betle L., họ Hồ tiêu - Piperaceae) phân bố rộng rãi ở Việt Nam, Ấn Độ, Trung Quốc, Srilanka, Thái Lan và nhiều quốc gia Đông Nam Á khác. Lá Trầu đã được sử dụng trong y học cổ truyền Việt Nam để ngăn ngừa bệnh lý răng miệng. Với mục đích tìm kiếm một chế phẩm thảo dược giúp ngăn ngừa lây lan bệnh Tay chân miệng (TCM), chúng tôi tiến hành khảo sát tác kháng virus EV71 của thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK). Đồng thời, tác dụng ức chế vi khuẩn Staphylococcus aureus (MSSA và MRSA), Pseudomonas aeruginosa và Escherichia coli của chế phẩm này cũng được đánh giá.*

***Phương tiện và phương pháp:** Khảo sát khả năng trung hòa virus theo quy trình nuôi cấy tế bào và kháng thể trung hòa của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), thực hiện tại Viện Pasteur Tp. Hồ Chí Minh. Áp dụng phương pháp pha loãng, phân tán trong thạch để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC_{50}). Thực hiện trên 2 vi khuẩn Gram dương (Staphylococcus aureus ATCC 29213 - MSSA, S. aureus đề kháng methicillin ATCC 43300 - MRSA) và 2 vi khuẩn Gram âm (Pseudomonas aeruginosa ATCC 2785, Escherichia Coli ATCC 2592) tại Bộ môn Vi ký sinh - Khoa Dược, Đại học Y Dược Tp.HCM. Sử dụng mẫu trắng là dung môi dùng pha chế mẫu thử (không có tinh chất lá Trầu) trong các thử nghiệm kháng khuẩn và kháng virus.*

***Kết quả:** Thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK) có tác dụng ức chế enterobacter 71 (EV71) ở nồng độ pha loãng 1/512 (tương đương 0,59 mg tinh chất/100 mL chế phẩm). Đồng thời, có nồng độ ức chế tối thiểu 50% (MIC_{50}) với Staphylococcus aureus, S. aureus đề kháng methicillin, Pseudomonas aeruginosa và Escherichia coli lần lượt là 1,56; 1,56; 6,25 và 12,50 (%, v/v) so với mẫu trắng.*

***Kết luận:** Thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK) thể hiện tác dụng ức chế enterobacter 71 (EV71), Staphylococcus aureus, S. aureus resistance methicillin, Pseudomonas aeruginosa và Escherichia coli.*

***Từ khóa:** EV71, tác dụng kháng khuẩn, trung hòa virus, Piper betle L., dịch chiết lá Trầu.*

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL AND ANTIVIRAL EV71 ACTIVITY OF PREPARATION FROM BETEL LEAVES EXTRACT (PIPER BETLE L.)

Nguyen Thi Thanh Thao, Vu Thi Que Huong, Do Thi Hong Tuoi, Nguyen Phuong Dung

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Supplement of Vol. 19 - No 5 - 2015: 118 - 123

***Background and Aims**: Piper betle L. belongs to the family Piperaceae and is distributed in Vietnam, India, China, Srilanka, Thailand and other Southeast Asian countries. The Betel leaves from Piper betle L. have long been used in traditonal medicine of Vietnamese for prevention of oral diseases. In the present study, we investigated the antiviral activities of a preparation from Betel leaves extract (TK) against enterovirus 71 (EV71). The antibacterial activity against Staphylococcus aureus (MSSA and MRSA), Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli was studied by agar disk diffusion method.*

***Materials and Methods**: Assays of antiviral activity was evaluated by the WHO protocols for cell culture*

* Khoa Vi sinh - Miễn dịch, Viện Pasteur TP.HCM ** Khoa Dược - Đại học Y Dược TP.HCM
*** Khoa Y học cổ truyền - Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh
Tác giả liên lạc: PGS.TS. Nguyễn Phương Dung *ĐT*: 0988202625 *Email*: phuongdung463@gmail.com

techniques and neutralizing antibodies in Pasteur Institute at HCMC - VN. The TK were evaluated for antibacterial activity against 2 Gram positive (Staphylococcus aureus ATCC 29213 - MSSA, S. aureus methicillin resistance ATCC 43300 - MRSA) and 2 Gram negative bacteria (Pseudomonas aeruginosa ATCC 2785, Escherichia coli ATCC 2592). Solvent for preparing study sample (without Betel leaves extract) was used as control (C group) for antiviral and antibacterial activity assay.

***Results**: The antiviral assays demonstrated that TK preparation possessed significant antiviral activity against EV71 at a concentration of 1/512 (equivalent 0,59 mg extract of Betel leaves/100 mL preparation) (v/v). The bacterial activity was observed toward Staphylococcus aureus, S. aureus methicillin resistance, Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli with Minimum Inhibitory Concentration 50% (MIC_{50}) are 1.56, 1.56, 6.25 and 12.50 (%, v/v) compared without Betel leaves exctract.*

***Conclusion**: The TK preparation had the potential to be effective in the treatment of infection with enterovirus 71 (EV71), Staphylococcus aureus, S. aureus methicillin resistance, Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli.*

***Key words:** EV71, antiviral activity, antibacterial activity, Piper betle L., Betel leaves extract.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tay chân miệng (TCM) là bệnh truyền nhiễm lây từ người sang người do tiếp xúc trực tiếp qua dịch tiết mũi họng, nước miếng, chất dịch từ bọng nước hoặc phân của người bệnh, vì thế dễ gây thành dịch. Tác nhân gây bệnh được xác nhận là virus đường ruột. Trong đó, thường gặp là *Enterovirus* 71 (EV71), *Coxsackie virus* A16. Biểu hiện chính của bệnh TCM là tổn thương da, niêm mạc dưới dạng bọng nước ở các vị trí đặc biệt (niêm mạc miệng, lòng bàn tay/chân, mông, gối). Bệnh có thể gây nhiều biến chứng nguy hiểm như viêm não-màng não, viêm cơ tim, phù phổi cấp dẫn đến tử vong nếu không được phát hiện sớm và xử trí kịp thời. Các trường hợp biến chứng nặng thường do EV71.

Do chưa có thuốc tác động trực tiếp trên tác nhân gây bệnh, phương pháp điều trị TCM chủ yếu hiện nay vẫn là điều trị triệu chứng: Hạ sốt; hạn chế nhiễm trùng bội nhiễm; làm lành tổn thương da và niêm mạc... Việt Nam đứng thứ 4 trên thế giới về số ca mắc bệnh TCM, sau Nhật, Singapore và Macao. Theo thống kê của Cục Y tế dự phòng (Bộ Y tế), bệnh TCM đã xuất hiện ở cả 63 tỉnh thành, tuýp virus độc lực cao EV71 tại Việt Nam cao hơn so với các nước khác.Vì thế, việc tìm kiếm các phương pháp phòng ngừa lây lan EV71 là một trong các vấn đề cấp thiết hiện nay. Trong đó, kế thừa và phát triển y dược học cổ truyền là lĩnh vực cần quan tâm.

Trầu (*Piper betle* L., họ Hồ tiêu, Piperaceae) là một loại thực vật dễ trồng, phân bố rộng rãi ở nhiều nước châu Á, vùng nhiệt đới như: Việt Nam, Malaysia, Indonesia, Philippin… Ở Việt Nam, Trầu đã được sử dụng từ thời Hùng Vương dựng nước để làm thuốc và vệ sinh răng miệng. Theo Y học cổ truyền, lá Trầu có vị cay nồng, tính ấm, vào kinh Phế, Tỳ, Vị, có công năng hạ khí, chỉ khái, tiêu viêm, sát trùng, trừ phong thấp, kích thích tiêu hóa và thần kinh, phòng bệnh lam sơn chướng khí… Kinh nghiệm dân gian dùng nước sắc, nước hãm từ lá Trầu để điều trị các chứng viêm nhiễm ngoài da (chàm, rôm sảy, lở loét, mụn nhọt…) ở trẻ nhỏ[2,6].

Những nghiên cứu dược lý thực nghiệm của các tác giả nước ngoài cho thấy Trầu có tác dụng kháng khuẩn, kháng virus, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau, kích thích thần kinh trung ương, chống oxy hóa, ức chế sự phát triển của tế bào ung thư Hela, MCF-7…[1,4,5,7].

Với mục tiêu phát triển một chế phẩm chống lây lan và điều trị bệnh TCM từ lá Trầu, trong phạm vi đề tài này, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng kháng khuẩn, ức chế virus EV71 *in vitro* của chế phẩm thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu.

PHƯƠNG TIỆN - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thuốc thử nghiệm

Dung môi pha thuốc (C), không chứa tinh dầu lá Trầu, do Công ty CPDP OPC sản xuất ngày 21/4/2014, sử dụng làm mẫu chứng trong các thử nghiệm *in vitro*.

Thuốc nước TK1 chứa 0,3% tinh dầu lá Trầu, do Công ty CPDP OPC sản xuất ngày 21/4/2014.

Vật liệu nghiên cứu

Virus EV71 do Tổ chức Y tế thế giới (WHO) cung cấp, được phân lập, định danh và nuôi cấy tại khoa Vi sinh miễn dịch – Viện Pasteur Tp. Hồ Chí Minh.

Tế bào sarcoma cơ vân (Rhabdomyosarcoma-A, RD-A).

Môi trường nuôi cấy tế bào RD-A: Môi trường tăng trưởng EMEM (Eagles Minimal Essential Medium) 10%; môi trường duy trì EMEM 2%.

Vi khuẩn: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), *S. aureus* kháng methicillin ATCC 43300 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Escherichia coli* ATCC 25922 (Bộ môn Vi Ký sinh, Khoa Dược, ĐH Y Dược Tp. Hồ Chí Minh).

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn Tryptic Soy Broth (TSB - Merck, Đức) và thử hoạt tính kháng khuẩn thạch Mueller-Hinton Mueller-Hinton Agar (MHA - Merck, Đức).

Phương tiện nghiên cứu

Máy đo quang phổ Shimadzu UV-1700 (Shimadzu, Nhật Bản), tủ ấm Shellab RI28-2 (Shellab, Mỹ), kính hiển vi đảo ngược, bảng nhựa 96 giếng, ống pha loãng, micro pipet...

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát khả năng ức chế virus EV71 của chế phẩm thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (in vitro)

Theo quy trình nuôi cấy tế bào và kháng thể trung hòa của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO)[8], thực hiện tại khoa Vi sinh - Miễn dịch củaViện Pasteur Tp. Hồ Chí Minh.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào: Lấy tế bào được chứa trong nitơ lỏng để tạo ngân hàng tế bào làm việc (working cell bank) nuôi cấy trong môi trường tăng sinh EMEM, ủ 36^0C trong khí CO_2 đến khi tế bào phát triển gần kín đều chai, duy trì bằng môi trường EMEM. Mỗi đời tế bào sẽ được sử dụng trong 1 tuần và sau mỗi tuần tế bào sẽ được nhân ra thêm nữa để dùng trong thời gian tiếp theo.

Xác định hiệu giá của virus (CCID50 – Cell Culture Infective Dose 50)

Dùng EV71 phân lập từ bệnh phẩm của bệnh nhân tay chân miệng, chủng này đã được giải trình tự gen vùng VP1 xác định là chủng EV71, lưu giữ trong tủ âm sâu.

Pha loãng hỗn dịch chứa virus EV71 trong ống nghiệm theo 8 mức nồng độ giảm dần theo cấp số nhân (từ nồng độ 10^{-1} đến nồng độ 10^{-8}). Lần lượt cho vào mỗi giếng: 50 µL virus đã pha loãng + 50 µL môi trường EMEM 2% + 100 µL hỗn dịch tế bào RD-A. Ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 36^0C, 5% CO_2. Quan sát hiệu ứng gây độc tế bào (cytopathic effect, CPE) bằng kính hiển vi đảo ngược sau 2 ngày, 5 ngày và sau 7 ngày. Đếm số giếng có hiện tượng CPE. Tính nồng độ EV71 gây chết 50% tế bào theo công thức Karber:

$$\log CCID_{50} = L - d\,(S - 0{,}5)$$

Trong đó: L: Logarit của nồng độ pha loãng thấp nhất dùng trong thử nghiệm; d: Tỷ lệ khác biệt giữa các nồng độ pha loãng; S: Tổng tỷ lệ các giếng dương tính trên các giếng gây nhiễm ở từng nồng độ virus

Lập lại 3 lần, tính trị số logCCID50 trung bình

Chuẩn bị nguồn EV71 sử dụng trong thử nghiệm

Chuẩn bị chai tế bào 10 mL theo quy trình nuôi cấy tế bào. Gây nhiễm virus EV71 vào chai tế bào theo quy trình phân lập virus. Xác định nồng độ virus EV71 theo quy trình chuẩn độ virus.

Xác định nồng độ chất thử nghiệm không độc với tế bào RD-A

Pha loãng chất thử ở các nồng độ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 và cho vào các giếng chứa hỗn dịch (2,0 x 10^5 tế bào / 0,1 ml) tế bào RD-A. Ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 36 ^oC, 5% CO_2. Quan sát hiệu ứng gây độc tế bào CPE bằng kính hiển vi đảo ngược sau 2 ngày, 5 ngày và sau 7 ngày để xác định nồng độ chất thử nghiệm không độc với tế bào RD-A. Chọn nồng độ không gây hiệu ứng CPE trên tế bào RD-A để khảo sát tác dụng ức chế virus EV71 trong các bước tiếp theo. Lặp lại thí nghiệm 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Xác định dung môi pha thuốc (C) trong chất thử nghiệm có tác dụng trung hòa với virus hay không (phương pháp trung hòa): Tiến hành thử nghiệm với 4 thời gian ủ khác nhau 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ.

Với nồng độ virus được biết, pha loãng hỗn dịch chứa virus EV71 trong ống nghiệm với mức độ giảm dần 8 mức nồng độ giảm dần theo cấp số nhân (từ nồng độ 10^{-1} đến nồng độ 10^{-8}). Lần lượt cho vào mỗi giếng 50 µL virus đã pha loãng + 50 µL dung môi C + 100 µL hỗn dịch tế bào RD-A. Ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 36 ^oC, 5% CO_2 trong 1 giờ để dung môi C trung hòa virus. Thêm vào mỗi giếng 100 µL hỗn dịch tế bào RD-A (từ 10^{-1} đến 10^{-8}). Quan sát hiệu ứng gây độc tế bào CPE bằng kính hiển vi đảo ngược sau 2 ngày, 5 ngày và sau 7 ngày để đánh giá dung môi C có trung hòa với virus hay không. Lập lại thử nghiệm 3 lần.

Xác định nồng độ chất thử nghiệm có tác dụng trung hòa virus: Tiến hành thử nghiệm với 4 thời gian ủ khác nhau 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ.

Cho vào mỗi giếng 50 µL virus đã pha loãng + 50 µL dung dịch chất thử (ở nồng độ không gây hiệu ứng CPE). Ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 36 ^oC, 5% CO_2 trong 1 giờ để chất thử trung hòa virus. Thêm vào mỗi giếng 100 µL hỗn dịch tế bào RD-A (từ 10^{-1} đến 10^{-8}). Ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 36^{0}C, 5% CO_2 trong 48 giờ. Quan sát hiệu ứng gây độc tế bào CPE bằng kính hiển vi đảo ngược sau 2 ngày, 5 ngày và sau 7 ngày. Đếm số giếng có hiện tượng CPE và tính nồng độ EV71 gây chết 50% tế bào theo công thức Karber. Lặp lại thí nghiệm 3 lần, tính trị số logCCID50 trung bình.

Đánh giá tác dụng kháng khuẩn in vitro của chế phẩm thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu[3]

Tác dụng kháng khuẩn của chế phẩm được đánh giá thông qua nồng độ ức chế tối thiểu MIC_{50} (Minimum Inhibitory Concentration) sử dụng phương pháp pha loãng và phân tán trong môi trường thạch rắn MHA[3].

Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường TSB ủ 5-6 giờ ở 37^{0}C, xác định mật độ vi khuẩn tại bước sóng 625 nm trên máy đo quang phổ Shimadzu UV-1700 và pha loãng để có mật độ khoảng 1x10^7 CFU/ ml. Cấy 1 µl dịch vi khuẩn (khoảng 10^4 CFU) lên mặt thạch MHA đã được phân tán chế phẩm tinh chất Trầu hoặc mẫu trắng ở các nồng độ khác nhau từ 0 đến 50% (v/v). Ủ 24 giờ ở 37^{0}C trong tủ ấm Shellab RI28-2, quan sát khuẩn lạc mọc trên thạch, xác định giá trị MIC nồng độ thấp nhất không có vi khuẩn phát triển.

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

Khảo sát tác dụng ức chế EV71 của thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu

Hiệu giá virus

Bảng 1*. Hiệu giá của virus (CCID50 – Cell Culture Infective Dose 50)*

Lần thử nghiệm	logCCID50	Trung bình
1	- 7,4	$10^{7,4}$ CCID50 /0,1 ml
2	- 7,5	
3	- 7,3	

Nồng độ chất thử nghiệm không độc với tế bào RD-A

Nồng độ pha loãng log10 của chất thử không gây độc tế bào: 10^{-3}(1/1000)

Dò 8 nồng độ pha loãng bậc 2 (1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048).

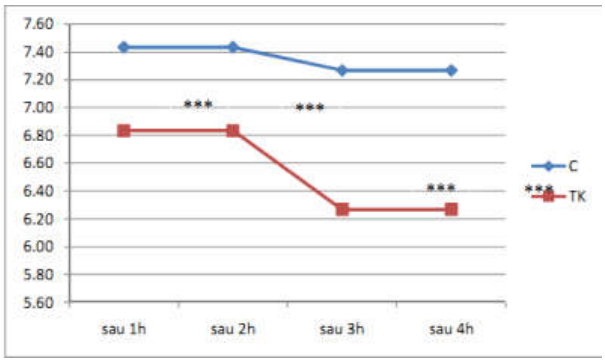
Kết quả: Nồng độ pha loãng 1/512 không gây hiệu ứng CPE trên tế bào RD-A trong 3 lần khác nhau.

Nồng độ chất thử nghiệm có tác dụng trung hòa virus

***Bảng 2**: Hiệu giá virus (CCID50/0,1 ml) sau 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ*

Mẫu thử	Sau 1 giờ	Sau 2 giờ	Sau 3 giờ	Sau 4 giờ
C	$10^{7,43} \pm 10^{0,01}$	$10^{7,43} \pm 10^{0,01}$	$10^{7,27} \pm 10^{0,01}$	$10^{7,27} \pm 10^{0,01}$
TK1 (1/512)	$10^{6,83} \pm 10^{0,01}$	$10^{6,83} \pm 10^{0,01}$	$10^{6,27} \pm 10^{0,01}$	$10^{6,27} \pm 10^{0,01}$
Độ chênh	$10^{0,6}$	$10^{0,6}$	$10^{1,0}$	$10^{1,0}$
P	0,0001 < 0,001	0,0000 < 0,001	0,0000 < 0,001	0,0000 < 0,001

Kết quả bảng 2 và hình 1 cho thấy, ở nồng độ pha loãng 1/512 (tương đương 0,59 mg tinh chất lá Trầu/100 mL chế phẩm), thuốc nghiên cứu làm giảm mật độ virus EV71 từ $10^{0,6}$ đến $10^{1,0}$ sau 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ. Như vậy, thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK1) có thể hiện tác dụng trung hòa virus in vitro.



***Hình 1:** Hiệu giá virus (logCCID50/0,1 ml) sau 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ*

Tác dụng kháng khuẩn

***Bảng 3.** Giá trị MIC (%,v/v) của thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK1) và mẫu trắng C*

Mẫu thử	MIC (%, v/v)			
	MSSA	*MRSA*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
TK1	1,56	1,56	12,50	6,25
C	50	50	50	50

***Hình 2.** Hình ảnh khuẩn lạc mọc trên thạch sau 24 giờ ủ ở 37^{0}C*

1) MSSA; 2) MRSA; 3) E. coli; 4) P. aeruginosa;

A3: mẫu TK1 (nồng độ 12,5%); E2: mẫu C (nồng độ 25%).

Kết quả bảng 3 và hình 2 cho thấy chế phẩm thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK1) có tác dụng ức chế tốt trên vi khuẩn Gram dương hơn vi khuẩn Gram âm. Khả năng ức chế mạnh nhất trên chủng *MSSA* và *MRSA* ở nồng độ 1,56% (v/v).

Kết quả kháng khuẩn thực nghiệm của chúng tôi trên thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu cũng tương đồng với kết quả của nhóm Deshpande (2013), Subashkumar (2013) và Jahir (2011) trên cao chiết lá Trầu.

KẾT LUẬN

Ở nồng độ pha loãng 1/512 (tương đương 0,59 mg tinh chất lá Trầu/100 mL chế phẩm), thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu làm giảm mật độ *Enterovirus* 71 từ $10^{0,6}$ đến $10^{1,0}$ sau 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ.

Thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu thể hiện tác dụng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* kháng methicillin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* với giá trị MIC (%, v/v) lần lượt là: 1,56; 1,56; 6,25; 12,50.

Đã xác định MIC thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK1) có tác dụng ức chế tốt trên vi khuẩn Gram dương hơn vi khuẩn Gram âm. Khả năng ức chế mạnh nhất trên chủng *MSSA* và *MRSA* ở nồng độ 1,56% (v/v).

Lời cảm ơn: *Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh trong quá trình thực hiện đề tài này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abrahim NN, Kanthimathi MS, Abdul-Aziz A (2012). "Piper betle show antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxidase dismutase". *BMC Complementary and Alternative Medicine;* p.12-22.
2. Đỗ Tất Lợi (2014). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam.* Nhà xuất bản Y học, tr.118-119.
3. Nguyễn Văn Thanh, Trần Cát Đông (2002). "Xây dựng mô hình đánh giá chất có tiềm năng kháng khuẩn". *Nghiên cứu y học*, tập 6, số 1: 309–313.
4. Pradhan D., Suri Dr.K.A., Pradhan K., Biswasroy (2013). "Golden Heart of the Nature: *Piper betle* L.*". J Pharmacog and Phytochem*,1(6).
5. Rathee JS, Patro BS, Mula S, Gamre S, Chattopadhyay S (2006)."Antioxidant activity of *Piper betle* leaf extract and its constituents". *J Agric Food Chem*, 54(24):9046-9054.
6. Viện Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam tập II*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr.1007-1009.
7. Widowati W, Wijaya L, Wargasetia TL, Bachtiar I, Yellianty Y, Laksmitawati DR (2013). "Antioxidant, anticancer, and appoptosis-inducing effects of *Piper betle* extracts in Hela cells". *J Exp Integr Med*, 3(3):225-230.
8. WHO (2004), "Polio laboratory manual", 4th edition, 73-78

Ngày nhận bài báo: *27/02/2015*
Ngày phản biện nhận xét bài báo: *18/05/2015*
Ngày bài báo được đăng: *08/09/2015*