



## KHẢO SÁT HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO TRÊN CAO CHIẾT CỦA LOÀI HẢI MIÊN *Xestospongia testudinaria*

Lưu Vũ Phương và Tôn Nữ Liên Hương\*

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Tôn Nữ Liên Hương (email: tnluong@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 29/04/2022

Ngày nhận bài sửa: 18/05/2022

Ngày duyệt đăng: 30/05/2022

### Title:

Investigating the cytotoxic activity of *Xestospongia testudinaria* extracts

### Từ khóa:

*Artemia salina*, brine shrimp assay, dòng tế bào KB, dòng tế bào MCF-7, gây độc tế bào

### Keywords:

*Artemia salina*, brine shrimp assay, cytotoxicity, KB cell line, MCF-7 cell line

### ABSTRACT

Sponge species contain unique secondary metabolites that are known to exhibit significant biological properties, and can be used for various applications. In this study, sponge species was collected off the coast of the Phu Quoc sea, Vietnam, and taxonomically identified as *Xestospongia testudinaria*. The sponge sample was exhausted macerated with ethanol 96° and removed solvent to give the residue. The major amount of alcoholic residue was partitioned by the liquid-liquid extracted method with *n*-hexane, dichloromethane, respectively, to produce the different polarity extracts. After using evaporator equipment on the extracts, the residues were formed and symbolized as:  $ex_{Total\ EtOH}$ ,  $ex_{n-Hex}$ ,  $ex_{DC}$ ,  $ex_{remaining\ EtOH}$ . The sponge extracts were investigated for cytotoxicity by the Brine-shrimp testing (*Artemia salina*), 3 out of 4 samples were well inhibited, which are the total EtOH extract, dichloromethane extract, and the remaining ethanol extract, with  $LC_{50}$  less than 50  $\mu\text{g/mL}$ . In addition, the extracts of this species including dichloromethane, total ethanol, and remaining ethanol exhibited cytotoxic activity on the cancer cell lines: KB, MCF-7 with  $IC_{50}$  values ranging from  $128 \pm 3.5$   $\mu\text{g/mL}$  to  $363.98 \pm 20.43$   $\mu\text{g/mL}$ .

### TÓM TẮT

Hải miên là loài chứa các chất chuyển hóa thứ cấp đặc biệt, có hoạt tính sinh học đáng kể và có thể sử dụng cho các ứng dụng khác nhau. Trong nghiên cứu này, loài hải miên được thu lấy ngoài khơi biển Phú Quốc, Việt Nam và được định danh là *Xestospongia testudinaria*. Mẫu hải miên được chiết kiệt bằng ethanol 96°, thu cao EtOH tổng. Lượng lớn cao tổng được chiết phân bổ lần lượt bởi *n*-hexane, dichloromethane để tạo các dịch chiết có độ phân cực khác nhau. Dùng thiết bị cô quay từ dịch chiết thu được các cao ký hiệu là: EtOH tổng, *n*-Hex, DC, EtOH còn lại. Các cao chiết từ hải miên đã được nghiên cứu về gây độc tế bào khi sử dụng ấu trùng tôm nước mặn (*Artemia salina*), trong số 4 mẫu thử có 3 mẫu ức chế tốt *Artemia salina*. Đó là các mẫu cao ethanol tổng, cao dichloromethane, cao ethanol còn lại với  $LC_{50} < 50$   $\mu\text{g/mL}$ . Ngoài ra, cao chiết dichloromethane, ethanol tổng và ethanol còn lại của loài hải miên này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào KB và MCF-7 với giá trị  $IC_{50}$  từ  $128 \pm 3,5$   $\mu\text{g/mL}$  đến  $363,98 \pm 20,43$   $\mu\text{g/mL}$ .

## 1. GIỚI THIỆU

Với khí hậu nhiệt đới gió mùa và có đường bờ biển dài hơn 3.200 km chạy dọc lãnh thổ, Việt Nam có hệ sinh thái phong phú đa dạng, đặc biệt nhất là hệ sinh thái biển. Bên cạnh nguồn lợi thủy hải sản tự nhiên và nuôi trồng được xem là nguồn thực phẩm quan trọng trong đời sống, vùng biển còn có nguồn dược liệu tiềm năng với hơn 12.000 loài sinh vật cư trú. Trong số đó, hải miên có đến hơn 160 loài sống ở tầng đáy biển. Hải miên là loài được rất nhiều các nhà khoa học trên thế giới quan tâm vì thành phần hóa học độc đáo của chúng. Nhiều nghiên cứu gần đây đã phân lập được nhiều hợp chất mới từ hải miên *Xestospongia testudinaria* (alkaloid, quinone, terpenoid, steroid và dẫn xuất brom của các acetylenic acid) (Laport et al., 2009). Các hợp chất phân lập được từ hải miên *Xestospongia* thể hiện hoạt tính sinh học quan trọng như: kháng khuẩn, gây độc tế bào, ức chế enzyme tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), tác động giãn mạch ở người, ... (He et al., 2016). Trong đó, hoạt tính đặc biệt là ức chế tế bào ung thư *in vitro*: Các hợp chất phân lập từ loài hải miên thu hoạch tại biển Trung Quốc gây độc tế bào ung thư gan và ung thư cổ tử cung ở người, với giá trị IC<sub>50</sub> từ 2,91 - 12,40 µg/mL (Sun et al., 2012).

Nội dung bài báo này trình bày kết quả khảo sát khả năng gây độc tế bào với ấu trùng *Artemia salina*, tế bào ung thư biểu mô KB và ung thư vú (MCF-7) ở người, từ đó, cung cấp thêm chứng cứ khoa học về hoạt tính sinh học của loài hải miên *Xestospongia testudinaria* – một loài dễ khai thác, được thu gom tại vùng biển phía Tây Nam, Việt Nam.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương tiện, vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật liệu: hải miên thuộc chi *Xestospongia*, tên là loài *Xestospongia testudinaria*, được thu gom tại độ sâu 10 m vùng biển Kiên Giang, Việt Nam, ở tọa độ N 09°58'17.8"(E 104°01'.34.4"). Hải miên được định danh dựa trên đặc điểm hình thái giải phẫu của cấu trúc khung xương và trâm xương theo hướng dẫn của Hooper. Cấu trúc khung xương và thành phần gai xương được quan sát dưới kính hiển vi quang học ACCU-Scope EXC 350, với độ phóng đại từ 4 đến 40 lần. Hải miên được định danh bởi Tiến sĩ Thái Minh Quang - phòng Nguồn lợi Thủy sinh, Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Mẫu tiêu bản số SP02-2018, lưu tại phòng thí nghiệm Hóa Hữu cơ 2, Khoa Khoa học Tự nhiên (KHTN), Trường Đại học Cần Thơ.



**Hình 1. Mẫu hải miên *Xestospongia testudinaria***

Dung môi ethanol, dichloromethane, *n*-hexane, (Chemsol, Việt Nam) và hóa chất dùng thử hoạt tính gây độc tế bào: MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium), DMSO (Merck), methanol (Merck). Chất hấp phụ Diaion HP-20 (Sigma-Aldrich). Bộ cô quay Heidolph, máy UV-Vis (Biotek), các dụng cụ phân tích vi sinh, micropipette và eppendorf. Môi trường dinh dưỡng như: DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) và MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) có bổ sung 7 - 10% FBS (Fetal Bovine Serum).

Ấu trùng *Artemia salina* được cung cấp bởi bộ môn Thủy sinh học Ứng dụng - Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Dòng tế bào ung thư biểu mô KB (CCL - 17<sup>TM</sup>) và ung thư vú (MCF-7) có nguồn gốc từ bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu nguyên liệu và chiết cao ethanol tổng được thực hiện định danh khoa học mẫu nguyên liệu và chiết cao ethanol tổng, sau đó loại muối trong cao chiết bằng sắc ký cột đảo với chất hấp phụ Diaion HP-20; chiết lỏng-lỏng để phân đoạn cao có độ phân cực khác nhau. Quá trình này được thực hiện tại khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

Thử nghiệm gây độc tế bào với ấu trùng *Artemia salina* được thực hiện tại khoa KHTN, Trường Đại học Cần Thơ.

Thử nghiệm gây độc tế bào với tế bào ung thư biểu mô KB được thực hiện tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### 2.2.1. Điều chế cao chiết

Mẫu hải miên *Xestospongia testudinaria* sau khi thu về được rửa thật sạch để ráo, tiếp theo ngâm đêm, chiết kiệt với dung môi ethanol 96°. Dịch ethanol sau khi cô quay loại bớt dung môi được loại muối qua cột Diaion. Chiết lỏng-lỏng để phân đoạn với các dung môi có độ phân cực khác nhau và cô đặc dung dịch, thu được các cao chiết, gồm: cao *n*-

hexane (cao Hex), cao dichoromethane (cao DC) và cao ethanol còn lại (EtOH còn lại) (Phụng, 2007).

2.2.2. *Khảo sát hiệu quả gây độc với ấu trùng Artemia salina*

Thử nghiệm gây độc với ấu trùng tôm nước mặn (*Artemia salina*) được dựa theo công bố của Meyer (Meyer et al., 1982) và Krishnaraju (Krishnaraju et al., 2005). Đây là một thử nghiệm sinh học đơn giản trong nghiên cứu hợp chất thiên nhiên giúp xác định giá trị LC<sub>50</sub> với các dòng tế bào.

Thí nghiệm được bố trí với mỗi lần dùng 20 ấu trùng *Artemia salina* trong 4,5 mL nước muối, sau đó thêm vào 0,5 mL cao chiết (ở nồng độ 10, 100, 1000 µg/mL) được pha trong dung dịch nước muối 38‰ (đối chứng âm) để thu được 5 mL dung dịch. Kết quả thu sau 24 giờ và được lặp lại 3 lần. Mẫu cao có giá trị LC<sub>50</sub> ≤ 200 µg/mL được xem là dương tính với thử nghiệm.

Giá trị % ức chế được xác định theo công thức:

$$\% \text{ Deaths} = [(test - control)/test] \times 100 \%$$

Trong đó:

*Test*: số ấu trùng khảo sát ban đầu.

*Control*: số ấu trùng sống sót sau 24h khảo sát.

Giá trị LC<sub>50</sub> được xác định thông qua giá trị % ức chế ấu trùng phát triển và phần mềm máy tính Microsoft Excel 16.0. LC<sub>50</sub> được suy ra từ đường chuẩn hồi quy tuyến tính phù hợp nhất.

2.2.3. *Khảo sát hiệu quả gây độc tế bào với dòng tế bào ung thư biểu mô KB và ung thư vú (MCF-7)*

Phương pháp gây độc tế bào được mô tả lần đầu tiên năm 1983 bởi Mosman và cộng sự (Mosman et al., 1983). Đây là phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành phức hợp formazan (màu tím) bởi hoạt động của enzyme dehydrogenase trong ty thể.

Mẫu thử (cao chiết) được hòa tan bằng dung môi DMSO với nồng độ ban đầu là 20 mg/mL. Tiến hành pha loãng 2 bước trên đĩa 96 giếng thành 5 dãy nồng độ từ cao xuống thấp. Nồng độ chất thử trong đĩa thử nghiệm tương ứng là 512, 128, 32, 8 và 2 µg/mL. Chất tham chiếu Ellipticine được pha trong DMSO với nồng độ 0,01 mM. Sau đó hút 10 µL chất thử đã chuẩn bị ở trên và 190 µL dung dịch tế bào. Đối chứng dương của thí nghiệm là môi trường có chứa tế bào, đối chứng âm chỉ có môi trường nuôi cấy. Đĩa thí nghiệm được ủ ở điều kiện tiêu chuẩn trong 72 giờ. Sau 72 giờ mỗi giếng thí nghiệm được tiếp tục ủ với 10 µL MTT (5 mg/mL) trong 4 giờ. Sau khi loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng

100 µL DMSO 100%. Kết quả thí nghiệm được xác định bằng giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm trên máy quang phổ Biotek. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

*Xử lý kết quả thực nghiệm:*

Giá trị IC<sub>50</sub> được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$IC_{50} = High_{Conc} - \frac{(High_{Inh\%} - 50) \times (High_{Conc} - Low_{Conc})}{High_{Inh\%} - Low_{Inh\%}} \quad (1)$$

$$\% \text{ ức chế tế bào} = \frac{OD_{chứng (+)} - OD_{mẫu thử}}{OD_{chứng (+)} - OD_{chứng (-)}} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

*High<sub>Conc</sub>/Low<sub>Conc</sub>*: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp.

*High<sub>Inh%</sub>/Low<sub>Inh%</sub>*: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp.

Chất tham chiếu Ellipticine cho khả năng ức chế dòng tế bào ung thư biểu mô KB với giá trị IC<sub>50</sub> = 0,31±0,05 µg/mL.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. *Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào với ấu trùng Artemia salina*

Sau khi đếm ấu trùng còn sống sau 24 giờ khảo sát, thí nghiệm được lặp lại với ấu trùng tôm nước mặn 3 lần, thu được số liệu và giá trị trung bình phần trăm ức chế ấu trùng *Artemia salina* của các cao chiết được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1. Giá trị trung bình phần trăm ức chế ấu trùng *Artemia salina***

Cao chiết	Phần trăm ức chế (%)			LC <sub>50</sub> (µg/mL)
	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL	
EtOH tổng	48,33	70,00	95,00	45,46
Hex	36,67	45,00	66,67	--
DC	65,00	96,67	100	3,27
EtOH còn lại	55,00	88,33	96,67	5,88
Đối chứng (-)	0,00	0,00	0,00	--

(--) Không dương tính với thử nghiệm Brine-shrimp

Cao chiết hải miên *Xestospongia testudinaria* được thử hoạt tính *in vitro*, kết quả thu được (Bảng 1) cho thấy rằng cao DC cho kết quả thử nghiệm tốt nhất với giá trị LC<sub>50</sub> là 3,27 µg/mL. Khi so sánh với các chất chuẩn dùng trong phương pháp của Meyer, cho thấy giá trị ức chế của mẫu cao DC mạnh gấp 6,88 lần của berberine chloride (LC<sub>50</sub> = 22,5 µg/mL), gấp 46,18 lần digitalin (LC<sub>50</sub> = 151 µg/mL), gấp

65,75 lần strophanthin ( $LC_{50} = 215 \mu\text{g/mL}$ ) và gấp 93,58 lần caffeine ( $LC_{50} = 306 \mu\text{g/mL}$ ) (Meyer et al., 1982). Các cao EtOH tổng và cao EtOH còn lại cũng cho kết quả dương tính trong thử nghiệm với giá trị  $LC_{50}$  lần lượt là 45,46  $\mu\text{g/mL}$  và 5,88  $\mu\text{g/mL}$ .

Trong cùng chi *Xestospongia*, các thử nghiệm trên hải miên *Xestospongia testudinaria* này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh rõ rệt so với các loài khác. Khi so sánh với các số liệu đã công bố trong khảo sát với loài khác, hoạt tính gây độc tế bào của cao DC trong hải miên *Xestospongia testudinaria* mạnh hơn loài *Xestospongia* sp. khoảng 55 lần ( $LC_{50} = 182,31 \mu\text{g/mL}$ ) và mạnh hơn loài *Xestospongia exigua* khoảng 175 lần ( $LC_{50} = 574,58 \mu\text{g/mL}$ ) (Abdillah et al., 2013). Có thể lý giải điều này dựa vào nghiên cứu của hai nhóm tác giả trên hải miên *Xestospongia testudinaria*, nhóm hợp chất acetylenic acid có brom được phát hiện với tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế HIV-1 và gây độc các dòng tế bào (Quinn et al., 1991; Carballeira et al., 1993).

Nhìn chung, các cao chiết của hải miên *Xestospongia testudinaria* đều cho kết quả rất tốt về hoạt tính gây độc tế bào với ấu trùng *Artemia salina*. Số ấu trùng chết đã thể hiện khả năng ức chế sinh vật sống (thử nghiệm *in vitro*), phù hợp cách dự đoán độc tính của cao chiết trên tế bào ung thư theo nghiên cứu của Abdillah và cộng sự năm 2013 (Abdillah et al., 2013).

### 3.2. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư biểu mô (KB) và ung thư vú (MCF-7)

Từ kết quả thử nghiệm *Brine shrimplà* mô hình đánh giá sơ bộ khả năng gây độc tế bào ung thư đạt được, đề tài mở rộng nghiên cứu bằng cách khảo sát trên dòng tế bào ung thư cụ thể. Kết quả thử nghiệm *in vitro* gây độc tế bào ung thư biểu mô KB và ung thư vú (bằng phương pháp so màu MTT) của 3 loại cao chiết từ loài *Xestospongia testudinaria* được khảo sát ở 5 nồng độ khác nhau và xác định được cao DC có hoạt tính này với khả năng áp dụng thực tế. Kết quả được trình bày tóm tắt ở Bảng 2 và Bảng 3.

**Bảng 2. Giá trị trung bình phần trăm (%) gây độc tế bào ung thư biểu mô KB**

Cao chiết	Phần trăm gây độc tế bào (%) theo nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )					$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	512	128	32	8	2	
EtOH tổng	34,0	14,0	0	0	0	> 512
DC	76,0	50,0	21,0	0	0	128±3,5
EtOH còn lại	65,0	34,0	0	0	0	326,19±8,95

**Bảng 3. Giá trị trung bình phần trăm (%) gây độc tế bào ung thư vú (MCF-7)**

Cao chiết	Phần trăm gây độc tế bào (%) theo nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )					$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	512	128	32	8	2	
EtOH tổng	28,0	19,0	7,0	0	0	> 512
DC	32,0	18,0	11,0	1,0	0	> 512
EtOH còn lại	59,5	35,0	9,0	0	0	363,98±20,43

Kết quả *in vitro* cho thấy trừ cao *n*-hexane, hầu hết các cao đang khảo sát đều có khả năng ức chế 2 dòng tế bào ung thư, hoàn toàn phù hợp với thử nghiệm gây độc tế bào trên ấu trùng *Artemia salina*. Phần trăm gây độc tế bào KB (ung thư biểu mô) và MCF-7 (ung thư vú trên người) được đánh giá với nồng độ thử nghiệm từ 8 đến 512  $\mu\text{g/mL}$ , luôn tăng rõ rệt và xác định được  $IC_{50}$ .

Đối với các cao có ức chế tế bào ung thư, cao DC gây độc tế bào một cách chọn lọc, ức chế tế bào KB mạnh hơn MCF-7, giá trị  $IC_{50} = 128 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$ ; cao EtOH còn lại có hiệu quả ở mức trung bình ( $IC_{50}$  là 326,19±8,95  $\mu\text{g/mL}$  trên tế bào KB; và 363,98±20,43  $\mu\text{g/mL}$  trên tế bào MCF-7); cao EtOH tổng có hoạt tính yếu tại nồng độ 512  $\mu\text{g/mL}$ .

Theo một công bố về phân lập chất từ hải miên *Xestospongia testudinaria*, hợp chất tên là langosterol cùng một sterol khác thể hiện hoạt tính trên cả 3 dòng tế bào ung thư ở người gồm: A549 (ung thư phổi), MCF-7 (ung thư vú) và Hela (ung thư cổ tử cung) với  $IC_{50}$  từ 29,0 đến 68,0  $\mu\text{M}$  (Hien et al., 2019).

Thông thường, các thử nghiệm xác định độc tính tế bào trên chất tinh khiết sau khi được phân lập luôn có kết quả tốt hơn hỗn hợp, cụ thể giá trị  $IC_{50}$  luôn nhỏ hơn của cao chiết thô. Đối với loài hải miên này, các cao chiết cho kết quả ức chế trên 2 dòng tế bào ung thư MCF-7 và KB với  $IC_{50}$  từ 363,98±20,43  $\mu\text{g/mL}$  đến 128±3,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Những kết quả khảo sát về hoạt tính gây độc sơ bộ và *in vitro* cụ thể trên 2 dòng tế bào ung thư đã

chúng tỏ hải miên *Xestospongia testudinaria* là một trong những nguồn nguyên liệu tiềm năng ức chế tế bào ung thư, cần được khai thác để phân lập chất và ứng dụng trong đời sống.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào trên các cao chiết có độ phân cực khác nhau của loài hải miên *Xestospongia testudinaria* đã cho những kết quả bước đầu rất khả quan. Trong số 4 cao thử nghiệm *Brine-shrimp*, có 3 loại đều gây chết ấu trùng tôm nước mặn, với giá trị  $LC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$  gồm: cao ethanol tổng, cao dichloromethane và cao ethanol còn lại (sau khi tách loại các chất phân cực trung bình). Cụ thể, cao dichloromethane có độc tính tế bào tốt nhất ( $LC_{50} = 3,27 \mu\text{g/mL}$ ), kế đó là cao ethanol còn lại ( $LC_{50} = 5,88 \mu\text{g/mL}$ ).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdillah, S., Nurhayati, A. P. D., Nurhatika, S., Setiawan, E., & Heffen, W. L. (2013). Cytotoxic and antioxidant activities of marine sponge diversity at Pecaron Bay Pasir Putih Situbondo East Java, Indonesia. *Journal of pharmacy research*, 6(7), 685-689. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.07.001>
- Carballeira, N. M., & Emiliano, A. (1993). Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Agelas sp.* *Lipids*, 28(8), 763-766. <https://doi.org/10.1007/BF02536001>
- He, W. F., Xue, D. Q., Yao, L. G., Li, J., Liu, H. L., & Guo, Y. W. (2016). A new bioactive steroidal ketone from the South China Sea sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of Asian natural products research*, 18(2), 195-199. <https://doi.org/10.1080/10286020.2015.1056521>
- Hien M. N., Takuya I., Nwet N. W., Hung Q. V., Hoai T. N., Morita H. (2019). A new sterol from the Vietnamese marine sponge *Xestospongia testudinaria* and its biological activities. *Journal of Natural Product Research*, 33(8), 1175-1181. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1465057>
- Krishnaraju, A. V., Rao, T. V. N., Sundararaju, D., Vanisree N., Tsay H. S., & Subbaraju G. V. (2005). Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *International Journal of applied science and engineering*, 3(2), 125-134.
- Laport, M. S., Santos, O. C. S., & Muricy, G. (2009). Marine sponges: potential sources of new

antimicrobial drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(1), 86-105. <https://doi.org/10.2174/138920109787048625>

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. J., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45(05), 31-34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

Mosmann, T. J. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Phụng, N. K. P. (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Quinn, R. J., & Tucker, D. J. (1991). Further acetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of natural products*, 54(1), 290-294. <https://doi.org/10.1021/np50073a037>

Sun, L. L., Shao, C. L., Chen, J. F., & Guo, Z. (2012). New bisabolane sesquiterpenoids from a marine-derived fungus *Aspergillus sp.* isolated from the sponge *Xestospongia testudinaria*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(3), 1326-1329. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.083>

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài sinh viên nghiên cứu khoa học (mã số TSV2021-53), Bộ môn Hóa học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Bên cạnh đó, nghiên cứu được TS. Thái Minh Quang (Viện Hải dương học Nha Trang) hỗ trợ định danh các loài hải miên. Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn.