

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HOÁ CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ LÁ CÂY LÁ ĐẮNG (VERNONIA AMYGDALINA DEL.) THU HÁI TẠI BÀ RỊA – VŨNG TÀU

Nguyễn Trung Quân¹, Phan Thị Minh Tâm¹,

Bùi Thị Kim Lý², Hoàng Thành Chí²

(1) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, (VNU - HCM)

(2) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 6/7/2022; Ngày phản biện 7/7/2022; Chấp nhận đăng 7/8/2022

Liên hệ Email: chiht@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.04.329>

Tóm tắt

Cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del.) là dược liệu phân bố rộng khắp cả nước và tập trung nhiều nhất là ở khu vực vùng núi phía bắc như Cao Bằng, Lào Cai, v.v. Lá đắng có tính hàn, vị đắng thường được ngâm rượu, sắc thuốc để bồi bổ và trị một số bệnh trên người. Bằng các phản ứng hoá học và thí nghiệm thu nhặt gốc tự do, ABTS, thành phần và khả năng kháng oxi hoá của cao chiết cây lá đắng được đánh giá. Kết quả cho thấy cao chiết lá đắng có chứa các hợp chất thứ cấp thuộc nhóm hợp chất alkaloid, flavonoid, đường khử và acid hữu cơ. Khả năng thu nhặt gốc tự do được xác định thông qua giá trị EC₅₀ cho DPPH và ABTS lần lượt là 360,2 ± 43,2 µg/mL và > 1mg/mL.

Từ khóa: ABTS, DPPH, lá đắng, khả năng kháng oxi hoá, *Vernonia amygdalina* Del

Abstract

INVESTIGATION INTO ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHANOLIC VERNONIA AMYGDALINA DEL. EXTRACT

Bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.) is mainly distributed in Asia. In Vietnam, this plant is grown throughout the country, especially in the northern mountain areas of Cao Bang and Lao Cai. The bitter leaf has been widely used in traditional medicine for health promotion and human disease treatment. To evaluate the antioxidant activity of the bitter leaf ethanol extract, free radical scavenging assays were carried out, including DPPH and ABTS. The results indicated that alkaloids, flavonoids, reducing sugar, and organic acid were present in the extract. The DPPH and ABTS scavenging activities of bitter leaf extract were reflected via EC₅₀ values, which were 360.2 ± 43.2g/mL and > 1mg/mL, respectively.

1. Đặt vấn đề

Lá đắng có tên danh pháp khoa học là *Vernonia amygdalina* Del. thuộc chi *Vernonia*, họ cúc (Asteraceae) thường còn được gọi là cây mật gấu. Đây là loài cây bụi hay gỗ nhỏ cao đến 10m, có nhiều nhánh, vỏ xám đến nâu, ban đầu láng về sau nứt thành mảng, nhánh non đầy lông mịn, lá đơn, mọc cách; cuống lá dài 0.2-4cm; phiến lá hình bầu dục đến thon, kích thước 4-15cm × 1-4cm, không có lông trên phiến trừ lông tơ ở hệ gân lá; đỉnh phiến nhọn hay có mũi ngắn; bìa phiến có răng nhỏ. Tụ tán dạng tán mang nhiều hoa đầu ở ngọn nhánh; cọng hoa đầu dài đến 1cm, có lông mịn; tổng bao bầu dục rộng, cao 3-5mm mang 3-7 hàng lá hoa có lông mịn. Hoa hình ống, lưỡng phái, ngũ phân, ống hoa cao 5-8mm, tận cùng mang 5 thùy trắng, đứng, có tuyến và lông mịn; bộ nhị đực dính nhau thành ống, bao phấn có phụ bộ ở đỉnh; bầu noãn hạ, một buồng, có tuyến và lông mịn; vòi nhụy có lông, chẻ đôi. Bề quả nâu đen, có 10 rãnh dọc, cao 1,5-3,5mm, có tuyến và đầy lông mịn, tận cùng bên trên có lông cứng (Ofori và nnk., 2013; Orwa và nnk., 2009; Oyeyemi và nnk., 2018). Trong y học dân gian, cây lá đắng được ứng dụng vào nhiều bài thuốc chữa các bệnh ở người, kháng khuẩn, kháng oxi hoá và nhiều công dụng khác (Oyeyemi và nnk., 2018). Trước đây, nhiều hợp chất chuyển hoá thứ cấp đã được phát hiện có trong cây lá đắng, điển hình là các hợp chất phenolic như vernolide, vernodalol, vernolepin, vernodalin và các dẫn xuất, flavonoid, luteolin, terpene, coumarin, phenolic acid, lignan, xanthone, anthraquinone và nhiều hợp chất khác (Ejike, 2010). Các hợp chất thứ cấp mang đến các hoạt tính sinh học có tác dụng hỗ trợ sức khoẻ và điều trị bệnh ở người (Hussein và nnk., 2019; Twaij và nnk., 2022). Với đặc tính giàu các điện tử tự do, nhóm hợp chất này có khả năng trung hoà các gốc tự do từ đó cân bằng thể oxi hoá khử nội bào khi được hấp thu vào trong tế bào (Swallah và nnk., 2020). Tuy nhiên khác với vai trò của các hợp chất sơ cấp, vai trò của các hợp chất thứ cấp trong thực vật không mang ý nghĩa quyết định cho sự sống còn của cá thể mà liên quan nhiều đến đáp ứng thích nghi của cá thể với môi trường sống do đó hàm lượng và thành phần thường có nhiều thay đổi và phụ thuộc vào điều kiện sống (Holopainen và nnk., 2018; Srivastava và nnk., 2020). Mục tiêu của đề tài là kiểm tra sơ bộ thành phần hoạt tính có trong mẫu lá đắng thu hái tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu, Việt Nam và khảo sát hoạt tính kháng oxi hoá của cao chiết.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị cao chiết

Mẫu cây lá Đắng (*Vernonia amygdalina* Del.) được thu hái tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu, vào tháng 9/2017 và được định danh bởi Tiến sĩ Đặng Lê Anh Tuấn, khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, với mã số voucher: PHH0004908. Mẫu lá sau thu hái được loại bỏ các lá hư hỏng, sâu bệnh và rửa sạch với nước cất hai lần trước khi tiến hành sấy khô ở 40°C trong tủ sấy vô trùng cho đến khi mẫu lá khô hoàn toàn và có trọng lượng không thay đổi. Xay và lọc qua rây để thu được bột khô lá Đắng. Bột dược liệu được tiến hành ngâm với lượng Ethanol 96% vừa đủ,

lắc liên tục trong 5 ngày. Dịch chiết được thu nhận bằng cách lọc qua giấy lọc whattman sau đó cho bay hơi dung môi với áp suất thấp ở 40°C để thu được cao chiết thô. Cao thô được định lượng và hoà tan trong DMSO (Sigma-Aldrich) với nồng độ cuối là 200mg/ml. Lọc qua màng lọc 0.45µm và 0.22µm trong điều kiện vô trùng. Chia nhỏ thành từng eppendorf, bảo quản ở tủ -20°C cho tới khi sử dụng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

2.2. Định tính thành phần hoá thực vật

Các thành phần hoá thực vật sơ bộ được tiến hành định tính bằng phương pháp của Ciulei và cộng sự (Ciulei, 1993). Ba phân đoạn dịch chiết ở ba độ phân cực khác nhau (diethyl ether, ethanol và nước cất) được thu nhận bằng phương pháp Soxhlet với 3 lần hồi lưu dung môi. Các phản ứng định tính được tiến hành phù hợp với từng phân đoạn để kiểm tra các thành phần hoạt tính có trong mẫu dược liệu.

2.3. Định lượng hàm lượng polyphenol toàn phần

Phương pháp định lượng polyphenols tổng số được tiến hành theo mô tả của Marsha Lewis được sửa đổi theo Nunzia Cicco và cộng sự (Cicco và nnk., 2011). Trong đó, thuốc thử Folin-Cioaltea (Sigma-Aldrich) được xem là hoá chất phản ứng chính cho thí nghiệm, hỗn hợp acid phosphotungstic và acid phosphomolybdic trong dung dịch có khả năng tham gia phản ứng với các nhóm hydroxyl có trên các hợp chất polyphenols để hình thành cấu trúc oxit vonfram và molybden có màu xanh lam hấp thụ quang phổ cực đại tại 756nm, thông qua việc đo quang phổ hấp thụ của dung dịch phản ứng tại bước sóng 756nm có thể ước lượng hàm lượng polyphenols. Quy trình thực hiện chi tiết: 200µl thuốc thử F-C 100% được cho phản ứng với 200µl mẫu ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 phút. Bổ sung 1600µL Na₂CO₃ 5% và tiếp tục ủ hỗn hợp trong 20 phút ở 40°C. Đo độ hấp thụ quang phổ của dung dịch tại 765nm. Gallic acid (Sigma-Aldrich) được dùng làm chất chuẩn cho phản ứng với dãy nồng độ 0 đến 500µg/ml.

2.4. Khảo sát khả năng bắt giữ gốc DPPH

Được đề xuất vào những năm 1950, DPPH nhanh chóng trở thành mô hình gốc tự do được sử dụng trong các thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng oxi hoá (Blois, 1958). Gốc DPPH thể hiện tính chất điển hình của một gốc oxi hoá Nitơ tự nhiên khi khuyết 1 điện tử, khi hoà tan cho dung dịch có màu tím, hấp thụ bước sóng cực đại tại 517nm. Trong phản ứng oxi hoá khử, DPPH nhận thêm điện tử để đạt trạng thái cân bằng và chuyển dung dịch sang màu vàng làm giảm độ hấp thụ quang phổ tại 517nm. Sự biến thiên độ hấp thụ quang phổ phản ánh khả năng kháng gốc tự do của cao chiết dược liệu. Phản ứng được tiến hành trong điều kiện tránh sáng (Ozcelik và nnk., 2003), 400µl dung dịch DPPH 0,3mM (Sigma-Aldrich) và 400µl dung dịch cao chiết được trộn và ủ 30 phút ở 37°C, hỗn hợp sau khi ủ được đo độ hấp thụ quang phổ tại 517nm. Vitamin C (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm đối chứng dương của thí nghiệm. Khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH được tính như sau:

$$\% \text{ DPPH} = [(A_{\text{Chứng}} - A_{\text{Mẫu}}) / A_{\text{Chứng}}] \times 100 \%$$

2.5. Khảo sát khả năng bắt giữ gốc ABTS

Tương tự như DPPH, ABTS là gốc tự do được sử dụng phổ biến trong các thí nghiệm kháng oxi hoá kể từ lần đầu khảo sát vào đầu những năm 1990 (Miller và nnk., 1993). Quá trình hình thành gốc tự do ABTS (kí hiệu là ABTS*) từ dung dịch ABTS 2,6mM (Sigma-Aldrich) được tiến hành bằng cách bổ sung 3 lần thể tích muối potassium persulfate 7,4mM (Merck) và ủ tối trong 16h. Dung dịch ABTS* được chuẩn hoá với methanol về độ hấp thụ $1,0 \pm 0,02$ ở bước sóng 734nm trước khi tiến hành các thí nghiệm. 150µl dung dịch mẫu được phản ứng 750µl dung dịch ABTS* ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Hỗn hợp được đo độ hấp thụ quang phổ ở 734nm. Vitamin C (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm đối chứng dương của thí nghiệm. Khả năng bắt giữ gốc tự do ABTS được tính như sau:

$$\% \text{ ABTS*} = [(A_{\text{Chứng}} - A_{\text{Mẫu}}) / A_{\text{Chứng}}] \times 100 \%$$

2.6. Phương pháp phân tích số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện ít nhất 3 lần lặp độc lập. Số liệu được thống kê và xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism version 9.0.0. Phân tích hồi quy phi tuyến tính được thiết lập để xác định giá trị nồng độ tác động tối đa một nửa (EC50). Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Hiệu suất tách chiết cao lá đắng

Kết quả sau quá trình tách chiết thu được 740grams cao chiết thô từ 8kg bột lá Đắng tương đương với hiệu suất tách chiết là 9,25%. Hình ảnh ghi nhận từ quá trình tách chiết được minh hoạ trong hình 1.



Hình 1. Kết quả xử lý và tách chiết mẫu lá đắng. (A) Cây lá Đắng tại địa điểm thu hái; (B) lá đắng sau khi được xử lý làm sạch được xếp vào các khay để sấy khô; (C) Hình ảnh cao chiết cây lá Đắng nồng độ 200mg/mL

Bảng 1. Kết quả định tính sơ bộ thành phần hoá thực vật có trong mẫu bột lá đắng
Thành phần hoá thực vật sơ bộ có trong lá đắng

Thành phần	Phản ứng	Định tính theo phân đoạn			Kết luận
		diethyl ether	ethanol	nước	
Carotenoid	Carr-Price	-			-
	H ₂ SO ₄	-			-
Essential oil	Bốc hơi tới cần	-			-
Alkaloid	Thuốc thử Alkaloid	+	-		+
Coumarin	NaOH, UV	-	-		-
Anthraglycosid	KOH 10%	-			-
Flavonoid	Mg/HCl (đậm đặc)	++	+++	+	+++
Cardiac glycosid	Thuốc thử vòng Lacton		-	-	-
	Thuốc thử 2-desoxy		-	-	-
Anthocyanosid	HCl		-	-	-
	KOH		-	-	-
Tannin	Drops of FeCl ₃		-		-
	Gelatin		-		-
Saponin	Dung dịch Liebermann		-		-
	Lắc với nước		-		-
Acid hữu cơ	Na ₂ CO ₃		++		++
Đường khử	Fehling		+++		+++

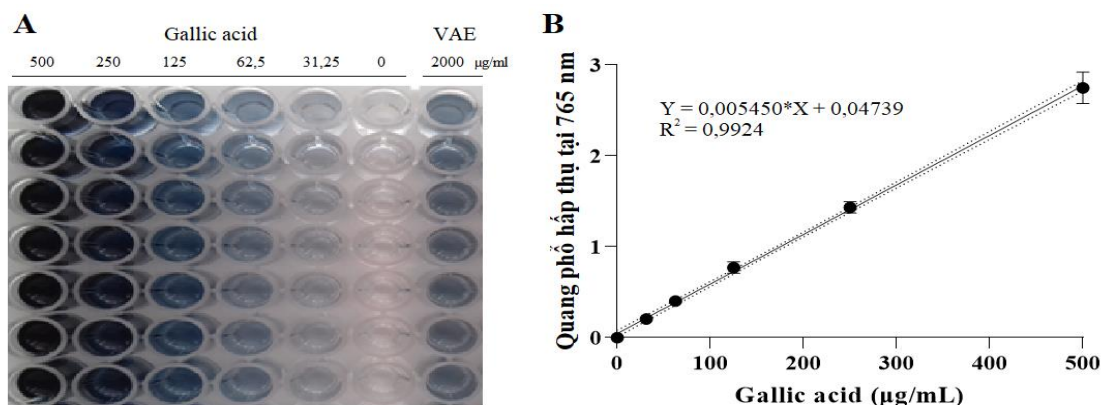
* Ghi chú: (-) không có; (±) nghi ngờ; (+) có; (++) có nhiều; (+++) có rất nhiều

Bằng các phản ứng hoá học và phân đoạn cao chiết, các thành phần hoá học có hoạt tính sinh học được xác định bên trong mẫu bộ khô của cây lá Đắng điển hình bao gồm: polyphenol, alkaloid, đường khử và một số hợp chất khác. Kết quả cụ thể được tổng hợp trong *bảng 1*.

Khác với các thành phần sơ cấp, các hợp chất chuyển hoá thứ cấp không mang ý nghĩa sống còn trong đời sống của thực vật nhưng đảm nhiệm các vai trò khác như dẫn dụ côn trùng, kháng nấm và nhiều nhiệm vụ khác phục vụ cho quá trình thích nghi với môi trường sống của thực vật (Holopainen và nnk., 2018). Do đó, các thành phần chuyển hoá thứ cấp thường thay đổi phụ thuộc vào điều kiện môi trường sống của cây như điều kiện khí hậu, ánh sáng, thổ nhưỡng và các điều kiện ngoại tác động khác, từ đó gây ra sự khác biệt trong thành phần chuyển hoá thứ cấp của cùng đối tượng ở các điều kiện sống khác nhau (Pant và nnk., 2021a). Sự có mặt của các hợp chất khử, hợp chất mang cấu trúc không no, hợp chất mang nhiều nhóm thế giàu điện tử cho phép dự đoán về hoạt động kháng oxi hoá của dược liệu này.

Hàm lượng polyphenol toàn phần trong mẫu lá đắng

Polyphenols tổng được tính theo đương lượng acid gallic (hình 2), với hàm lượng cao trong mẫu cao chiết $38,34 \pm 1,90\text{mg/g GAE}$ (Gallic acid equivalents – đương lượng acid gallic) tương đương với $3,55 \pm 0,18\text{mg/g GAE}$ bột khô dược liệu.



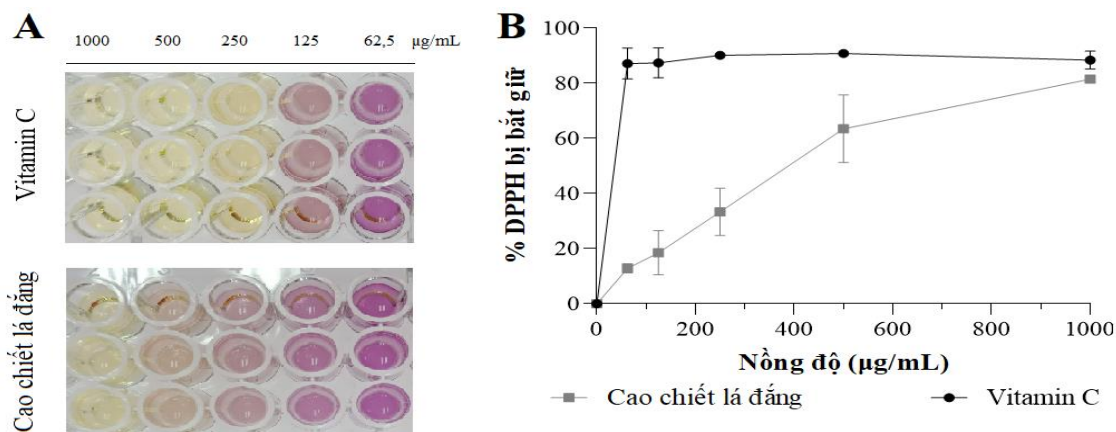
Hình 2. Kết quả định lượng polyphenols tổng số.

(A) Kết quả phản ứng F – C; (B) Phương trình đường chuẩn Gallic acid

Polyphenol là nhóm hợp chất thứ cấp lớn với hơn 8000 công thức được mô tả với đặc điểm chung là vòng phenol và nhiều nhóm thế từ đó các chiết xuất mang nhóm hợp chất này có thể tham gia nhiều con đường bên trong tế bào (Bravo, 1998; Cheynier, 2005; Dixon, 1999; Ghani, 2020; Tsao, 2010). Mang nhiều điện tử tự do bên trong cấu trúc, các hợp chất polyphenols dễ dàng tham gia vào các phản ứng trung hoà các gốc oxi hoá khiến các chiết xuất chứa nhiều hợp chất này mang khả năng kháng oxi hoá cao. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol tổng số của cao chiết lá đắng trong ethanol 96% cao hơn so với cao chiết trong methanol ($14.79 \pm 0.53\text{mg GAE/g}$), ethanol 70% (chiết nóng: $18.85 \pm 0.68\text{mg GAE/g}$, chiết lạnh: $22.45 \pm 2.35\text{mg GAE/g}$) và ethyl acetate ($25.2 \pm 2.62\text{mg GAE/g}$) (Phan và nnk., 2021).

3.2. Khả năng thu nhặt gốc DPPH của cao chiết lá đắng

Bằng phản ứng cho nhận điện tử với DPPH, khả năng kháng oxi hoá của cao chiết lá đắng được xác định. Khả năng kháng oxi hoá của cao chiết lá đắng tăng dần theo chiều tăng nồng độ cao chiết và thấp hơn nhiều so với vitamin C. Tại nồng độ 1mg/mL , phản ứng giữa cao chiết lá đắng và DPPH đạt bão hoà. Nồng độ tác động tối đa một nửa – EC50 được xác định là $360,2 \pm 43,2\mu\text{g/mL}$ cho cao chiết lá đắng trong thí nghiệm thu nhặt gốc tự do DPPH.

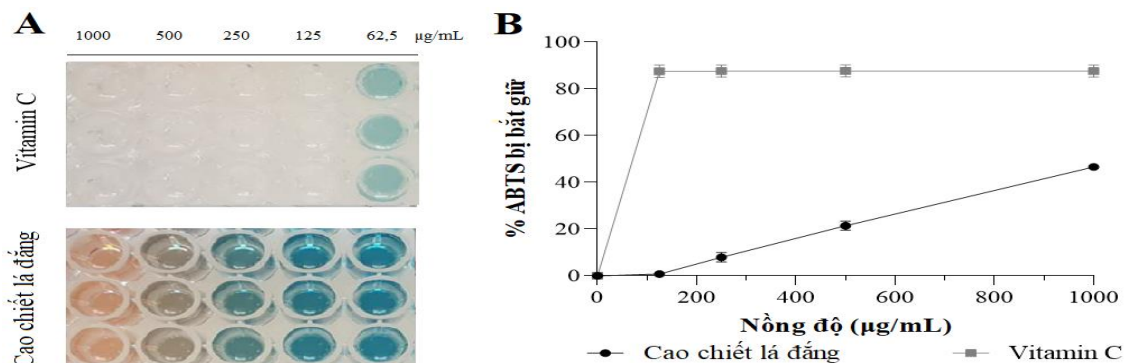


Hình 3. Kết quả thí nghiệm thu nhặt DPPH. (A) Sự thay đổi màu sắc dung dịch DPPH xảy ra do sự trao – nhận điện tử với cao chiết, (B) Đường biểu diễn % DPPH bị bắt giữ.

Trước đây, hoạt tính kháng oxi hoá của cao chiết cây lá đắng đã được nhiều nghiên cứu khảo sát và cho thấy hiệu quả thu nhặt gốc DPPH. Ethanol được xem xét là dung môi hiệu quả nhất cho tách chiết nhằm thu được khả năng thu nhận gốc DPPH cao nhất so với dung môi etyl acetate và n-hexan (Syahputra và *nnk.*, 2021). Hiệu quả thu nhận gốc tự do DPPH cũng có sự khác biệt giữa các nghiên cứu (Adeoye và *nnk.*, 2018; Adesanoye và *nnk.*, 2014; Erukainure và *nnk.*, 2022). Điều kiện môi trường sống góp phần lớn vào sự hình thành, chuyển hoá các hợp chất thứ cấp gây ảnh hưởng lên tác động sinh học của cao chiết thực vật từ đó dẫn đến sự sai khác trong kết quả nghiên cứu của cùng một đối tượng nhưng khác biệt về vị trí địa lý (Li và *nnk.*, 2020; Pant và *nnk.*, 2021b). Khả năng thu nhặt gốc DPPH của cao chiết cây lá đắng trong báo cáo này cho thấy tính thống nhất với kết quả ghi nhận được từ mẫu lá đắng thu tại Trảng Bom, Đồng Nai, Việt Nam (Phan và *nnk.*, 2021).

3.3. Khả năng thu nhặt gốc ABTS của cao chiết lá đắng

Tương tự DPPH, ABTS cũng là phương pháp thường được sử dụng trong khảo sát tính kháng oxi hoá của dược liệu (Nwachukwu và *nnk.*, 2021). Kết quả cho thấy khả năng bắt giữ các gốc ABTS* của cao chiết cây lá đắng là thấp với nồng độ EC₅₀ > 1mg/mL. Khả năng bắt giữ gốc tự do ABTS* của cao chiết lá đắng trong báo cáo này là phù hợp với các nghiên cứu trước đó (Adeoye và *nnk.*, 2018; Qing và *nnk.*, 2014). Trong khảo sát trước đây, dung môi ethyl acetate được xác định là dung môi tạo cao chiết lá đắng có hiệu quả thu nhận ABTS* cao nhất (Qing và *nnk.*, 2014). Bên cạnh đó các điều kiện ngoại cảnh như tỉ lệ dung môi, nhiệt độ tách chiết và phương pháp tách chiết gây ra những ảnh hưởng nhất định lên thành phần hoạt tính chiết xuất, khả năng thu nhặt gốc tự do DPPH và ABTS* của cao chiết lá của cây lá đắng (Alara và *nnk.*, 2017).



Hình 4. Kết quả thí nghiệm thu nhặt ABTS*. (A) Sự thay đổi màu sắc dung dịch ABTS* xảy ra do sự trao – nhận điện tử với cao chiết, (B) Đường biểu diễn % ABTS* bị bắt giữ.

Kết quả tổng kết cho thấy alkaloid, polyphenol, acid hữu cơ, các hợp chất khử là các thành phần hoạt tính được phát hiện trong mẫu lá đắng thu hái tại Bà Rịa – Vũng Tàu, trong đó hàm lượng polyphenol ở mức khá cao $38,34 \pm 1,90$ mg/g GAE. Khả năng thu nhặt gốc tự do ghi nhận từ cao chiết là khá thấp với nồng độ EC₅₀ cho DPPH và ABTS* lần lượt là $360,2 \pm 43,2$ µg/mL và > 1mg/mL. Với sự xuất hiện của các hợp chất có khả năng khử trong cao chiết, cần tiến hành thêm các thí nghiệm đánh giá khả năng oxi hoá – khử khác bên cạnh thí nghiệm thu nhặt gốc tự do nhằm kiểm tra toàn diện khả năng kháng oxi hoá của dược liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Adeoye, A., Akinrinde, A., Oyagbemi, A., Omobowale, T., Adedapo, A., Ayodele, E. A., . . . Adedapo, A. (2018). Phytochemical, analgesic, in-vitro anti-oxidant and GC-MS analysis of vernonia amygdalina leaves. *African Journal of Biomedical Research*, 21, 303-312.
- [2] Adesanoye, O. A., & Farombi, E. O. (2014). In Vitro Antioxidant Properties of Methanolic Leaf Extract of Vernonia Amygdalina Del. *Niger J Physiol Sci*, 29(2), 91-101.
- [3] Alara, O., Nour, A., & Olalere, O. (2017). Optimization of microwave-assisted extraction of total flavonoids and antioxidants from Vernonia amygdalina leaf using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 107, 36-48.
- [4] B. Ozcelik, J.H. Lee, & Min, D. B. (2003). Effects of light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-1picrylhydrazyl. *Journal of food science*, 68(2), 487-490.
- [5] Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- [6] Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56(11), 317-333.
- [7] Cicco, N., & , V. L. (2011). The Influence of Initial Carbonate Concentration on the Folin-Ciocalteu Micro-Method for the Determination of Phenolics with Low Concentration in the Presence of Methanol: A Comparative Study of Real-Time Monitored Reactions *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 840-848
- [8] Ciulei I., G. E., and S. U. (1993). *Medicinal plants, phytochemistry and phytotherapy [Plante medicinale, fitochimie si fitoterapie]* (Vol. 1).
- [9] Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S.
- [10] D. A. Ofori, P. Anjarwalla, R. Jamnadass, P. C. Stevenson, & Smith., P. (2013). *Pesticidal plant leaflet Vernonia amygdalina Del.*
- [11] Dixon, R. A. (1999). 1.28 - Isoflavonoids: Biochemistry, Molecular Biology, and Biological Functions. In S. D. Barton, K. Nakanishi, & O. Meth-Cohn (Eds.), *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 773-823. Pergamon.
- [12] Ejike, I. I. I. a. C. E. C. C. (2010). Current perspectives on the medicinal potentials of Vernonia amygdalina Del. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7).
- [13] Erukainure, O., & Islam, M. (2022). Vernonia amygdalina stimulates muscle glucose uptake and modulates redox activities and functional chemistry in oxidative hepatic injury. *Journal of Food Biochemistry*, 46.
- [14] Ghani, U. (2020). Chapter three - Polyphenols. In U. Ghani (Ed.), *Alpha-Glucosidase Inhibitors* (pp. 61-100). Elsevier.
- [15] Holopainen, J. K., Virjamo, V., Ghimire, R. P., Blande, J. D., Julkunen-Tiitto, R., & Kivimäenpää, M. (2018). Climate Change Effects on Secondary Compounds of Forest Trees in the Northern Hemisphere [Mini Review]. 9.
- [16] Hussein, R., & El-Anssary, A. (2019). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In.
- [17] Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89.

- [18] Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 84(4), 407-412.
- [19] Nwachukwu, I. D., Sarteshnizi, R. A., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2021). A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*, 26(16).
- [20] Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. NXB Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- [21] Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Simons, A. (2009). Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide, version 4.0. *World Agroforestry Centre ICRAF, Nairobi, KE*.
- [22] Oyeyemi, I. T., Akinlabi, A. A., Adewumi, A., Aleshinloye, A. O., & Oyeyemi, O. T. (2018). *Vernonia amygdalina*: A folkloric herb with anthelmintic properties. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 43-49.
- [23] Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021a). The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review. 18(11), e2100345.
- [24] Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021b). The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review [<https://doi.org/10.1002/cbdv.202100345>]. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345.
- [25] Phan, N., & Tran, T. (2021). Investigation of the bioactivities of extracts from *Vernonia Amygdalina* Del. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 947, 012040.
- [26] Qing, F., Elumalai, M., & Akowuah, G. (2014). Antimicrobial and Antioxidant Studies of *Vernonia Amygdalina*. *Journal of Applied Pharmacy*, 6.
- [27] Srivastava, A., Mishra, P., & Mishra, A. (2020). Effect of climate change on plant secondary metabolism: An ecological perspective. In (pp. 47-76).
- [28] Swallah, M., Sun, H., Affoh, R., Fu, H., & Yu, H. (2020). Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *International Journal of Food Science*, 8.
- [29] Syahputra, R. A., Harahap, U., Dalimunthe, A., Pandapotan, M., & Satria, D. (2021). Protective effect of *Vernonia amygdalina* Delile against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Heliyon*, 7(7), e07434-e07434.
- [30] Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- [31] Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1).