

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HOÁ VÀ KHẢ NĂNG THAY THẾ PHỤ GIA KHÁNG OXY HOÁ TRONG THỰC PHẨM CỦA CAO CHIẾT MỘT SỐ LOẠI RONG NÂU

Đến tòa soạn 28-10-2019

Trần Thị Ngọc Mai

Viện Khoa học Ứng dụng, Trường Đại học Công nghệ TP. HCM (HUTECH)

Nguyễn Thái Ngọc Uyên

Khoa Vật liệu, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM

SUMMARY

EVALUATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF BROWN SEAWEED EXTRACTS AS ANTIOXIDANT ADDITIVES FOR FOOD

The study was conducted on four species of seaweeds, Sargassum feldmannii collected from Khanh Hoa province and Sargassum gracile, Sargassum mcclurei, Sargassum polycystum collected from Ninh Thuan province. Seaweeds were extracted in two different solvents which were water and ethanol. The extracts obtained from water extraction at temperature of 50°C ranged from 10.68%-18.98% and ethanol extraction at temperature of 40-50°C was 13.48%-17.86%. The total polyphenol content of water extraction was lower than ethanol extraction, the highest in S. gracile (90.01 ± 1.01 mg/g). The free radical scavenging activity of water extraction was lower than ethanol extraction, the highest in S. gracile (71.23 ± 0.39%) and lowest in S. feldmannii (38.11 ± 0.12%). Comparing the antioxidant capacity of the extracts with synthetic antioxidant additives: BHA, BHT, ascorbic acid and tocopherol, the strongest resistance rate was 151.39% with BHT in S. gracile. All of water or ethanol extractions of S. feldmannii, S. mcclurei and S. polycystum had resistance rate in the range of 40-90%.

Keywords: *antioxidant activity, brown seaweed, Sargassum, total polyphenol content*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rong biển là nguồn tài nguyên phong phú, đa dạng về chủng loại ở khu vực biển miền trung Việt Nam; là nguồn nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm, thời gian nuôi trồng ngắn... Cho thấy đây là nguồn nguyên liệu tiềm năng cần được nghiên cứu, khai thác và sử dụng sao cho phù hợp. Tầm quan trọng của các hợp chất có hoạt tính sinh học trong thực phẩm đóng vai trò như các thành phần chức năng đã được công nhận do hiệu quả của chúng trong việc cải thiện sức khỏe và làm giảm nguy cơ bệnh tật [1]. Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào các chất kháng oxy hóa tự nhiên từ rong biển và

ứng dụng trong thực phẩm để ngăn chặn quá trình này. Rong biển nâu là nguồn giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học như carotenoid, fucoxanthin, fucoidan, polyphenol, phlorotannin...[2] Các hợp chất polyphenol như catechin (gallic acid, epicatechin và catechin gallate) [1], các flavonol glycoside và flavonol đã được xác định từ cao chiết methanol của rong đỏ và rong nâu [3]. Tác dụng của các hợp chất này đã được chứng minh, chúng có hoạt tính kháng oxy hoá, kháng khuẩn, kháng vi nấm, kháng virus HIV, kháng ung thư...[4, 5] Hoạt động kháng oxy hóa đa chức năng của polyphenol là rất cao

liên quan đến vòng phenol hoạt động như một chất bẫy các gốc tự do peroxide, superoxide và các gốc hydroxyl [3]. Với mục tiêu hướng đến việc sử dụng các chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc tự nhiên thay thế phụ gia thực phẩm đồng thời làm gia tăng giá trị chức năng của thực phẩm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được tiến hành trên 4 loài rong nâu thu tại vùng biển Ninh Thuận và Khánh Hoà, ở dạng khô. Rong được rửa sạch, phơi/sấy khô, xay thành bột, sử dụng cho nghiên cứu. Các mẫu rong được định danh tại Phòng Thực vật bậc thấp, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên TP. HCM có tên khoa học là *Sargassum feldmannii* thu tại vùng biển Khánh Hoà, và *Sargassum gracile*, *Sargassum mcclurei*, *Sargassum polycystum* thu tại vùng biển Ninh Thuận.

Các phụ gia kháng oxy hoá sử dụng trong nghiên cứu là BHA (butylate hydroxyanisole), BHT (butylate hydroxytoluene), AscA (ascorbic acid), α -tocopherol của Công ty Shanghai Chemical Reagents (Shanghai, China).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Quy trình chiết bột rong thu cao chiết

Bột rong ngâm chiết trong hai loại dung môi ethanol 96% và nước bằng phương pháp ngâm kết hợp lắc ở các tỉ lệ nguyên liệu/dung môi và các nhiệt độ chiết khác nhau. Dịch chiết ở các điều kiện chiết khác nhau qua cô quay chân không thu cao ethanol (cao-Et) và cao nước (cao-Aq). Tỉ lệ thu hồi cao chiết (EY) có trong 100 g nguyên liệu tính theo công thức:

$$EY (\%) = \frac{M_E}{M_M} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: M_E : Khối lượng cao chiết, g

M_M : Khối lượng nguyên liệu rong, g

2.2.2. Xác định hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp Folin-Ciocalteu [2]

Dùng đường chuẩn acid gallic từ dung dịch acid gallic pha trong nước nồng độ 0,5 mg/ml, từ dung dịch gốc này pha thành dãy nồng độ 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 và 0,1 mg/ml. Đối với mẫu bột rong, cân m (g) trích ly và định mức

thành v (ml) với nước, lấy 1 ml để xác định polyphenol tổng. Trộn với 0,1 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu, sau 5 phút cho tiếp 0,3 ml Na_2CO_3 7,5%. Để trong tối 30 phút, ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm.

Hàm lượng polyphenol tổng có trong mẫu được tính dựa trên đường chuẩn acid gallic (C_M). Hàm lượng polyphenol tổng trong 1 g bột rong được tính theo công thức:

$$TPC (\text{mg/g}) = \frac{C_M \cdot V}{m} \quad (2)$$

2.2.3. Đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH [6]

Các mẫu cao chiết hoà tan trong methanol (MeOH) nồng độ 1000 $\mu\text{g/ml}$. Pha thành các dãy nồng độ 400, 350, 300, 250, 200 ($\mu\text{g/ml}$). Dung dịch tham chiếu Vitamin C 500 $\mu\text{g/ml}$, pha thành dãy nồng độ 30, 25, 20, 15, 10 ($\mu\text{g/ml}$). Dung dịch thuốc thử DPPH 1mM. Thực hiện phản ứng với 0,5 ml dịch mẫu ở mỗi nồng độ; 0,5 ml dung dịch DPPH và 3 ml MeOH. Để ổn định 30 phút trong bóng tối. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Tỉ lệ bắt gốc tự do DPPH (I%) của mẫu được tính theo công thức:

$$I (\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} * 100\% \quad (3)$$

Trong đó:

A_c – Độ hấp thụ của mẫu trắng (MeOH)

A_s – Độ hấp thụ của mẫu chiết

2.2.4. Xử lý số liệu

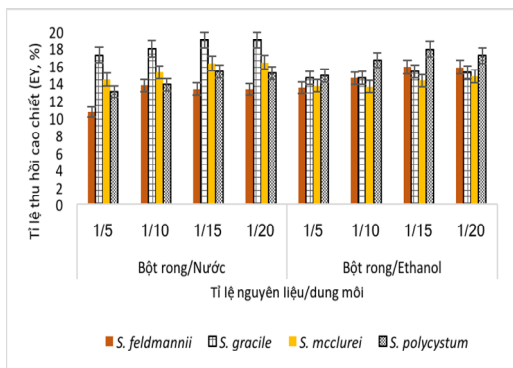
Tất cả số liệu được biểu diễn dưới dạng Trung bình \pm SD, các chênh lệch khác biệt thể hiện bằng ^{a, b, c, d} ở mức ý nghĩa $P < 0,05$. Sử dụng phần mềm xử lý số liệu Statgraphics Centurion XV.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện chiết

3.1.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

Chiết polyphenol thường sử dụng các dung môi phân cực như nước, ethanol, acetone, ethyl acetate... Trong nghiên cứu này hướng đến ứng dụng trong thực phẩm, nên chúng tôi dùng hai loại dung môi là nước và ethanol.



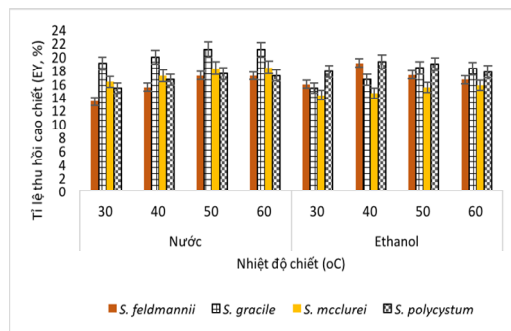
Hình 1: Biểu đồ ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến tỉ lệ thu hồi cao chiết

Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi càng nhỏ thì hiệu quả của quá trình chiết càng cao, lượng chất chiết thu được càng nhiều, do làm tăng quá trình khuếch tán của các chất tan bên trong tế bào ra ngoài dung môi chiết. Từ Hình 1 cho thấy ở cả bốn loại rong tỉ lệ nguyên liệu/dung môi càng nhỏ thì tỉ lệ thu hồi cao chiết càng tăng và đến một tỉ lệ nhất định chúng không tăng nữa. Đối với dung môi chiết là nước, rong *S. feldmannii* có tỉ lệ thu hồi cao chiết ở tỉ lệ bột rong/nước là 1/10 và 1/15 không khác biệt ở mức ý nghĩa $P < 0,05$ tương ứng là $13,70 \pm 0,46\%$ và $13,32 \pm 0,68\%$; các loại rong còn lại *S. gracile*, *S. mcclurei* và *S. polycystum* đều có tỉ lệ thu hồi cao chiết cao nhất ở tỉ lệ bột rong/nước là 1/15 và không khác biệt ở mức ý nghĩa $P < 0,05$ với tỉ lệ 1/20; tỉ lệ thu hồi cao chiết tương ứng với từng loại rong là $18,98 \pm 0,12\%$; $16,28 \pm 0,23\%$ và $15,35 \pm 0,36\%$. Đối với dung môi chiết ethanol thì cả bốn loại rong *S. feldmannii*, *S. gracile*, *S. mcclurei* và *S. polycystum* đều cho tỉ lệ thu hồi cao chiết cao nhất ở tỉ lệ bột rong/ethanol là 1/15 tương ứng $15,88 \pm 0,69\%$; $15,34 \pm 0,33\%$; $14,27 \pm 0,63\%$ và $17,86 \pm 0,71\%$. Các tỉ lệ nguyên liệu/dung môi quá nhỏ nghĩa là hàm lượng dung môi quá cao, sẽ khó khăn cho quá trình xử lý tách dung môi để thu cao chiết sau đó. Do đó, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15 được dùng cho cả hai loại dung môi và bốn loại nguyên liệu rong.

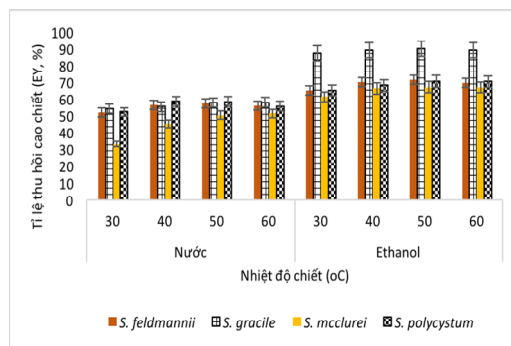
3.1.2. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Nhiệt độ chiết cần thích hợp để rút ngắn thời gian chiết cho hiệu suất chiết cao đồng thời không làm biến đổi các thành phần hoá học của

chất chiết, do đó nhiệt độ là yếu tố cần giới hạn. Nhiệt độ tăng làm tăng sự ngấm kiệt dung môi vào cấu trúc tế bào rong đồng thời làm tăng quá trình khuếch tán các chất tan từ trong nguyên liệu và dung môi chiết, nhưng trong trường hợp này chúng làm thúc đẩy phản ứng oxy hoá các polyphenol khi đó hàm lượng polyphenol tổng sẽ giảm, đây là điều không mong muốn trong quá trình trích ly.



Hình 2: Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến tỉ lệ thu hồi cao chiết



Hình 3: Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol tổng

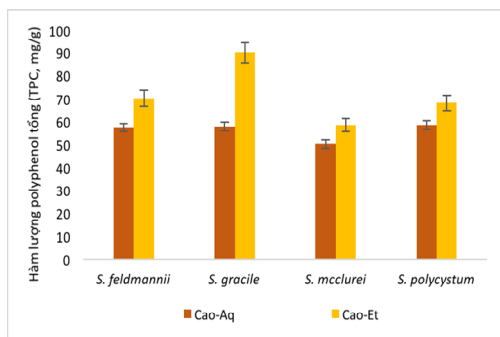
Từ Hình 2 cho thấy khi tăng nhiệt độ chiết thì tỉ lệ thu hồi cao chiết sẽ tăng theo, tuy nhiên ở nhiệt chiết 50°C và 60°C thì sự tăng tỉ lệ thu hồi cao chiết không khác biệt ở mức ý nghĩa $P < 0,05$ ở cả bốn loài rong, do đó nhiệt độ chiết đề xuất là 50°C đối với dung môi chiết là nước; tỉ lệ thu hồi cao chiết ở rong *S. feldmannii*, *S. gracile*, *S. mcclurei* và *S. polycystum* tương ứng là $17,22 \pm 0,51\%$; $20,98 \pm 0,22\%$; $18,28 \pm 0,23\%$ và $17,53 \pm 0,51\%$. Với dung môi ethanol ở rong *S. feldmannii* và *S. polycystum* cao nhất ở 40°C không khác biệt với 50°C và 60°C, tỉ lệ thu hồi cao chiết tương ứng $19,05 \pm$

0,14% và $19,23 \pm 0,52\%$; rong *S. gracile* và *S. mcclurei* cao nhất ở 50°C không khác biệt với 60°C, tỉ lệ thu hồi cao chiết tương ứng $18,34 \pm 0,33\%$ và $15,47 \pm 0,43\%$. Tuy nhiên, hiệu quả quá trình chiết dưới tác dụng của nhiệt độ chiết khác nhau dựa vào hai yếu tố đó là tỉ lệ thu hồi cao chiết và hoạt tính sinh học của chất chiết, trong nghiên cứu này hoạt tính sinh học được đánh giá dựa vào hàm lượng polyphenol tổng thể hiện ở Hình 3 cho thấy hàm lượng polyphenol tổng thu được cao tương ứng với tỉ lệ thu hồi cao chiết ở Hình 2 điều này cho thấy khoảng nhiệt độ chiết không làm thay đổi đáng kể đến hoạt tính polyphenol tổng thu được. Do đó, nhiệt độ chiết trong dung môi nước là 50°C cho cả bốn loại rong, chiết bằng dung môi ethanol nhiệt độ chiết 40°C cho hai loài *S. feldmannii* và *S. polycystum* và 50°C cho hai loài *S. gracile* và *S. mcclurei*.

3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết

3.2.1. Xác định hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết

Các hợp chất polyphenol được phân bố rộng rãi trong thực vật và thực phẩm, cấu trúc bao gồm nhiều vòng thơm với một hoặc nhiều nhóm hydroxyl. Hơn 1.000 cấu trúc khác nhau của các hợp chất phenolic được biết đến, hầu hết trong số đó là flavonoid, nhưng phenol đơn vòng, phenyl propanoid và quinine phenolic có mặt với số lượng đáng kể. Các hợp chất phenolic mang lại màu sắc đặc trưng cho thực vật, đóng vai trò kiểm soát sự tăng trưởng và bảo vệ khỏi các vi sinh vật và tạo ra vị đắng cho thực phẩm [7].

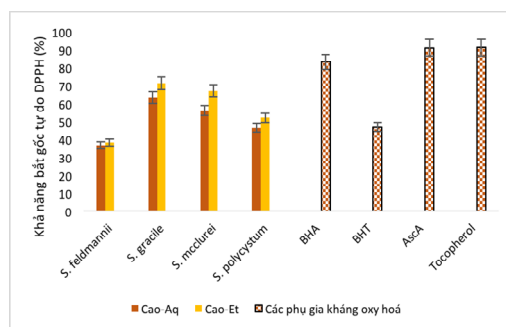


Hình 4: Biểu đồ hàm lượng polyphenol tổng của các loại cao chiết

Hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết trong nước nhìn chung thấp hơn so với cao chiết trong ethanol ở cả bốn loại rong, hàm lượng polyphenol tổng trong cao chiết rong *S. gracile* cao nhất so với các loài rong còn lại (Hình 4). So với các nghiên cứu đã công bố hàm lượng polyphenol tổng trong rong nâu dao động trong khoảng từ 0,4-24,2 g/100g chất chiết [7]; từ 1,07-105,97 mg/g chất chiết rong nâu thuộc giống *Turbinria* [5]; ở rong nâu *Ecklonia cava* thu dọc theo bờ biển đảo Jeju, Hàn Quốc hàm lượng polyphenol tổng 71,0 mg/g trong phân đoạn nước của cao chiết [8]; ở *S. siliquastrum* được thu thập tại Songjung, Busan, Hàn Quốc hàm lượng polyphenol tổng 127,37 mg/g với dung môi chiết ethanol 27,15 mg/g với dung môi chiết nước [9]. So với các số liệu công bố trên thì hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết nước ở cả bốn loại rong chiết trong nước thì cao hơn, tuy nhiên thành phần này ở cao ethanol thì thấp hơn.

3.2.2. Đánh giá khả năng kháng oxy hoá của cao chiết và so sánh với các phụ gia kháng oxy hoá

Gốc hydroxyl là một trong những thành phần tạo ra phản ứng in vivo mạnh nhất. Do đó, hiệu suất quét gốc hydroxyl là một chỉ số quan trọng để đo lường hiệu quả chống oxy hóa. Phương pháp DPPH để đo lường mức độ kết hợp chủ yếu của các hợp chất polyphenol và các hợp chất amin thơm. Trong nghiên cứu này, khả năng cho điện tử của cao chiết bốn loại rong được so sánh với BHA, BHT, acid ascorbic và tocopherol.



Hình 5: Biểu đồ khả năng bắt gốc tự do DPPH của cao chiết và các phụ gia kháng oxy hoá

Kết quả Hình 5 cho thấy rằng tác dụng quét gốc tự do DPPH của cao chiết có liên quan mật thiết đến hàm lượng polyphenol có trong cao chiết. Nhìn chung, hoạt tính quét gốc tự do DPPH của cao nước thấp hơn so với cao ethanol ở cả bốn loại rong; hoạt tính này cao nhất ở *S. gracile* thấp nhất là *S. feldmannii* so với *S. mcclurei* và *S. polycystum* cho cả hai loại dung môi chiết. Khả năng bắt gốc tự do DPPH của cao chiết ethanol của bốn loại rong *S. feldmannii*, *S. gracile*, *S. mcclurei* và *S. polycystum* so với phụ gia kháng oxy hoá tổng hợp BHA tương ứng là 45,73%, 85,48%, 80,54% và 62,58%; so với BHT tương ứng là 81,00%, 151,39%, 142,64% và 110,84%; với acid ascorbic tương ứng là 41,82%, 78,16%, 73,64% và 57,23%; và với tocopherol tương ứng là 41,73%, 77,99%, 73,48% và 57,10%. Từ các số liệu trên cho thấy khả năng bắt gốc tự do DPPH của cao chiết ethanol có khả năng kháng oxy hoá mạnh hơn phụ gia BHT cao nhất ở rong *S. gracile* tỉ lệ kháng mạnh hơn 151,39%; tỉ lệ kháng thấp nhất 41,73% ở rong *S. feldmannii*. So với các nghiên cứu đã công bố thì hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của các loại rong thu từ vùng biển Khánh Hoà và Ninh Thuận này thấp hơn [10-12]. Tuy nhiên, các kết quả trên cũng cho thấy cao chiết nước và cao chiết ethanol từ rong biển có thể được đề xuất thay thế cho các phụ gia kháng oxy hoá tổng hợp, đặt biệt đối với BHT.

4. KẾT LUẬN

Việc thu cao chiết từ rong nâu để tập trung hàm lượng polyphenol cao với mục đích bổ sung vào một số sản phẩm thực phẩm nhằm thay thế các phụ gia kháng oxy hoá tổng hợp đồng thời làm gia tăng giá trị chức năng của thực phẩm. Chúng tôi thu được các điều kiện chiết để thu tỉ lệ chất chiết cao như sau: Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15 cho cả hai loại dung môi (nước và ethanol) ở cả bốn loại rong *S. feldmannii*, *S. gracile*, *S. mcclurei* và *S. polycystum*. Nhiệt độ chiết trong nước là 50°C cho cả bốn loại rong; chiết trong ethanol thì 50°C cho rong *S. gracile*, *S. mcclurei* và 40°C cho *S. feldmannii* và *S. polycystum*. Hoạt tính kháng oxy hoá của rong nâu được đánh giá dựa

vào hàm lượng polyphenol tổng và khả năng bắt gốc tự do DPPH. Hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết trong nước thấp hơn so với cao chiết trong ethanol ở cả bốn loại rong, hàm lượng polyphenol tổng trong cao chiết rong *S. gracile* cao nhất ($90,01 \pm 1.01$ mg/g). Hoạt tính quét gốc tự do DPPH của cao nước thấp hơn so với cao ethanol ở cả bốn loại rong; hoạt tính này cao nhất ở *S. gracile* ($71,23 \pm 0,39\%$) thấp nhất là *S. feldmannii* ($38,11 \pm 0,12\%$) cho cả hai loại dung môi chiết. Điều này cho thấy mối tương quan giữa hoạt động chống oxy hóa và hàm lượng hợp polyphenol tổng. So sánh khả năng kháng oxy hoá của cao chiết với các phụ gia kháng oxy hoá tổng hợp BHA, BHT, acid ascorbic và tocopherol, tỉ lệ kháng mạnh nhất là 151,39% với BHT ở rong *S. gracile*, cao chiết các loại rong còn lại *S. feldmannii*, *S. mcclurei* và *S. polycystum* trong dung môi chiết nước hoặc ethanol đều cho khả năng kháng trong khoảng 40-90% ở cùng nồng độ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. R-B. de Quirós, M.A. Lage-Yusty and J. López-Hernández, *Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption*, Food Chemistry, **121(2)**, 634-638 (2010).
2. R. Keyrouz, et al., *Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany*, Food Chemistry, **126(3)**, 831-836 (2011).
3. T. Wang, R. Jónsdóttir and G. Ólafsdóttir, *Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds*, Food Chemistry, **116(1)**, 240-248 (2009).
4. Y.-X. Li, et al., *Phlorotannins as bioactive agents from brown algae*, Process Biochemistry, **46(12)** 2219-2224 (2011).
5. K. Chakraborty, et al., *Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to Turbinaria spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, **3(1)**, 8-16 (2013).

6. T.N. Đoàn, cs., *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội (2006).
7. T. Wang, R. Jónsdóttir and G. Ólafsdóttir, *Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds*, *Food Chemistry*, **116(1)**, 240-248 (2009).
8. H. Lee, et al., *Antimetastatic activity of polyphenol-rich extract of Ecklonia cava through the inhibition of the Akt pathway in A549 human lung cancer cells*, *Food Chemistry*, **127(3)**, 1229-1236 (2011).
9. S. H. Cho, et al., *The antioxidant properties of brown seaweed (Sargassum siliquastrum) extracts*, *Journal of Medicinal Food*, **10(3)**, 479-485 (2007).
10. S. J. Heo, et al., *Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds*, *Bioresource technology*, **96(14)**, 1613-1623 (2005).
11. P. A. Hwang, et al., *Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed Sargassum hemiphyllum*, *Journal of Marine Science and Technology*, **18(1)** (2010).
12. H. Y. Luo, et al., *Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China*, *Journal of Medicinal Plants Research*, **4(18)**, 2557-2565 (2010).

PHÂN LẬP MỘT SỐ HỢP CHẤT FLAVONOID TỪ LÁ CÂY..... (Tiếp theo Tr. 75)

2. Bentz, A.B. (2009), "A review of quercetin: Chemistry, antioxidant properties, and bioavailability" *Journal of young investigators*. Vol 19 (10), pp. 1131-1137.
3. Chueahongthong, F., Ampasavate, C., Okono, S., Tima, S., Anuchapreeda, S. (2011), "Cytotoxic effects of crude kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) leaf fractional extracts on leukemic cell lines". *J. Med. Plant. Res*, Vol 5(14), pp. 3097-3105.
4. [Deepak Kumar Semwal](#), [Ruchi Badoni Semwal](#), [Sandra Combrinck](#) and [Alvaro Viljoen](#) (2016), "Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities" *Journal List, Nutrients*, Vol 8 (2).
5. Elsa Dilla Dertyasasa and Woro Anindito Sri Tunjung (2017), "Volatile Organic Compounds of Kaffir Lime (*Citrus hystrix* DC.) Leaves Fractions and their Potency as Traditional Medicine" *Biosciences Biotechnology research Asia*, Vol. 14(4), pp.1235-1250
6. Lilis Siti Aisyah , Yenny Febriani Yun , Tati Herlina , Euis Julacha , Achmad Zainuddin , Ida Nurfarida , Ace Tatang Hidayat, Unang Supratman and Yoshihito Shiono (2017), "Flavonoid Compounds from the Leaves of *Kalanchoe prolifera* and Their Cytotoxic Activity against P-388 Murine Leukimia Cells" *Natural Product Sciences*, Vol. 23, No. 2, pp.139-145.
7. Si, C. L., Huang, X. F., An, L. L., Fan, S., Liu, C. Y., Xie, D. N., Hong, Y. M., and Chen, J. (2015), "Extraction and structural characterization of flavonoids from twigs of *Sophora japonica*," *BioRes*, Vol 10(4), pp. 8397-8404.
8. Tunjung, W.A.S., Cinatl Jr., J., Michaelis, M., Smales, C.M. (2015), "Anti-cancer effect of kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) leaf extract in cervical cancer and neuroblastoma cell lines". *Procedia Chem*, Vol 14, pp. 465-468.