Sử dụng kết hợp CIDR, $PGF_2\alpha$ và GnRH xử lý cho bò chậm động dục, tỷ lệ đậu thai sau 3 lần gieo tinh trên số xử lý là 80,00% đối với bò sinh sản và 83,33% đối với bò tơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chung Anh Dũng** (2006). Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật đề tài: Nghiên cứu bệnh sinh sản, viêm vú bò sữa và xác định giải pháp phòng trị. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam.
2. **Nguyễn Ngọc Hải, Chế Minh Tùng, Nguyễn Kiên Cường và Phí Như Liễu** (2017). Đánh giá khả năng sinh sản và nghiên cứu ứng dụng giải pháp hormone để khắc phục bệnh chậm sinh ở bò Brahman thuần nhập nội. Tạp chí KHCN Chăn nuôi, **76**(6/2017): 84-90.
3. **Phí Như Liễu, Nguyễn Văn Tiến và Hoàng Thị Ngân** (2017). Kết quả lai tạo và nuôi dưỡng bê lai hướng thịt tại An Giang. Tạp chí KHCN Chăn nuôi, **76**(6/2017): 91-99.
4. **Tăng Xuân Lưu, Trần Thị Loan, Nguyễn Hữu Cường, Sử Thanh Long, Cù Xuân Dần, Trần Tiến Dũng và Nguyễn Thị Thoa** (2014). Ảnh hưởng của mùa vụ, lứa đẻ và thể trạng đến hoạt động của buồng trứng bò sữa sau đẻ 120 ngày nuôi tại Ba Vì, Hà Nội. Tạp chí KHPT, **12**(5): 738-44.
5. **Hoàng Nghĩa Sơn** (2012). Điều trị chậm động dục ở bò sữa bằng hormone sinh sản. Tạp chí Sinh học, **34**(3): 306-12.
6. **Stevenson J.S., Pulley S.L. and Hill S.L.** (2014). Pregnancy outcomes after change in dose delivery of prostaglandin F2α and time of gonadotropin-releasing hormone injection in a 5-day timed artificial insemination program in lactating dairy cows. J. Dai. Sci., **97**(12): 7586-94.
7. **Nguyễn Ngọc Tấn và Bùi Ngọc Hùng** (2017). Ứng dụng hormone xử lý bò chậm gieo tinh khu vực Tp. Hồ Chí Minh và Bình Dương. Tạp chí KHKT Chăn nuôi, **216**(02): 67.
8. **Đoàn Đức Vũ, Phạm Văn Quyến và Nguyễn Thị Thủy Tiên** (2016). Sử dụng liệu pháp hormone để xử lý trục trặc sinh sản ở bò sữa. Tạp chí KHCN Chăn nuôi, **67**(9/2016): 78.

HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CAO CHIẾT TỪ LÁ MẬT GẤU TRÊN VI KHUẨN *P. AERUGINOSA VÀ S. AUREUS*

Nguyễn Vĩ Nhân[1]*

Ngày nhận bài báo: 01/12/2021 - Ngày nhận bài phản biện: 21/12/2021

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 30/12/2021

TÓM TẮT

Đề tài khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết từ lá cây Mật gấu (*Vernonia amygdalina*) trên vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus aureus*. Thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán qua giấy lọc trên môi trường Luria Broth (LB) và pha loãng trên đĩa tiệt trùng 96 giếng. Nồng độ cao được pha loãng trong Dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 mg/ml. Kết quả cho thấy sự kháng khuẩn trên cao Ethanol, Ethyl acetate, Buthanol. Thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao Ethanol, Ethyl acetate, Buthanol bằng dãy nồng độ 5, 10, 20, 40, 80 mg/ml. Kết quả thí nghiệm cho thấy sau khi đo OD lúc 0 giờ và 24 giờ, nồng độ ức chế tối thiểu lên *Pseudomonas aeruginosa* là 80 mg/ml ở cao chiết Buthanol.

Từ khóa: *Cây Mật gấu, kháng khuẩn, P. aeruginosa, S. aureus.*

ABSTRACT

The antimicrobial activity of *Vernonia amygdalina* leaf's extracts on *P. aeruginosa* and *S. aureus*

This study surveyed antibacterial activities of *Vernonia amygdalina* on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) was examined by disk diffusion method in Luria Broth and sterile disk 96 holes dilution method. Concentrations of the extracts were diluted in Dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 mg/ml. The results showed that antibacterial activities on Ethanol, Ethyl acetate, Buthanol. The experiment was to discover the MIC of Ethanol, Ethyl acetate, Buthanol extracts by using the concentration ranges of 5, 10, 20, 40, 80 mg/ml. At 0 hours and 24hrs OD measurements, the MIC at 80 mg/ml of Buthanol extract on *P. aeruginosa*.

Keywords: *Vernonia amygdalina, Antibacterial activity, P. aeruginosa, S. aureus.*

[1] Trường Đại học Tiền Giang

* Tác giả liên hệ: Ths. Nguyễn Vĩ Nhân, Giảng viên, Khoa Nông Nghiệp - Trường Đại học Tiền Giang. Điện thoại: 0901210677; E-mail: nguyenvinhan@tgu.edu.vn

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Mật gấu (*Vernonia amygdalina*) còn gọi là cây Lá đắng, thuộc chi Cúc bạc đầu (*Vernonia*), họ Cúc (Asteraceae), bộ Asterales, ngành thực vật hạt kín. Cây Mật gấu phân bố chủ yếu ở các quốc gia vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, trong đó có Đông Nam Á. Các chiết xuất từ cây Mật gấu có hoạt tính kháng khuẩn mạnh với một số loài vi sinh vật gây bệnh (Ojieze và ctv, 2011). Cây Mật gấu có chứa acid ascorbic và caroteinoid (Ijeh và Ejike, 2011). Vị đắng của cây là do các yếu tố như alkaloid, saponin, tanin và glycoside (Bonsi và ctv, 1995). Lá cây Mật gấu có thể được tiêu thụ như một loại rau, chất chiết xuất được sử dụng làm thuốc bổ để điều trị bệnh khác nhau (Igile và ctv, 1995) và có hiệu quả chống lại bệnh lỵ amip, rối loạn tiêu hóa, chống ký sinh trùng (Akinpelu, 1999; Moundipa và ctv, 2000).

Pseudomonas aeruginosa là trực khuẩn Gram âm, gây nhiễm trùng cơ hội, sống trong đất và nước, khi sức đề kháng của cơ thể giảm sút, nó dễ dàng tấn công vào cơ thể gia súc (Nguyễn Vĩnh Phước, 1977). Ở heo trưởng thành, *P. aeruginosa* tiết nội độc tố làm viêm bàng quang, âm đạo và vú (Taylor, 1992). *P. aeruginosa* gây viêm teo mũi, viêm tử cung ở bò và được cho là gây sẩy thai ở bò và ngựa; chứng chảy nước tai ở chó, mèo; nhiễm trùng máu ở gà (Nikaido, 1989). *Staphylococcus aureus* là trực khuẩn Gram dương, hiếu khí không bắt buộc, phân bố khắp nơi nhưng chủ yếu ở da, màng nhày của người và động vật máu nóng (Trần Linh Thước, 2012). Trong các loài vật, ngựa cảm nhiễm với *S. aureus* nhất rồi đến chó, bò, lợn, cừu. Gà vịt có sức đề kháng cao đối với *S. aureus* (Nguyễn Vĩnh Phước, 1977). *S. aureus* ký sinh trên da, niêm mạc của người và gia súc. Khi sức đề kháng của cơ thể kém, *S. aureus* xâm nhập và gây bệnh. *S. aureus* có thể gây những ổ mủ ngoài da, niêm mạc, hoặc vào máu gây nhiễm khuẩn huyết, huyết nhiễm mủ (Nguyễn Vĩnh Phước, 1977).

Từ những lý do trên, đề tài "Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết từ lá cây Mật gấu (*Vernonia amygdalina*) trên vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus aureus*" được thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng hại khuẩn gây bệnh, qua đó có thể ứng dụng lá cây Mật gấu làm thức ăn dược liệu cho chăn nuôi và thú y.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

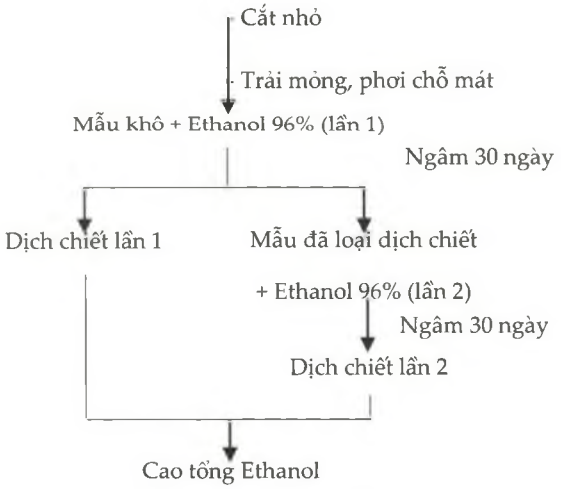
2.1. Nguyên liệu, thời gian và địa điểm

Tổng số 112kg lá tươi và đọt non cây Mật gấu cao 1,2-1,5m được thu vào buổi sáng. Vi khuẩn *P. aeruginosa* và *S. aureus* được phân lập từ tháng 08/2021 đến tháng 11/2021, tại Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ và phòng khám đa khoa Dân An, Mỹ Tho, Tiền Giang. Địa điểm thu mẫu: tỉnh Tiền Giang, Cần Thơ và Sóc Trăng.

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Chiết xuất cao ethanol

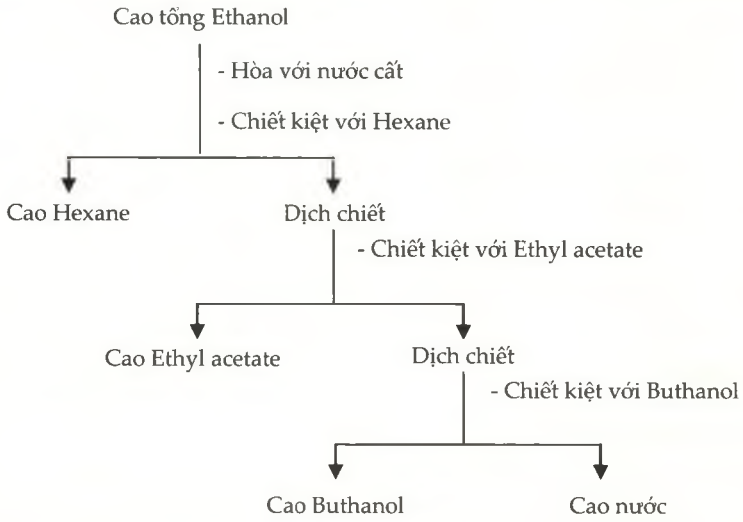
Mẫu tươi được cắt nhỏ, trải mỏng phơi trong mát và đem nghiền. Sau đó đem mẫu khô ngâm trong Ethanol (EtOH) 96% (lần 1) trong 3 ngày. Tiến hành thu dịch chiết lần 1. Mẫu đã loại dịch chiết tiếp tục được ngâm trong EtOH 96% (lần 2) trong 30 ngày và thu dịch chiết lần 2. Dịch chiết lần 1 và lần 2 gọi là cao EtOH.



Hình 1. Qui trình chiết xuất cao Ethanol

Cao EtOH được hòa tan trong nước cất, chiết kiệt với *n*-hexane (Hex) và cô quay dung môi sẽ thu được cao Hex. Dịch sau chiết tiếp tục được chiết kiệt với Ethyl acetate (EtOAc)

và cô quay dung môi sẽ thu được cao EtOAc. Dịch sau chiết tiếp tục được chiết kiệt với *n*-butanol (BuOH) và cô quay dung môi sẽ thu được cao BuOH và cao nước.



Hình 2. Qui trình chiết xuất cao Hexane, cao Ethyl acetate và cao Buthanol

2.2.3. Đánh giá khả năng kháng khuẩn

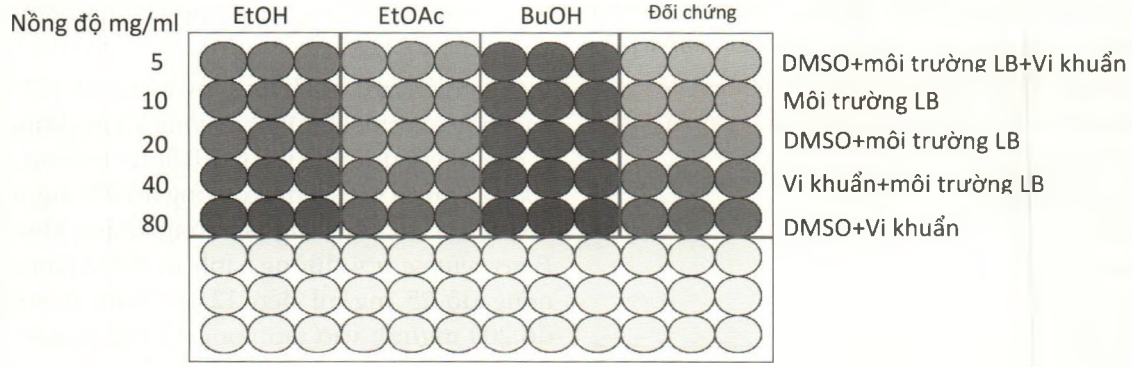
Khả năng kháng khuẩn được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán qua giấy lọc trên môi trường Luria Broth (LB) (Zaidan và ctv, 2005).

Cao chiết được pha loãng trong Dimethyl sulfoxide (DMSO) nguyên chất thành dung dịch chuẩn có nồng độ 100 mg/ml. Nhỏ dung dịch lên giấy lọc đặt sẵn trên đĩa thạch vô trùng, mẫu thử được lặp lại 6 lần. DMSO được sử dụng là đối chứng âm, kháng sinh Gentamycine là đối chứng dương. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết được đánh giá bằng đường kính vòng kháng khuẩn trên đĩa sau khi ủ 24 giờ ở 37°C.

Đường kính vòng kháng (mm) = Đường kính vòng vô khuẩn – Đường kính giấy lọc.

2.2.4. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC

Nồng độ MIC *(Minimum Inhibitory Concentration)* được xác định trên đĩa tiệt trùng 96 giếng theo Muroi và Kubo (1996). Nhỏ dung dịch cao chiết vào đĩa tiệt trùng theo nồng độ từ thấp đến cao, sau đó nhỏ tiếp dịch huyền phù vi khuẩn mật độ 10^6 CFU/ml. Các đối chứng lần lượt là DMSO + môi trường LB + vi khuẩn; môi trường LB; DMSO + môi trường LB; vi khuẩn + môi trường LB; DMSO + vi khuẩn, thí nghiệm lặp lại 3 lần (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm trên đĩa tiệt trùng 96 giếng

2.2.5. Chỉ tiêu theo dõi

Hiệu suất chiết xuất cao: H (%) = [KL thu được sau cô quay (g)/KL mẫu khô (g)]x100

Hiệu suất cao chiết từ cao tổng: $H_{caochiết}$ (%) = [$KL_{caochiết}$ thu được sau cô quay (g)/KL cao tổng (g)]x100

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết đối với *P. aeruginosa* và *S. aureus*.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu suất thu hồi của cao chiết

Mẫu khô đem chiết xuất 22,3g; mẫu dịch chiết cao EtOH sau cô quay 5,15g. Từ công thức tính được hiệu suất chiết xuất cao tổng EtOH là 23,1%. Các cao phân đoạn EtOAc, BuOH, Hex, nước sau khi qua qui trình chiết xuất từ 158g cao EtOH tổng, được tính hiệu suất thu hồi theo công thức. Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi cao tổng EtOH 23,1%. So với kết quả nghiên cứu của Maria và ctv (2017) với hiệu suất cao chiết là 15,9%; kết quả cho thấy mẫu ngâm càng lâu chiết xuất cao càng nhiều và tùy theo điều kiện sống của cây cũng ảnh hưởng đến chiết xuất cao.

3.2. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết Mật gấu trên *P. aeruginosa* và *S. aureus*

Kết quả Bảng 1 cho thấy trong số 5 loại cao chiết từ lá cây Mật gấu (Cao tổng EtOH, cao Hex cao EtOAc, cao BuOH và cao nước) thì chỉ có cao chiết EtOH, EtOAc, BuOH là có khả năng kháng khuẩn *P. aeruginosa* và *S. aureus*.

Bảng 1. Khả năng kháng khuẩn ở nồng độ cao 100 mg/ml của các loại cao chiết từ lá cây Mật gấu

Loại cao	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
Cao tổng EtOH	+	+
Cao Hex	-	-
Cao EtOAc	+	+
Cao BuOH	+	+
Cao nước	-	-

Ghi chú: (+) có hoạt tính kháng khuẩn, (-) không có hoạt tính kháng khuẩn

Kết quả Bảng 2 cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn *P. aeruginosa* và *S. aureus* của cao chiết EtOH, EtOAc, BuOH từ lá cây Mật gấu được khảo sát ở nồng độ 100 mg/ml. Cao chiết EtOAc tạo vòng kháng khuẩn cao hơn so với cao EtOH và cao BuOH trên cả vi khuẩn *P. aeruginosa* và *S. aureus*. Tuy nhiên, vòng kháng khuẩn trên cả 3 loại cao chiết đều thấp hơn so với kháng sinh Gentamycine. Theo Momoh và ctv (2015) nghiên cứu khả năng kháng khuẩn trên Mật gấu với nồng độ 100 mg/mL, vòng kháng *P. aeruginosa* và *S. aureus* lần lượt là 23 và 20mm. Kết quả này lớn hơn vòng kháng khuẩn của cao chiết Mật gấu trong thí nghiệm hiện tại.

Bảng 2. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của ba loại cao chiết từ lá cây Mật gấu và kháng sinh Gentamycine

Cao chiết	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
Cao tổng EtOH	3,5	3,0
Cao EtOAc	6,0	4,0
Cao BuOH	3,5	3,0
KS Gentamycine	15,5	12,1

Nghiên cứu của Anibijuwon và ctv (2012) cho thấy cao chiết BuOH từ cây Mật gấu ức chế *S. aureus* với đường kính vòng kháng khuẩn là 10,5mm ở nồng độ 60 mg/ml. Fanta và Gemechu (2017) sử dụng cao chiết từ rễ cây Mật gấu với các dung môi khác nhau Ether, Chloroform, Acetone và Methanol để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trên *S. aureus*. Kết quả cho thấy vòng kháng khuẩn *S. aureus* ở các dung môi lần lượt là Ether (0 mm), Chloroform (14,3±0,58mm), Acetone (16,3±0,58mm) và Methanol (12,3±0,58mm).

Nghiên cứu của Evbuomwan và ctv (2018) cho thấy cao chiết EtOH tạo vòng kháng khuẩn *S. aureus* với đường kính 6,5±0,5mm ở nồng độ 100 mg/ml và 9,0±2,0mm ở nồng độ 200 mg/ml. Trong khi đó, cao tổng tạo vòng kháng khuẩn *P. aeruginosa* với đường kính từ 8,0±2,0mm ở nồng độ 25 mg/ml đến 12,5±1,5mm ở nồng độ 200 mg/ml; vào tạo vòng kháng khuẩn *S. aureus* với đường kính từ 9,0±1,0mm ở nồng độ 50 mg/ml đến 15,0±1,5mm ở nồng độ 200

mg/ml. Kết quả nghiên cứu của Muhammad và ctv (2019) cho thấy cao chiết tổng ức chế *S. aureus* thể hiện qua vòng kháng khuẩn ở các nồng độ khác nhau như sau: 9,2±0,25mm ở nồng độ 50 mg/ml, 11,2±0,26mm ở nồng độ 75 mg/ml, 11,8±0,31mm ở nồng độ 100 mg/ml. Unegbu và ctv (2020) sử dụng cao chiết EtOH nóng (hot ethanolic extract) từ cây Mật gấu để đánh giá khả năng kháng khuẩn và kết quả cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn *S. aureus* là 8,0-19,0mm. Farah và ctv (2021) sử dụng cao chiết từ lá cây Mật gấu với dung môi chloroform và methanol. Kết quả cho thấy vòng kháng khuẩn *S. aureus* có đường kính 30mm với cao chiết chloroform.

Qua các kết quả nghiên cứu trên cho thấy cao chiết từ cây Mật gấu với các dung môi khác nhau đều tạo khả năng kháng khuẩn trên *P. aeruginosa* và *S. aureus* với kết quả đường kính vòng kháng khuẩn khác nhau. Sự khác nhau này có thể được giải thích là do sự khác nhau về điều kiện trồng cây Mật gấu, bộ phận của cây được sử dụng để ly trích, thời gian thu hoạch và nồng độ khảo sát khác nhau ở các nghiên cứu. Điều đó dẫn đến kết quả vòng kháng khuẩn *P. aeruginosa* và *S. aureus* khác nhau ở các nghiên cứu đã công bố.

3.3. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC

Theo kết quả Bảng 3, ở dãy nồng độ 5, 10, 20, 40, 80 mg/ml thì nồng độ ức chế tối thiểu lên *P. aeruginosa* của cao BuOH là 80 mg/ml, trong khi đó cao EtOH và EtOAc không thể hiện khả năng ức chế qua dãy nồng độ trên. Đối với *S. aureus* thì tất cả nồng độ của cao Mật gấu đều không có khả năng ức chế (Bảng 4).

Nghiên cứu của Anibijuwon và ctv (2012) cho thấy cao chiết BuOH có MIC là 60 mg/ml trên vi khuẩn *S. aureus*. Kết quả nghiên cứu của Evbuomwan và ctv (2018) cho thấy MIC của cao chiết EtOH ở nồng độ 25 mg/ml ức chế vi khuẩn *S. aureus, P. aeruginosa, B. subtilis* và *K. Pneumoniae*; ở nồng độ 50 mg/ml ức chế *P. aeruginosa* và *K. pneumonia*; ở nồng độ 100 mg/ml ức chế *E. coli, S. aureus* và *B. subtilis*. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của Unegbu và ctv (2020) cho thấy cao EtOH nóng có hiệu quả MIC là 25-100 mg/ml đối với *S. aureus*.

Bảng 3. Nồng độ (mg/mL) ức chế tối thiểu của cao EtOH, EtOAc và BuOH đối với *P. Aeruginosa*

Loại	Giờ đo	5	10	20	40	80
Cao EtOH	0 giờ	1,275	2,135	2,374	1,967	1,694
		1,039	1,669	2,952	2,351	1,366
		1,133	1,765	2,417	2,197	1,026
	24 giờ	1,938	2,576	2,856	2,236	1,762
		1,519	2,096	3,114	2,705	1,394
		1,623	2,152	2,786	2,431	1,189
Cao EtOAc	0 giờ	0,422	0,908	1,119	1,217	1,242
		0,264	0,945	0,821	1,159	0,928
		0,231	0,898	0,893	0,983	1,165
	24 giờ	0,555	1,037	1,203	1,316	1,284
		0,605	1,154	0,992	1,275	0,978
		0,655	0,914	1,016	1,095	1,189
Cao BuOH	0 giờ	0,471	0,641	1,456	1,971	2,370
		0,427	0,619	1,452	2,118	2,303
		0,407	0,714	1,775	2,198	2,778
	24 giờ	0,803	0,893	1,567	2,043	2,321
		0,875	0,843	1,563	2,236	2,240
		0,585	0,841	1,815	2,272	2,644

Bảng 4. Nồng độ ức chế tối thiểu của cao EtOH, EtOAc và BuOH đối với *S. aureus*

Loại	Giờ đo	5	10	20	40	80
Cao EtOH	0 giờ	0,750	1,458	3,235	2,749	2,406
		0,772	1,427	2,780	2,402	2,190
		0,496	1,241	2,188	2,615	3,044
	24 giờ	1,075	1,880	3,326	2,872	2,614
		1,062	1,857	2,946	2,538	2,350
		0,851	1,668	2,394	2,726	3,098
Cao EtOAc	0 giờ	1,043	0,997	1,203	1,893	2,294
		0,873	1,006	0,925	1,972	2,153
		0,905	1,103	0,825	1,904	2,247
	24 giờ	1,406	1,244	1,565	2,076	2,383
		1,044	1,337	1,208	2,167	2,203
		1,396	1,479	1,117	2,158	2,376
Cao BuOH	0 giờ	0,807	0,407	1,062	2,293	2,451
		0,909	0,681	1,261	2,574	2,208
		1,033	0,749	1,483	2,826	2,742
	24 giờ	1,245	0,542	1,378	2,459	2,529
		1,307	0,952	1,549	2,713	2,331
		1,415	0,997	1,779	3,035	2,873

Qua các kết quả nghiên cứu trên cho thấy cao chiết từ cây Mật gấu có nồng độ ức chế tối thiểu trên vi khuẩn *P. Aeruginosa* và *S. aureus* với các kết quả khác nhau. Sự khác nhau này có thể là do sự khác nhau về bộ phận của cây Mật gấu được sử dụng để ly trích, thời gian thu hoạch mẫu và chủng vi khuẩn nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN

Hiệu suất thu hồi cao tổng EtOH là 23,1%. Hiệu suất thu hồi cao phân đoạn EtOAc là 39,1%; BuOH 33,2%; Hex 6% và nước 21,7%. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của *P. aeruginosa* ở cao BuOH là 80 mg/ml. Khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) cho thấy cao Mật gấu không có khả năng kháng khuẩn đối với *S. aureus* ở dãy nồng độ 5, 10, 20, 40, 80 mg/ml.

Đề tài cần tiếp tục nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của cao chiết từ lá cây Mật gấu trên các chủng vi khuẩn khác nhau và tiến hành MIC trên *P. aeruginosa* và *S. aureus* theo dãy nồng độ khác nhau ở mỗi phân đoạn cao chiết để so sánh tính kháng khuẩn. Bên cạnh đó, phân lập và định tính các hoạt chất có khả năng kháng khuẩn trong cao chiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Akinpelu D.A.** (1999). Antimicrobial activity of *Vernonia amygdalina* leaves. Fitoterapia, **70**: 232-34.
2. **Anibijuwon I.I., Oladejo B.O., Adetitun D.O. and Kolawole O.M.** (2012). Antimicrobial Activities of *Vernonia amygdalina* Against Oral Microbes. Global Journal of Pharmacology, **6**(3): 178-185.
3. **Bonsi M.L.K., Osuji P.O., Tuah A.K. and Umunna N.N.** (1995). *Vernonia amygdalina* as a supplement to teff straw (*Eragrosis* tef.) fed to Ethiopian Menz sheep. Agroforest. Syst., **31**: 229-41.
4. **Evbuomwan L., Chukwuka E.P., Obazenu E.I. and Ilevbare L.** (2018). Antibacterial Activity of *Vernonia amygdalina* Leaf Extracts against Multidrug Resistant Bacterial Isolates. J. Appl. Sci. Environ., **22**(1): 17-21.
5. **Fanta G. and Gemechu Z.** (2017). Antimicrobial activities of *Vernonia amygdalina* Del and *Prunus africana* extracts against multidrug resistant clinical strains. Res. J. Med. Plants, **11**: 142-147.
6. **Farah K.F.T., Magda A.O., Fakhreldin A.H., Abdulgany M.A.R., Muhammed A.D. and Aisha Z.A.** (2021). Antimicrobial activity of extracts of Vernonia amygdalina leaves from cultivated mother plants and progeny AJMAP, **7**(1): 141-50.
7. **Igile G.O., Oleszek W., Burda S. and Jurzysta M.** (1995). Nutritional assessment of *Vernonia amygdalina* leaves in growing mice. J. Agr. Food Chem., **43**: 2162-66.
8. **Ijeh I.I. and Ejike C.E.C.C.** (2011). Current perspectives on the medicinal potential of *Vernonia amygdalina*. J. Med. Plant Res., **5**(7): 1051-61.
9. **Maria I.I., Sergia L.S. and Siti F.R.** (2017). Effect of *Vernonia amygdalina* Del. Leaf Ethanolic Extract on Intoxicated Male Wistar Rats Liver. Sci. Phar., **85**(2): 16.
10. **Momoh J., Odetunde S.K. and Longe A.O.** (2015). Phytochemical analysis, *in vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *V. amygdalina* against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, **4**(5): 411-26.
11. **Moundipa F.P., Kamini G., Melanie F., Bilong F.C. and Bruchhaus I.** (2000). *In vitro* amoebic activity of some medicinal plants of the Bamun region (Cameroon). Africa J. Cameroon, **62**: 113-21.
12. **Muroi H. and Kubo I.** (1996). Antibacterial activity of anacardic acids and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Bacteriol., **80**(4): 387-94.
13. **Muhammad A., Sani U.D., Sumayya A.W. and Muhammad S.A.** (2019). Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Bitter Leaf (*Vernonia amygdalina*). Ann. Mic. Inf. Dis., **2**(4): 1-7.
14. **Nikaido N.** (1989). Outer membrane barriers as a machenimism of antimicrobial resistance. Antimic. Agents Che., **33**(11): 1831-36.
15. **Nguyễn Vĩnh Phước** (1977). Vi sinh vật thú y. Tập II, Nhà xuất bản Đại học và Trung học Chuyên nghiệp Hà Nội.
16. **Ojieze T.I., Nwachukwu S.E. and Udoh S.J.** (2011). Antimicrobial effect of citrus aurantifolia juice and *Veronica amygdalina* on common bacteria isolates. J. Med. Medicinal Phar. Che., **3**(1): 1-7.
17. **Taylor D.J.** (1992). Miscellaneous Bacterial Infections - *Pseudomonas*, in: Disease of Swine 7th Ed.
18. **Trần Linh Thước** (2012). Phương pháp phân tích vi sinh vật. Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam. Hà Nội.
19. **Unegbu V.N., Nkwoemeka N.E., Obum-Nnadi C.N. and Okey-Ndeche F.N.** (2020). Phytochemical and Antibacterial Activities of *Vernonia Amygdalina* Leaves on two Drug Resistant Bacteria. Int. J. Res. Stu. Mic. Biotechnol., **6**(1): 30-37.
20. **Zaidan M.R.S., Rain A.N., Badrul A.R., Adlin A., Norazah A. and Zakiah I.** (2005). *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Trop. Biomed., **22**(2): 165-70.