



KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT CỦA TINH DẦU LÁ TRẦU KHÔNG (*Piper betel* L.), HỌ HỒ TIÊU (PIPERACEAE)

Nguyễn Thiện Chí¹, Nguyễn Thị Ngọc Châm¹, Phạm Khánh Ngọc¹, Đỗ Duy Phúc¹,
Dương Tùng Kha¹ và Nguyễn Thị Thu Thủy²

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 19/12/2015

Ngày chấp nhận: 29/08/2016

Title:

Chemical composition and anti-microbial activity of essential oil from leaves of *Piper betel* L.

Từ khóa:

Tinh dầu Trầu không, *Piper betel* L., hoạt tính kháng vi sinh vật

Keywords:

Betel oil, *Piper betel* L., anti-microbial activity

ABSTRACT

Chemical composition and anti-microbial activity of essential oil from leaves of *Piper betel* L. collected from Hau Giang province has been investigated. Highest yield of oil (0.63 %) of *P. betel* L. leaves was successfully extracted by steam distillation. By using gas chromatography - mass spectrometry analysis (GC-MS), we have confirmed that the main component of *P. betel* L. essential oil is 4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene, with content up to 34.55%. The in vitro anti-microbial activity was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method. The results showed that the essential oil from betel leaves inhibited the growth of 3 microorganisms species: *B. subtilis*, *F. oxysporum* and *A. niger* with the MIC values of 100, 200 and 200 µg/mL, respectively.

TÓM TẮT

Lần đầu tiên, thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu lá Trầu không (*Piper betel* L.) thu hái tại tỉnh Hậu Giang được khảo sát. Tinh dầu lá trầu không được ly trích thành công bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước đạt hiệu suất 0,63%. Bằng phương pháp phân tích sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS), thành phần hóa học chính trong tinh dầu lá Trầu không được xác định là hợp chất 4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene với hàm lượng 34,55%. Hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu được đánh giá bằng phương pháp pha loãng đa nồng độ để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật cho thấy tinh dầu Trầu không có khả năng ức chế sự tăng trưởng của 3 chủng vi sinh vật: *B. subtilis*, *F. oxysporum* và *A. niger* với giá trị MIC lần lượt là 100, 200 và 200 µg/mL.

Trích dẫn: Nguyễn Thiện Chí, Nguyễn Thị Ngọc Châm, Phạm Khánh Ngọc, Đỗ Duy Phúc, Dương Tùng Kha và Nguyễn Thị Thu Thủy, 2016. Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu lá trầu không (*Piper betel* L.), họ hồ tiêu (Piperaceae). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 45a: 28-32.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Trầu không có tên khoa học là *Piper betel* L. hay *Piper sriboea* L., thuộc họ Hồ tiêu (Piperaceae), là một trong những loài thực vật nhiệt đới quan trọng ở khu vực châu Á, được trồng rộng

rãi ở Ấn Độ, Sri Lanka, Malaysia, Thái Lan, Đài Loan và các quốc gia Đông Nam Á khác (Guha, 2006). Ở nước ta, trong y học cổ truyền Việt Nam, lá trầu được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau như nhai trầu để chắc răng, chữa viêm mủ chân răng, nước sắc lá trầu để rửa hoặc đắp trị vết

thương, bông, lở loét, mụn nhọt, chàm, lá trầu ngâm trong nước sôi dùng nhỏ mắt để chữa bệnh viêm kết mạc... (Đỗ Tất Lợi, 2003).

Hiện nay, có một vài công trình nghiên cứu về cây Trầu không ở các tỉnh miền Bắc, miền Trung Việt Nam và chỉ dừng lại ở bước đầu như nghiên cứu về thành phần hoá học của tinh dầu lá Trầu ở Hải Dương (Phạm Thế Chính và *ctv.*, 2009) ở Học Môn (Nguyễn Nho Dũng, 2011), cũng như phân lập một số hợp chất từ các cao chiết lá trầu (Phạm Thế Chính và *ctv.*, 2009) mà chưa chú trọng vào khảo sát các hoạt tính sinh học của tinh dầu. Bài viết này trình bày kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học và khả năng kháng vi sinh vật của tinh dầu lá trầu trồng ở Hậu Giang, một địa phương thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long nhằm đóng góp cơ sở khoa học cho tác dụng điều trị các bệnh do nhiễm khuẩn và nấm của tinh dầu Trầu không, đồng thời làm phong phú thêm nguồn dược liệu có ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Lá Trầu không được thu mua trực tiếp tại vườn trầu huyện Vị Thủy, tỉnh Hậu Giang và được định danh bằng cách tham chiếu với tài liệu tham khảo (Shukla, R., 2015). Nguyên liệu còn tươi được xử lý sơ bộ, loại tạp chất, rửa sạch và xay nhuyễn trước khi tiến hành ly trích tinh dầu.

2.2 Phương pháp ly trích tinh dầu

Tinh dầu lá Trầu không được ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước trực tiếp, với bộ chưng cất tinh dầu Clevenger, kết hợp việc sử dụng muối NaCl để hỗ trợ sự khuếch tán của tinh dầu trong quá trình lôi cuốn tinh dầu theo hơi nước. Đồng thời khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian chưng cất, thể tích và nồng độ dung dịch muối được sử dụng trong quá trình chưng cất đến hàm lượng tinh dầu thu được.

Bảng 1: Một số tính chất vật lý của tinh dầu Trầu không

Tính chất	Màu, mùi vị	Độ tan	Tỷ trọng (d ₂₀)	Độ quay cực (α _D ²⁰)
Kết quả	Dung dịch dầu màu vàng nhạt, mùi đặc trưng, vị gắt.	Không tan trong nước, tan trong các dung môi hữu cơ: methanol, chloroform, diethyl ether.	0,94	+4,29

3.2 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ly trích tinh dầu

3.2.1 Ảnh hưởng của thời gian ly trích

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian ly

2.3 Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu

Thành phần và hàm lượng các cấu tử có trong tinh dầu được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC – MS), thực hiện trên thiết bị GC – MS của THERMO SCIENTIFIC Trace GC Ultra – ISQ, loại cột sử dụng là cột TG – SQC (15 m x 0,25 mm x 0,25 μm), khí mang helium. Chương trình nhiệt độ cho máy sắc ký khí được thiết lập như sau:

Nhiệt độ đầu: 70°C, giữ 2 phút $\xrightarrow[2\text{ phút}]{\frac{2^{\circ}\text{C}}{\text{phút}}}$ 150°C, giữ 2 phút $\xrightarrow[2\text{ phút}]{\frac{10^{\circ}\text{C}}{\text{phút}}}$ 175°C, giữ 2 phút $\xrightarrow[2\text{ phút}]{\frac{10^{\circ}\text{C}}{\text{phút}}}$ 230°C, giữ 2 phút.

2.4 Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của tinh dầu Trầu không được thực hiện trên phiên vi lượng 96 giếng (96-well microtiter plate) theo phương pháp của Vander Bergher và Vlietlinck (1991). Thử nghiệm được thực hiện tại phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tinh dầu được pha loãng theo các thang nồng độ thấp dần, để tính nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)- là nồng độ mà ở đó vi sinh vật bị ức chế gần như hoàn toàn. Mẫu có MIC ≤ 200 μg/mL là có hoạt tính.

3 CÁC KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tính chất vật lý của tinh dầu

Các tính chất vật lý của tinh dầu Trầu không được ly trích bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước đều phù hợp với các tài liệu tham khảo (Sugumaranet *al.*, 2011, Adeltrudes and Marina, 2010).

trích đến hàm lượng tinh dầu thu được trong 150 g lá trầu tươi, cố định các yếu tố như nhiệt độ, nồng độ và thể tích dung dịch NaCl. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Kết quả khảo sát thời gian ly trích tinh dầu Tràu không bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Thời gian ly trích (phút)	60	120	180	240	300
Hàm lượng tinh dầu (% v/w)	0,17	0,21	0,37	0,63	0,64

Cố định các yếu tố: khối lượng nguyên liệu (150 g), nhiệt độ chưng cất (100°C), nồng độ dung dịch NaCl (15%) và thể tích dung dịch (500 mL)

Bảng 2 cho thấy hàm lượng tinh dầu thu được phụ thuộc vào thời gian chưng cất, hàm lượng tinh dầu tăng khi thời gian chưng cất tăng và với thời gian chưng cất là 240 phút, hàm lượng gần như đạt cao nhất. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu tương tự, thời gian chưng cất tối ưu được các nhóm nghiên cứu chọn đều không vượt quá 240 phút (Rawatet *al.*, 1989; B. Prakashet *al.*, 2010). Mặt khác, khi ly trích với thời gian lâu hơn thì lượng tinh dầu tuy thu được nhiều hơn nhưng không đáng kể. Vì vậy, để tiết kiệm thời gian, thời gian ly trích tinh dầu tối ưu được chọn là 240 phút

Bảng 3: Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ dung dịch NaCl đến hàm lượng tinh dầu ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Nồng độ dung dịch NaCl (%)	0	5	10	15	20
Hàm lượng tinh dầu (% v/w)	0,16	0,23	0,30	0,63	0,43

Cố định các yếu tố: thời gian chưng cất (240 phút), khối lượng nguyên liệu (150 g), nhiệt độ chưng cất (100°C) và thể tích dung dịch (500 mL)

Từ bảng kết quả trên, có thể thấy hàm lượng tinh dầu thu được phụ thuộc vào nồng độ dung dịch NaCl thêm vào, hàm lượng tinh dầu tăng khi nồng độ muối tăng và đạt cao nhất ở nồng độ muối là 15%. Việc thêm muối NaCl vào quá trình chưng cất nhằm mục đích tăng hiệu suất ly trích do NaCl hòa tan trong nước sẽ tạo thành dung dịch điện ly dẫn đến làm tăng nhiệt độ sôi (hay làm tăng áp suất hơi) của nước, giảm sự bay hơi của nước trong hỗn hợp; do đó, tinh dầu ly trích được nhiều hơn (W. F. Furter and R. A. Cook, 1967). Tuy nhiên, khi chưng cất với nồng độ lớn hơn, lượng tinh dầu thu được giảm, điều này có thể giải thích là do khi sử dụng muối ở nồng độ cao thì các lớp biểu bì ngoài chứa tinh dầu bị co lại, ngăn cản sự khuếch tán tinh

và được cố định để tiếp tục khảo sát các yếu tố khác.

3.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch NaCl

Với thời gian ly trích tối ưu đã được xác định như trên, nhóm nghiên cứu tiếp tục khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ dung dịch NaCl đến hàm lượng tinh dầu thu được từ 150 g lá tràu tươi. Chưng cất để thu tinh dầu lần lượt ở những nồng độ dung dịch NaCl khác nhau, cố định thể tích dung dịch là 500 mL. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 4: Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thể tích nước cất thêm vào đến hàm lượng tinh dầu ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Thể tích nước cất (mL)	200	300	400	500
Hàm lượng tinh dầu (% v/w)	0,10	0,19	0,38	0,63

Cố định các yếu tố: thời gian chưng cất (240 phút), khối lượng nguyên liệu (150 g), nhiệt độ chưng cất (100°C) và nồng độ dung dịch muối (15%)

Kết quả cho thấy hàm lượng tinh dầu tăng khi thể tích nước cất cho vào bình cầu tăng, hàm lượng đạt cao nhất khi lượng nước thêm vào là 500 mL. Ngoài ra, do điều kiện tiến hành thí nghiệm không cho phép tổng thể tích dung dịch và nguyên liệu cho vào bình cầu vượt quá 2/3 thể tích bình nên không thể khảo sát ở những thể tích lớn hơn. Vì

dầu ra ngoài. Mặt khác, do làm tăng nhiệt độ sôi của nước nên việc thêm muối NaCl vào quá trình chưng cất không thể áp dụng cho những tinh dầu có nhiệt độ sôi thấp hoặc kém bền với nhiệt.

3.2.3 Ảnh hưởng của thể tích nước cất thêm vào

Khảo sát sự ảnh hưởng của thể tích nước cất thêm vào đến hàm lượng tinh dầu ly trích từ 150 g lá tràu tươi bằng cách tiến hành chưng cất tinh dầu lần lượt với những thể tích nước khác nhau, cố định nồng độ dung dịch NaCl là 15%. Mục đích nhằm xác định thể tích nước tối ưu cho quá trình chưng cất, tránh sử dụng lượng nước quá dư, không có lợi cho việc ly trích tinh dầu do trong tinh dầu chứa nhiều hợp chất dễ tan trong nước. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

vậy, chọn 500 mL là thể tích tối ưu trong phạm vi nghiên cứu này.

Phân tích và tổng hợp những kết quả trên, điều kiện tối ưu để ly trích tinh dầu Tràu không bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước ở quy mô phòng thí nghiệm được đề xuất như trong Bảng 5.

Bảng 5: Kết quả điều kiện tối ưu cho quá trình ly trích tinh dầu lá Tràu không bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Khối lượng nguyên liệu (g)	Thời gian ly trích (phút)	Thể tích nước (mL)	Nồng độ dung dịch NaCl (%)	Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng cao nhất (%)
150	240	500	15	100	0,63

3.3 Thành phần hóa học của tinh dầu

Bảng 5: Thành phần hóa học chính tinh dầu Tràu không thu hái tại Hậu Giang

STT	Thời gian lưu (phút)	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	5,52	4-Terpeneol	2,08
2	13,45	Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)	19,79
3	18,42	γ-Muurolene	1,33
4	20,97	δ-Cadinene	2,22
5	22,06	Acetyeugenol	20,14
6	27,12	(+)-tau-Muurolol	3,16
7	27,79	α-Cadinol	5,51
8	28,41	4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	34,55
9		Thành phần khác	11,22

Từ kết quả GC-MS cho thấy thành phần hóa học chính của tinh dầu Tràu không ở khu vực Hậu Giang là các hợp chất thuộc nhóm terpene (4-terpeneol, γ-muurolene, δ-cadinene, (+)-tau-muurolol, α-cadinol) và các hợp chất là dẫn xuất của phenol như phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl); acetyeugenol; 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene. Tổng hàm lượng của tất cả các cấu tử chiếm gần 90% lượng tinh dầu ly trích được. Trong đó, hợp chất 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene chiếm hàm lượng cao nhất (34,55%), kết quả này phù hợp với tài liệu tham khảo về thành phần của tinh dầu Tràu không ở vùng Nam Bộ (Nguyễn Thị Lý và Trần Thị Hồng Vân, 2010). Có thể thấy các cấu tử chiếm hàm lượng cao nhất trong tinh dầu đều là những dẫn xuất của phenol nên tinh dầu này có nhiệt độ sôi, tỷ trọng và chiết suất cao. Các dẫn xuất phenol có mặt trong tinh dầu có những tác dụng sinh học tốt như tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, độc tính tế bào... (Roy and Vijayalaxmi, 2013, Bhanu P. et al., 2010).

3.4 Hoạt tính kháng vi sinh vật

Với nồng độ ban đầu là 400 µg/mL, tinh dầu được pha loãng các thang nồng độ thấp dần, từ đó xác định giá trị MIC. Kết quả thử nghiệm được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6: Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật

Vi sinh vật	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) (µg/mL)
Vi khuẩn Gr (-) <i>Escherichia coli</i>	(-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)
Vi khuẩn Gr (+) <i>Bacillus subtilis</i>	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	(-)
Nấm sợi <i>Aspergillus niger</i>	200
<i>Fusarium oxysporum</i>	200
Nấm men <i>Candida albicans</i>	(-)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(-)

Từ kết quả ở Bảng 5 cho thấy tinh dầu lá Tràu không thể hiện hoạt tính ức chế 3 chủng vi sinh vật kiểm định: vi khuẩn Gram (+) *Bacillus subtilis*, nấm mốc *Aspergillus niger* và *Fusarium oxysporum* với giá trị MIC lần lượt là 100, 200 và 200 µg/mL. Trong đó, các loài nấm mốc *Aspergillus* không chỉ gây bệnh ở thực vật mà còn gây ra các bệnh nghiêm trọng ở người như các bệnh nấm Aspergillois (Thomas, 2015); nấm *F.oxysporum* gây ra bệnh héo vàng ở nhiều loài thực vật, loài nấm này gây hại nhiều loại cây trồng trên tất cả các bộ phận, đặc biệt bộ phận gốc và rễ của cây (Rosado-Álvarez, 2014). Kết quả này cho thấy tiềm năng kháng khuẩn và kháng nấm của tinh dầu Tràu không có thể ứng dụng được vào thực tế.

4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu quá trình chiết xuất tinh dầu từ lá Tràu không bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước ở quy mô phòng thí nghiệm đã đề xuất điều kiện tối ưu về thời gian (240 phút), nồng độ dung dịch NaCl (15%) và thể tích nước cất thêm vào bình cầu (500 mL) với hiệu suất đạt được cao nhất là 0,63%. Áp dụng phương pháp phân tích hiện đại GC-MS cho thấy tinh dầu ly trích được từ lá Tràu không trồng ở tỉnh Hậu Giang thuộc Đồng bằng sông Cửu Long có chứa các hợp chất hóa học như 4-allyl-

1,2-diacetoxybenzene (34,55%); acetylugenol (20,14%); phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl) (19,79%) và các hợp chất mono- và sesquiterpene như α -cadinol (5,51%), (+)-tau-muurolo (3,16%), δ -cadinene (2,22%), 4-terpineol (2,08), γ -muurolene (1,33%). Kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học trong tinh dầu Tràu không Hậu Giang được so sánh với kết quả của một nghiên cứu tương tự được thực hiện ở Ấn Độ (Bhanu P. *et al.*, 2010) nhận thấy có sự khác nhau về các hợp chất thuộc nhóm phenylpropene trong hai tinh dầu ở hai vùng nguyên liệu khác nhau. Trong khi hợp chất chủ yếu trong tinh dầu Tràu không Hậu Giang là 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene (34,55%) thì eugenol là thành phần chiếm hàm lượng cao nhất trong tinh dầu Tràu không ở Ấn Độ (63,39%), hai hợp chất này là đồng phân vị trí nhóm chức của nhau. Có sự khác nhau trên có thể là do khí hậu, thổ nhưỡng hoặc phương pháp ly trích tinh dầu.

Tinh dầu lá Tràu không biểu hiện hoạt tính kháng vi sinh vật tốt với khả năng kháng vi khuẩn Gram (+) như *B.subtillis* và các loại nấm gây hại như *A.nigervàF.oxysporum*, đây là cơ sở giúp ứng dụng tinh dầu lá tràu như một loại kháng sinh được chiết xuất từ thiên nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adeltrudes, B.C. and Marina, O.O., 2010.

Characterization and Evaluation of Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Leaves of Piper betle L.E-International Scientific Research Journal. 2(1).

Bhanu, P., Ravindra, S., Priyanka, S., Ashok, K., Prashant, K.M. and Nawa, K.D., 2010. Efficacy of chemically characterized Piper betle L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology. 142: 114–119.

Đỗ Tất Lợi, 2003. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Lần xuất bản thứ XII. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội, trang 118–119.

Furter, W.F. and Cook R.A., 1967. Salt effect in distillation: a Literature Review. International Journal of Heat and Mass Transfer. 10: 23-36.

Guha P., 2006. Betel Leaf: The neglected green gold of India. Journal of Human Ecology. 19(2): 87–93.

Nguyễn Nho Dũng, 2011. Nghiên cứu chiết tách, xác định thành phần hoá học tinh dầu và dịch chiết từ

lá Tràu không. Luận văn thạc sĩ Hoá hữu cơ. Đại học Đà Nẵng. Đà Nẵng.

Nguyễn Thị Lý và Trần Thị Hồng Vân, 2010. Tách tinh dầu và carotenoid từ lá tràu (Piper betle L.). Hội Nghị Khoa Học & Công Nghệ lần 9, Phân ban Công nghệ Hóa học, Khoa Công nghệ Hoá học, Đại học Bách Khoa, Tp. Hồ Chí Minh.

Phạm Thế Chính, Dương Nghĩa Bang, Phan Thanh Phương, Khiếu Thị Tâm, Phạm Thị Thắm, Lê Thị Xuân, Bùi Thị Thúy, 2009. Thành phần hóa học của tinh dầu lá tràu (Piper Betle L.) Trồng tại Hải Dương. Tạp chí Khoa học & Công nghệ. 72(10): 48–52.

Phạm Thế Chính, Phạm Thị Thắm và Nguyễn Hồng Phong, 2009. Nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính sinh học trong lá Tràu (Piper betleL.). Tạp chí Khoa Học & Công Nghệ. 96(08): 69–73.

Rawat, A.K.S., Tripathl, R.D. Khan, A.J. and Balasubrahmanyam, V.R., 1989. Essential Oil Components as Markers for Identification of Piper betle L. Cultivars. Biochemical Systematics and Ecology. 17(1): 35-38.

Rosado-Álvarez, C., Molinero-Ruiz, L., Rodríguez-Arcos, R., Basallote-Ureba, M.J., 2014. Antifungal activity of asparagus extracts against phytopathogenic Fusarium oxysporum. Scientia Horticulturae. 171: 51–57.

Roy, U.B. and Vijayalaxmi, K.K., 2013. Evaluation of Cytotoxic Activity of Piper betle Linn. Using Murine and Human Cell Lines In Vitro. International Journal of Scientific & Engineering Research. 4(9): 221–233.

Shukla, R., 2015. A Scientific Review on Common Chewing Plant of Asians: Piper betle Linn. Journal of Harmonized Research in Pharmacy. 4(1): 01–10.

Sugumaran, M., Suresh Gandhi, M., Sankarnarayanan, K., Yokesh, M., Poornima, M. and Sree, R.R., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of vellaikodi variety of Piper betle Linn leaf oil against dental pathogens. International Journal of PharmTech Research. 3(4): 2135–2139.

Thomas, F.P., 2015. 259 – Aspergillus Species. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2(4): 2895–2908.

Vanden Bergher, D.A. and Vlietinck, A.J., 1991. Screening methods for Antibacterial and Antiviral Agent from Higher Plants. Methods in Plant biochemistry. Academic Press. USA.