

Nghiên cứu hoạt tính kháng nấm gây teo đầu lá Nha đam (*Aloe vera*) của Diệp hạ châu trắng (*Phyllanthus amarus*), Tỏi (*Allium sativum*) và Neem (*Azadirachta indica*)

Lê Thị Thanh Nga¹, Võ Thanh Sang²

¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Viện Ứng dụng Công nghệ và Phát triển bền vững, Đại học Nguyễn Tất Thành

ltnnga@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Bệnh teo đầu lá Nha đam gây ra do nấm *Curvularia* sp. là một trong những bệnh gây ảnh hưởng nặng nề đến chất lượng sản phẩm. Do đó, việc đánh giá hoạt tính kháng nấm của một số loài thực vật là cần thiết và có tính ứng dụng cao. Nghiên cứu này khảo sát hoạt tính kháng nấm gây bệnh teo đầu lá Nha đam từ các loại dịch chiết của ba loại thực vật, gồm Diệp hạ châu trắng (*Phyllanthus amarus*), Tỏi (*Allium sativum*), và Neem (*Azadirachta indica*). Cao chiết có độ phân cực khác nhau được thu nhận dựa theo phương pháp chiết lỏng-lỏng. Phương pháp khuếch tán đĩa giấy và pha loãng vi lượng thể lỏng được sử dụng để xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ kháng nấm tối thiểu. Việc xử lí cao chiết hexan của Tỏi và Neem có thể làm xuất hiện vòng kháng khuẩn kháng lại sự hoạt động của nấm *Curvularia* sp. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ kháng nấm tối thiểu của cao chiết hexan Tỏi và Neem đều đạt lần lượt là 2,5 mg/mL và 5 mg/mL. Kết quả này cho thấy tiềm năng ức chế và tiêu diệt nấm gây teo đầu lá của 2 loại cao chiết, đặt tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng và phát triển các chế phẩm kháng nấm phục vụ cho quá trình canh tác Nha đam.

Nhận 18/10/2022
Được duyệt 03/03/2023
Công bố 30/03/2023

Từ khóa

Allium sativum,
Azadirachta indica,
Curvularia sp.,
khả năng kháng nấm,
Phyllanthus amarus

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Nha đam đã được biết đến và sử dụng rộng rãi như là một loại cây chứa nhiều dược tính có ích cho con người từ nhiều thế kỉ trước. Bắt đầu được ghi nhận và sử dụng từ hơn 3.000 năm trước công nguyên tại Ai Cập [1], Nha đam xuất hiện ở nhiều nơi khác trên thế giới như Hy Lạp, Ấn Độ, Trung Quốc [2,3]. Tại Việt Nam, Nha đam được canh tác chủ yếu tại tỉnh Ninh Thuận và còn được xác định là một trong các sản phẩm nông nghiệp đặc thù của tỉnh. Đây là loại cây dễ trồng, có năng suất cao, dễ chăm sóc đặc biệt cho hiệu quả rất cao ở những vùng đất ven biển. Theo Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Ninh Thuận, năm 2017, toàn tỉnh có khoảng 333 ha trồng Nha đam, sản lượng đạt 46.000 tấn lá/năm, năm 2020,

diện tích trồng ước đạt trên 470 ha, sản lượng đạt gần 72.000 tấn lá/năm. Sản phẩm Nha đam Ninh Thuận được tiêu thụ rộng khắp ở các tỉnh, thành trong nước [4]. Tuy nhiên việc canh tác Nha đam thường gặp nhiều khó khăn vì cây thường xuyên bị ảnh hưởng bởi các loại bệnh hại khác nhau do vi sinh vật gây ra. Trong đó, teo đầu lá ở Nha đam là một trong những bệnh hại thường xuyên xuất hiện, gây thiệt hại đến năng suất và chất lượng canh tác Nha đam, làm ảnh hưởng đáng kể đến giá trị kinh tế và ngày càng trở thành một vấn đề đáng quan tâm với người trồng Nha đam. Theo các công bố trước đó, *Fusarium oxysporum* [5], *Alternaria pluriseptata*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* sp. và *Pestalotiopsis*

guepinii [6], *Curvularia lunata* và *Curvularia ovoidea* [7] là những loài nấm gây bệnh trên mẫu Nha đam. Những loại nấm này xâm nhập vào mô lá Nha đam qua vết xây sát, vết do côn trùng cắn phá, lan truyền theo nước mưa, nước tưới, từ cây bệnh sang cây khỏe trong ruộng. Ngoài ra, các loại nấm *Curvularia brachyospora*, *Epicoccum purpurascens* và *Sclerotium* sp. cũng được ghi nhận hiện diện trên cây Nha đam bị bệnh, trong đó, *Colletotrichum gloeocporioides* là tác nhân chính gây bệnh thán thư, nấm *Epicoccum purpurascens* và *Pestalotiopsis guepinii* gây bệnh đốm lá Nha đam [8]. Theo một số nghiên cứu khác, bệnh teo đầu lá do nấm *Stemphylium botryosum* W gây ra, bệnh chỉ gây hại trên lá, vết bệnh đầu tiên thường xuất hiện ở phần giữa lá trên các vết nứt tự nhiên của lá cây. Nấm xâm nhập và lan rộng kéo đến thân lá tạo thành vết bệnh hình bầu dục dài, màu thâm đen, vàng trên nền xám trắng, sau (5-7) ngày lá cây gãy gục ở giữa và khô lụi. Chiều dài vết bệnh có thể kéo dài (10-30) cm. Lá nhiễm bệnh bị teo phần đầu ngọn, khô dần xuống gốc làm cây không phát triển, ngày càng nhỏ lại và dẫn đến chết. Khi phát hiện bệnh cần tiến hành cắt bỏ phần ngọn lá khô và tiêu hủy, nếu nặng cần tiến hành nhổ bỏ tránh lây lan [9].

Tại Việt Nam, dù Nha đam đã và đang trở thành một trong những loại cây trồng chủ lực tại một số địa phương, tuy nhiên, trong nước hiện nay các nghiên cứu liên quan đến bệnh hại Nha đam cũng như những biện pháp phòng ngừa và điều trị bệnh hại Nha đam nói chung và bệnh do nấm gây ra nói riêng vẫn còn khá hạn chế. Trong bối cảnh đất nước đang phát triển nông nghiệp vững bền, việc nghiên cứu và phát triển các sản phẩm diệt nấm có nguồn gốc thực vật an toàn và thân thiện với môi trường đang là một hướng tiếp cận mới đầy tiềm năng giải quyết những vấn đề nhức nhối về bệnh hại vi sinh vật gây ra cho các loại cây trồng nông nghiệp. Chính vì thế, nghiên cứu này chọn 3 loài thực vật gồm Diệp hạ châu, Tỏi và Neem đã được công bố hoạt tính kháng một số chủng nấm gây bệnh thực vật trong các nghiên cứu trước đó nhằm khảo sát hoạt tính kháng nấm của chúng với chủng nấm gây bệnh *Curvularia* sp. trên Nha đam với mục đích có được những kết quả nghiên cứu cơ sở về tiềm năng kháng nấm của các loài thực vật trên, từ đó tạo tiền đề cho những nghiên cứu ứng dụng chuyên sâu hơn.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguồn dược liệu:

Lá Neem và lá Diệp hạ châu được mua tại nhà thuốc Y học Cổ truyền Hải Minh (TP. Hồ Chí Minh) ở dạng bột phơi khô và nghiền nát, không qua xử lý với bất kỳ chất bảo quản nào. Tỏi tươi được thu mua tại vườn Ninh Thuận để đảm bảo không bị xử lý bằng các chất bảo quản.

2.2 Nguồn nấm

Chủng nấm *Curvularia* sp. được lưu trữ tại phòng thí nghiệm thuộc ngành Công nghệ Sinh học, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành. Chủng nấm *Curvularia* sp. được hoạt hóa và nuôi ủ trong môi trường Glucose Yeast extract Agar – GYA (1 % glucose, 0,25 % Yeast extract và 1,5 % agar) và nuôi ủ ở điều kiện 30 °C trong (5-7) ngày để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3 Phương pháp tách chiết cao tổng

Bột lá khô (g) được ngâm trong 3 loại dung môi riêng biệt khác nhau bao gồm ethanol tuyệt đối – EtOH (CHemsol; 64-17-5), hexan (Guangdong Guanghua Sci-Tech; 1.15006.013) và ethyl acetat – EtOAc (Xilong; 14178-6) với tỉ lệ 1:8 (w/v) trong 72 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó lọc và thu dung dịch ngâm bột lá. Quá trình này được lặp lại 3 lần. Tất cả các dịch chiết thu trong 3 lần lọc được cô quay chân không ở 60 °C để loại bỏ hết dung môi và thu được cao chiết. Cô đặc cao chiết để thu được cao tổng, hiệu suất thu nhận cao tổng (chưa trừ ẩm) được tính theo công thức [10]:

Hiệu suất (%) =

$$\frac{\text{Khối lượng cao chiết} \times (100 - \text{độ ẩm})}{\text{Khối lượng dược liệu}} \times 100$$

2.4 Phương pháp xác định hoạt tính kháng nấm

Hoạt tính kháng nấm được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa giấy. Các chủng nấm được nuôi ủ trên môi trường thạch PDA (Potato Dextrose Agar) trong khoảng 24 giờ ở nhiệt độ 35 °C và trên môi trường thạch nghiêng PDA trong 5 ngày. Mỗi dịch cao chiết được thấm vào từng đĩa giấy (đường kính 6 mm, dày 1mm) sao cho khối lượng cao chiết là 10 mg/đĩa giấy. Các đĩa giấy được đặt trong tủ cấy vô trùng trong 15 phút nhằm làm bay hơi dung môi và để cho cao chiết được phân tán đều trên đĩa giấy. Sau đó, đặt từng đĩa giấy thử nghiệm trên đĩa môi trường thạch PDA đã được cấy trải sẵn bào tử nấm (2-5) · 10⁵ CFU sau 24 giờ. Thuốc kháng nấm Amphotericin B (750 µg/mg) được sử dụng làm đối chứng dương, dung môi cao chiết được sử dụng làm đối chứng âm. Các đĩa nấm thử nghiệm

được ủ ở 35 °C trong khoảng 48 giờ. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần ở các thời điểm khác nhau. Theo đó, hoạt tính kháng nấm kiểm định được đánh giá bằng cách đo bán kính vòng ức chế nấm (BK) theo công thức $BK (mm) = D - d$ với D là đường kính vòng kháng nấm và d là đường kính khoanh giấy kháng .

2.5 Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ kháng nấm tối thiểu MFC

Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt nấm tối thiểu được xác định bằng phương pháp pha loãng vi lượng thể lỏng (Broth microdilution) . Huyền phù có chứa bào tử nấm được thu nhận sau 5 ngày nuôi cấy trên thạch nghiêng PDA ở 35 °C. Khuẩn lạc nấm được bao phủ với 5 mL nước vô trùng bổ sung thêm Tween 20. Bào tử được thu lại bằng tấm bông vô trùng sau đó được chuyển sang tube vô trùng và khuấy đều sao cho dịch huyền phù đồng nhất. Dịch huyền phù được chuẩn hóa bằng cách đếm số lượng bào tử bằng huyết cầu kế ở mức $(2-5) \cdot 10^6$ bào tử/mL. Tiếp đó, dịch huyền phù được pha loãng theo tỉ lệ 1:10 với RPMI để thu được dung dịch cuối cùng có mật độ $(2-5) \cdot 10^5$ bào tử/mL. Mỗi giếng gồm 100 µL dịch huyền phù bào tử nấm và 20 µL cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau trong dung dịch. Các đĩa được bọc kín và ủ ở nhiệt độ 35 °C từ (24 đến 48) giờ. Giá trị MIC và MFC được ghi nhận sau 48 giờ nuôi cấy [11].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả tách chiết cao tổng

Khối lượng mẫu đầu vào và khối lượng cao chiết thu được (chưa loại trừ độ ẩm) của 3 mẫu Diệp hạ châu, Neem và Tỏi được liệt kê đầy đủ trong Bảng 1.

Cụ thể, với mẫu Diệp hạ châu được chiết trong 3 dung môi, kết quả cho thấy EtOH có hiệu quả tách chiết tốt nhất, trong khi EtOAc có hiệu quả tách chiết thấp nhất. Tương tự, lá Neem cũng có hiệu quả tách chiết tốt nhất khi tách trong dung môi là EtOH. Với mẫu Tỏi, hiệu quả tách chiết cao nhất xảy ra với dung môi hexan trong khi EtOH cho hiệu quả tách chiết thấp nhất. Thực tế cho thấy mẫu Neem và Diệp hạ châu sử dụng để tách chiết đều là mẫu lá khô, trong khi mẫu Tỏi sử dụng là Tỏi tươi, hiệu quả tách chiết có thể bị ảnh hưởng bởi lượng tinh dầu có chứa trong củ của Tỏi.

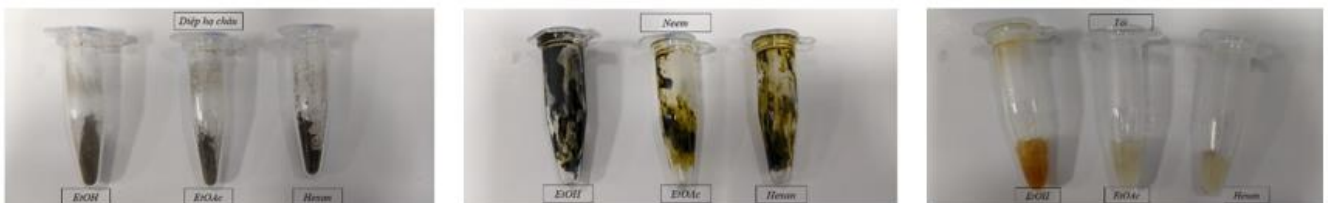
Đặc điểm của các cao chiết tổng thu được như sau:

Cao Diệp hạ châu: sau khi thu hồi được toàn bộ dung môi, cao thu được ở dạng bột rắn, có thể nghiền nát thành các hạt mịn nhỏ, cao có màu xanh rêu đất nhẹ. Cao chiết trong hexan có màu xanh đậm nhất. Các cao Diệp hạ châu tan trong dung môi tách chiết ban đầu.

Cao lá Neem: cao lá Neem (chưa trừ ẩm) thu được có tính dẻo, đặc kẹo thành 1 khối, màu xanh đen đậm. các cao lá Neem tan trong dung môi tách chiết ban đầu.

Cao Tỏi: cao chiết tổng (chưa trừ ẩm) của Tỏi có dạng tủa màu cam (dung môi EtOH) hoặc trắng (dung môi EtOAc và hexan). Các cao Tỏi tan trong dung môi tách chiết ban đầu.

Như vậy với mỗi loại cây khác nhau được chiết trong các dung môi khác nhau sẽ cho khối lượng cao chiết tổng và hiệu suất cao chiết khác nhau, thậm chí với cùng 1 loại cây nhưng nếu chiết trong các dung môi khác nhau thì vẫn sẽ cho khối lượng cao chiết tổng và hiệu suất chiết khác nhau. Điều này cũng đã được Turkey khẳng định trong nghiên cứu công bố trước đó [12].



Hình 1 Cao chiết tổng của các mẫu Diệp hạ châu (EtOH; EtOAc, Hexan) – trái, Neem (EtOH; EtOAc, Hexan) – giữa và Tỏi (EtOH; EtOAc, Hexan) – phải

Bảng 1 Hiệu suất chiết của các mẫu cao Diệp hạ châu, Neem và Tỏi

	Dung môi	Khối lượng mẫu (g)	Khối lượng cao thu được (g)	Độ ẩm (%)	Hiệu suất chiết (%)
Diệp hạ châu	EtOH	500	17,87	13,63 ± 0,30	3,09
	EtOAc	500	12,60	13,08 ± 0,30	2,19
	Hexan	500	16,59	13,55 ± 0,30	2,87
Neem	EtOH	500	18,60	13,21 ± 0,27	3,23

	EtOAc	500	16,10	13,47 ± 0,27	2,79
	Hexan	500	11,30	12,93 ± 0,27	1,97
Tỏi	EtOH	200	2,37	14,28 ± 0,39	1,02
	EtOAc	200	4,18	14,45 ± 0,39	1,79
	Hexan	200	4,23	15,02 ± 0,39	1,80

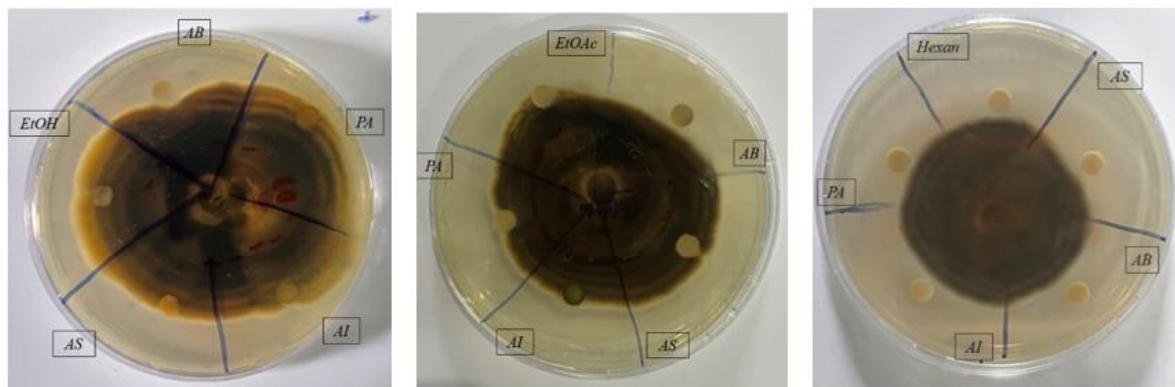
3.2 Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng nấm của cao chiết

3.2.1 Hoạt tính ức chế nấm *Curvularia* sp. của các cao chiết

Hoạt tính ức chế nấm *Curvularia* sp. thử nghiệm được xác định bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch (paper disc diffusion).

Kết quả từ Hình 2 cho thấy, đường kính vòng kháng nấm *Curvularia* sp. của 9 loại cao, trong đó có 2 mẫu gồm mẫu cao chiết Tỏi trong hexan và mẫu cao chiết lá Neem trong hexan có sự xuất hiện của vòng kháng nấm. Đường kính vòng kháng nấm *Curvularia* sp. của 9 mẫu cao được liệt kê cụ thể trong Bảng 2. Trong đó ghi nhận được mẫu cao chiết Tỏi trong dung môi hexan có tác dụng kháng nấm (xuất hiện vòng kháng (3,3 ± 0,58) mm) trong khi cao chiết Tỏi trong 2 dung môi còn lại là etyl acetat và ethanol không ghi nhận được sự xuất hiện của vòng kháng nấm. Trong một nghiên cứu tương tự về hoạt tính kháng nấm thực hiện bởi Khairan trước đó, ghi nhận rằng tuy dịch chiết phần củ của Tỏi trong dung môi xyclohexan có khả năng kháng lại một số

chủng nấm bệnh như *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* và *Sclerotium rolfsii* nhưng dung môi chiết cho hiệu quả kháng nấm tốt nhất lại là etyl acetat [13]. Sự khác biệt về hiệu quả kháng nấm trên có thể giải thích do sự khác biệt về chủng nấm thí nghiệm, các chủng tuy cùng chi nhưng vẫn có sự khác biệt về khả năng bị ức chế và tiêu diệt khác nhau với các mẫu cao chiết nhất định. Nghiên cứu này còn ghi nhận sự xuất hiện của vòng kháng nấm của mẫu cao chiết Neem trong dung môi hexan (3,3 ± 0,58) mm đối với nấm *Curvularia* sp. Hoạt tính kháng nấm nói chung và nấm *Curvularia* sp. của cây Neem cũng đã được ghi nhận trong những nghiên cứu trước đó, cụ thể trong nghiên cứu của Adepoju và cộng sự năm 2014 đã ghi nhận được khả năng kháng nấm *Curvularia* sp. của cao chiết hạt Neem trong dung môi dầu ether [14]. Như vậy, có thể ghi nhận rằng có sự khác biệt đáng kể về khả năng kháng nấm đối với các mẫu nấm phân lập từ các khu vực địa lí khác nhau. Ngoài ra, trong nghiên cứu này, ở những mẫu cao khác, không ghi nhận được sự xuất hiện của vòng kháng nấm.



Hình 2 Hoạt tính kháng nấm của 9 mẫu cao chiết bằng phương pháp khuếch tán đĩa giấy (AB: Amphotericin B; PA: Diệp hạ châu; AI: Neem; AS: Tỏi)

Bảng 2 Đường kính vòng kháng nấm của các mẫu cao chiết với nấm

Cao chiết	Dung môi	Đường kính kháng nấm trung bình (mm)
Diệp hạ châu	EtOH	–
	EtOAc	–
	Hexan	–
Neem	EtOH	–
	EtOAc	–
	Hexan	3,30 ± 0,58
Tỏi	EtOH	–
	EtOAc	–
	Hexan	4,30 ± 0,58
<i>Amphotericin B</i>		5,70 ± 0,58

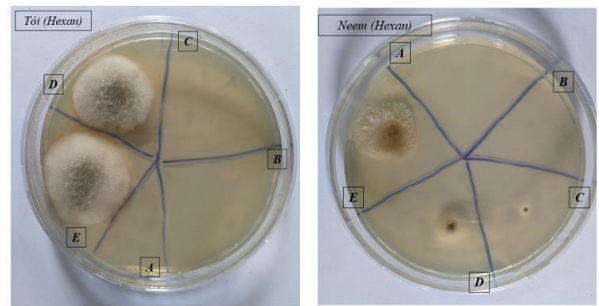
3.2.2 Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ kháng nấm tối thiểu (MFC) của các cao chiết

Kết quả xác định MIC của các cao chiết đối chủng nấm *Curvularia sp.* cho thấy hoạt tính kháng nấm của Tỏi trong dung môi hexan tốt nhất ở nồng độ 2,5 mg/mL sau 48 giờ, tính kháng nấm của Neem trong dung môi hexan tốt nhất ở nồng độ 5 mg/mL sau 48 giờ (Bảng 3). Các cao chiết Tỏi và Neem trong các dung môi là EtOH và EtOAc cũng như các cao chiết Diệp hạ châu không ghi nhận được hoạt tính kháng nấm.

Bảng 3 Kết quả MIC của các mẫu cao chiết với nấm *Curvularia sp.* sau 48 giờ.

Cao chiết	Dung môi	MIC (mg/mL)
Diệp hạ châu	EtOH	> 10
	EtOAc	> 10
	Hexan	> 10
Neem	EtOH	> 10
	EtOAc	> 10
	Hexan	5
Tỏi	EtOH	> 10
	EtOAc	> 10
	Hexan	2,5

Kết quả xác định MFC ghi nhận thời gian và nồng độ cao chiết có khả năng ức chế sự phát triển của *Curvularia sp.* (Hình 3). MFC của cao chiết Tỏi trong hexan được xác định là 2,5 mg/mL sau 48 giờ. MFC của cao chiết Neem trong hexan được xác định là 5 mg/mL sau 48 giờ. Theo CLSI A26, một hợp chất được coi là có khả năng diệt nấm nếu MFC/MIC ≤ 4, ngược lại nếu MFC/MIC > 4 thì hợp chất đó chỉ có thể xác định có khả năng ức chế nấm [15].



Hình 3 MFC của cao chiết Tỏi trong hexan – trái và Neem trong hexan – phải, ở các nồng độ khác nhau (A-10 mg/mL; B-5 mg/mL; C-2,5 mg/mL; D-1,25 mg/mL; E: 0,625 mg/mL) sau 48 giờ

Như vậy, trong nghiên cứu này, cả 2 cao chiết được xác định có hoạt tính kháng nấm là cao chiết Tỏi trong hexan và cao chiết lá Neem trong hexan đều có tỷ lệ MFC/MIC ≤ 4. Điều này chứng minh cả 2 cao chiết này đều có khả năng diệt nấm *Curvularia sp.* với nồng độ tối thiểu lần lượt là 2,5 mg/mL và 5 mg/mL. Như vậy, 2 cao chiết Tỏi và Neem trong hexan đều cho thấy tiềm năng đáng kể trong việc kháng nấm nói chung và *Curvularia sp.* nói riêng.

4 Kết luận

Kết quả ghi nhận được 9 loại cao của Diệp hạ châu, Neem, Tỏi với 3 dung môi EtOH, EtOAc và hexan. Trong đó, hiệu suất chiết cao tốt nhất là cao chiết Diệp hạ châu trong dung môi EtOH (3,58 %), hiệu suất thấp nhất là cao chiết Tỏi trong dung môi EtOH (1,19 %). Khi kiểm tra hoạt tính kháng nấm của các mẫu cao đối với *Curvularia sp.*, kết quả khuếch tán đĩa giấy cho thấy chỉ có 2 trên 9 mẫu cao là cao Tỏi (hexan) và cao Neem (hexan) có hoạt tính kháng nấm, sau đó MIC và MFC được thực hiện cho thấy cao Tỏi (hexan) có khả năng kháng nấm *Curvularia sp.* ở nồng độ 2,5 mg/mL sau 48 giờ nuôi cấy, tương tự cao Neem (hexan) cũng xác định được MIC và MFC ở nồng độ 5 mg/mL. Từ những kết quả trên, có thể tiếp tục thực hiện các nghiên cứu phát triển phân tích và chiết xuất cụ thể các hợp chất có khả năng kháng nấm từ cao chiết tổng nhằm tăng hiệu quả kháng nấm thể hiện qua chỉ số MIC và MFC.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.115/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

- 1 Crosswhite, F. S., & Crosswhite, C. D. (1984). Aloe vera, Plant Symbolism and the Threshing Floor. *Desert Plants*.
2. Surjushe, A., Vasani, R., & Saple, D. G. (2008). Aloe vera: a short review. *Indian Journal of Dermatology*, 53(4), 163-166. DOI: 10.4103/0019-5154.44785
3. Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2010). Aloe vera: A plant for many uses. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8.
4. Retno, K., Dewa Ngurah, S., Youji, N., & Takashi, H. (2012). Destructive Leaf Rot Disease Caused by *Fusarium oxysporum* on Aloe barbadensis Miller in Bali. *Agricultural Science Research Journal*, 2(6), 295-301.
5. Shutrodhar, A., & Shamsi, S. (2013). Anthracnose and leaf spot diseases of Aloe vera L. from Bangladesh. *Dhaka University Journal of Biological Sciences*, 22, 103-108. DOI: 10.3329/dujbs.v22i2.46285
6. Avasthi, S. (2015). Occurrence of leaf spot diseases on Aloe vera (L.) Burm.f. caused by *Curvularia* species from Madhya Pradesh, India. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 16, 79-83. DOI: 10.13057/biodiv/d160110
7. Avasthi, S., Gautam, A., & Bhadauria, R. (2011). First report of anthracnose disease of Aloe vera caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Research in Biology*.
8. WA, C., DG, G., & JH, G. (1980). Biotypes of *Stemphylium botryosum* on Alfalfa in North America. *Ecology and Epidemiology*, 1981(76), 679-684.
9. Ngan, L. T. M., & Tan, M. T. (2021). Antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* L. red flower against antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and identification of the flower constituents. 54(7), e10889. DOI: 10.1590/1414-431X2020e10889
10. Shakhathreh, M. A., Al-Smadi, M. L., Khabour, O. F., Shuaibu, F. A., Hussein, E. I., & Alzoubi, K. H. (2016). Study of the antibacterial and antifungal activities of synthetic benzyl bromides, ketones, and corresponding chalcone derivatives. *Drug Des Devel Ther*, 10, 3653-3660. DOI: 10.2147/dddt.s116312
11. Turker, H. (2009). Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 181-186. DOI: 10.4194/trjfas.2009.0209
12. Khairan, K., Aulina, A., Bahi, M., Eriana, C., & Sriwati, R. (2019). Fungicidal activity of garlic (*Allium sativum*) bulbs extracts against plants pathogenic fungi *Jonal Hama Dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 19, 23. DOI: 10.23960/j.hptt.11923-32
13. Adepoju, A., Femi-Adepoju, A., & Ogunkunle, T. (2014). Antifungal activities of seed oil of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Global Journal of Biology, Agriculture & Health Science*, Vol.3(1):106-109, 106-109.
14. CLSI (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. *CLSI Document, M26-A*.

Investigation of fungicidal activities of *phyllanthus amarus*, *allium sativum*, and *azadirachta indica* against leaf atrophy in *Aloe vera*

Le Thi Thanh Nga¹, Vo Thanh Sang²

¹NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

²Institute of Applied Technology and Sustainable Development, Nguyen Tat Thanh University

ltnnga@ntt.edu.vn

Abstract Leaf atrophy caused by *Curvularia* sp. in *Aloe vera* is one of the significant negative impacts on crop yields and quality. Therefore, screening and determining the fungicidal and fungistatic activities of natural extracts are potential to inhibit and exterminate the pathogenic fungi as the causal agent. This study was conducted to determine the fungicidal activities against *Curvularia* sp. of three plants, including *Phyllanthus amarus*, *Allium sativum*, and *Azadirachta indica*. The extracts with different polar solvents were yielded by liquid-liquid extraction method. Disk-diffusion and broth microdilution methods were used to determine the fungicidal activities of plant extracts.

The treatment of the hexane extracts of *Allium sativum* and *Azadirachta indica* can produce an antibacterial ring against the activity of the fungus *Curvularia* sp. The minimum inhibitory and minimum antifungal concentrations (MIC and MFC) of *A. sativum* and *A. indica* hexane extracts were both 2.5 mg/mL and 5 mg/mL, respectively.

These results provided a potential capability against *Curvularia* sp. of *A. sativum* and *A. indica* hexane extracts, bringing a promising opportunity for further study due to the development of anti-fungal products applying in *Aloe vera* crop.

Keywords *Allium sativum*, *Azadirachta indica*, *Curvularia* sp., fungicidal activities, *Phyllanthus amarus*