

SÀNG LỌC KHÁNG SINH THỰC VẬT TAN TRONG DUNG MÔI NƯỚC KHÁNG STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Mai Thị Ngọc Lan Thanh^{(1),(2)}, Ngô Thị Lành⁽²⁾

(1) Trường Đại học Bách Khoa (VNU-HCM), (2) Trường Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Thực vật cung cấp nguồn hợp chất tự nhiên phong phú trong điều trị bệnh. Bài báo này đánh giá khả năng kháng được vi khuẩn từ dịch chiết nước của cây khế *Averrhoa carambola* L. Khảo sát mười một loài có khả năng kháng khuẩn, trong đó có chín loài thực vật cho khả năng kháng khuẩn kháng kháng sinh. Đặc biệt, một loài thực vật có khả năng kháng khuẩn ở hoạt tính mạnh trên các chủng vi khuẩn khảo sát là cây khế (*Averrhoa carambola* L). Kết quả cho thấy, kích thước vòng kháng khuẩn của dịch chiết nước cây khế ở nồng độ 10g/ml tương đương 96.85 mg (tổng khối lượng chất tan)/ml (sinh khối tươi toàn cây) trên chủng *E.coli* ($D=13 \pm 0.4$ mm (đối với chiết tươi), $D=15 \pm 0$ (chiết qua đêm)), chủng *Staphylococcus aureus* ($D=15 \pm 0.7$ mm (đối với chiết tươi), $D=14.7 \pm 0.4$ mm (chiết qua đêm)), chủng vi khuẩn kháng cefalexin ($D= 11 \pm 0.7$ mm (đối với chiết tươi), $D=14 \pm 0$ (chiết qua đêm)) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Dịch chiết từ lá cho hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn hoạt tính kháng khuẩn từ dịch chiết từ quả, mặc dù pH của lá gần trung tính.

Từ khóa: kháng sinh, kháng kháng sinh, dịch chiết, thực vật, chất kháng khuẩn

1. MỞ ĐẦU

Kháng sinh là chất do vi sinh vật tiết ra, tổng hợp hoặc bán tổng hợp mà ở nồng độ thấp nhất có khả năng kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn. Tại Việt Nam, tình trạng kháng kháng sinh đã ở mức độ cao[1]. Trên thế giới, vấn đề vi khuẩn kháng thuốc ngày càng phát triển và giới hạn sự lựa chọn trong việc sử dụng thuốc để chữa bệnh, đặc biệt đối với sự xâm nhiễm của vi khuẩn Gram (-) và vi khuẩn Gram (+). Trong đó có các chủng kháng kháng sinh phổ biến như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) là nguyên nhân chính trong sự bùng nổ việc nhiễm khuẩn ở bệnh viện và ở cộng đồng trên toàn thế giới. Các chất có nguồn gốc tự nhiên là một nguồn lợi đáng kể để nghiên cứu và sản xuất thuốc thay thế các chất hoá học tổng

hợp[2]. Thảo dược đang ngày càng được chứng minh vai trò quan trọng của mình trong nền công nghiệp dược phẩm như là một giải pháp an toàn sinh học thay thế cho các thuốc hoá học tổng hợp[3]. Thảo dược được ưa chuộng bởi tính an toàn sinh học, không có hoặc ít có tác dụng phụ, thậm chí chưa tìm thấy vi khuẩn kháng thuốc[4]. Năm 2014, Hoàng Minh Chung và cộng sự đã nghiên cứu thành công kháng sinh thực vật điều trị viêm họng đầu tiên ở Việt Nam cũng như trên thế giới, đây là đề tài cấp nhà nước trong suốt hơn mười năm nghiên cứu kháng sinh thực vật. Mục đích của nghiên cứu này sàng lọc dịch chiết từ các cây có hoạt tính kháng khuẩn và lựa chọn dịch chiết nước cây khế *Averrhoa camrambola* L làm nguồn thông tin cho những nghiên cứu tiếp theo trong việc tìm thuốc kháng

sinh mới có độ phân cực mạnh, tan được trong dung môi nước.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mười một loài thực vật mọc ở Bình Dương được phân loại tại Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên Trường Đại học Thủ Dầu Một. *E.coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 do công ty ATCC của Mỹ. Chủng vi khuẩn kháng cefalexin được cung cấp bởi Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên Trường Đại học Thủ Dầu Một. Kháng sinh chuẩn cefalexin được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh. Môi trường Muller-Hinton: Muller-Hinton Agar (MHA), Muller-Hinton lỏng (MHB)

2.2. Phương pháp

Chuẩn bị mẫu cây cần khảo sát

Mẫu thực vật được phân loại tại Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên Trường Đại học Thủ Dầu Một. Các mẫu cây chuẩn bị trong sàng lọc khả năng kháng khuẩn đều có nồng độ bằng nhau là 10g (sinh khối tươi)/ml. 1kg mẫu cây được cắt nhỏ, xay nhỏ bằng máy xay sinh tố Phillips trong 100 ml nước cất. Phần dịch này được chia làm 2 phần. Phần 1, được ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút để thu dịch, bã còn lại ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch loại bã. Dịch sẽ được lọc tiếp qua giấy lọc Whatman. Dịch chiết tươi này sẽ được cho vào bình tam giác và được khử trùng bằng phương pháp chiếu tia UV trong thời

gian 1 giờ, sau đó đem đi khảo sát khả năng kháng khuẩn. Phần 2, sử dụng phương pháp chiết ngâm đậm, mẫu dịch được chiếu tia UV khử trùng trong 1 giờ, sau đó được đưa vào trong tủ sấy ở nhiệt độ 50°C, để qua đêm. Sau 24 giờ, vắt lấy nước, sau đó đem đi khảo sát khả năng kháng khuẩn. Dịch chiết cây được sấy ở 60°C trong vòng 7 ngày, cân bằng cân phân tích đến khi khối lượng thay đổi dưới 0.001g để xác định tổng lượng chất tan trong mẫu dịch chiết ban đầu. Nồng độ vi khuẩn là 10⁶cfu/ml tương ứng giá trị OD=0.5 McFarland bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 610nm.

Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của dịch chiết thực vật bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Sử dụng phương pháp Kirby-Bauer. Các giếng trên đĩa thạch được khoan có kích thước lỗ 5mm. Các giếng được làm đầy bằng dịch chiết với thể tích 100μl dịch chiết. Sau đó, các đĩa được ủ ở 37°C trong vòng 24 giờ. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các kích thước vòng kháng khuẩn theo milimet (mm) được đọc sau 24 giờ và sử dụng tiêu chuẩn vòng kháng khuẩn của CLSI để giải thích [6].

Xử lý số liệu: Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần. Số liệu thu được xử lý thống kê toán học bằng phần mềm Excel 2008.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch chiết

Bảng 1. Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch chiết

Tên mẫu			Bộ phận sử dụng	Phần 1			Phần 2		
				<i>E.coli</i>	S.A	Vi khuẩn kháng cefalexin	<i>E.coli</i>	S.A	Vi khuẩn kháng cefalexin
Cefalexin (1mg/ml)					15±0.3				
Kinh giới	<i>Lamiaceae</i>	<i>Elsholtzia cristata</i>	Toàn cây	-	-	-	3 ± 0,8	-	5,3 ± 0,5
Rẻ quạt	<i>Iridaceae</i>	<i>Belamcanda</i>	Toàn cây	-	-	-	-	14 ± 0.8	5.8 ± 0.2

		<i>chinensis</i>							
Mã đề	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago asiatica</i> L.	Toàn cây	5.6± 0.3	6.5 ± 0.4	8 ± 0.8	9 ± 0	12.3 ± 0.5	13.3 ± 0.5
Tiêu lóp	<i>Piperaceae</i>	<i>Piper longum</i>	Toàn cây	-	-	-	4.3 ± 0.5	11.8 ± 0.2	3.7 ± 0.5
Rau sam	<i>Portulacaceae</i>	<i>Portulaca oleracea</i>	Toàn cây	4.5 ± 0.4	-	-	-	12 ± 0.8	3.3 ± 0.5
Hoa sữa	<i>Apocynaceae</i>	<i>Alstonia scholaris</i> L.	Toàn cây	-	-	8 ± 0.8	12 ± 0.8	8.3 ± 0.5	-
Chè xanh	<i>Theaceae</i>	<i>Camellia sinensis</i>	Toàn cây	-	13.5 ± 0.4	7.8 ± 0.2	-	8.3 ± 0.5	6.2 ± 0.2
Diệp hạ châu xanh	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Phyllanthus urinaria</i> L.	Toàn cây	7.5 ± 0.4	10 ± 0.8	6.5 ± 0.4	6± 0.8	10.5 ± 0.4	7.3 ± 0.5
Gấc	<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Momordica cochinchinensis</i>	Toàn cây	-	6.5 ± 0.4	5 ± 0.8	-	5 ± 0	4.3 ± 0.5
Khế	<i>Oxalidaceae</i>	<i>Averrhoa carambola</i> L.	Toàn cây	13 ± 0.4	15 ± 0.7	11± 0.7	15 ± 0	14.7 ± 0.4	14 ± 0
Điều	<i>Anacardiaceae</i>	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Toàn cây	4 ± 0.8	5.3 ± 0.5	-	-	-	-

VK±SD (Standard deviation) = (-): không có hoạt tính kháng khuẩn; kích thước đường kính vòng kháng được so sánh với kích thước đường kính vòng kháng khuẩn của kháng sinh chuẩn cefalexin trên chủng vi khuẩn S.A khảo sát. Các dịch chiết nước của các cây đều ở cùng nồng độ sinh khối tươi là 10mg/ml.

Từ bảng 1, có mười một dịch chiết có khả năng kháng khuẩn. Trong đó có chín dịch chiết có khả năng kháng khuẩn kháng kháng sinh. Dịch chiết nước của cây khế có khả năng kháng được vi khuẩn *E.coli*, *Staphylococcus aureus*. Ở cùng một nồng độ 10g sinh khối tươi ban đầu/ml tương ứng, dịch chiết nước của cây Khế cho hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn các dịch chiết còn lại. So với kháng sinh chuẩn là cefalexin ở cùng nồng độ chất tinh khiết là 1mg/ml nhưng kích thước vòng kháng khuẩn lần lượt đối với chủng *E.coli* và *Staphylococcus aureus* là 16±0; 15±0.3. So sánh vòng kháng khuẩn của kháng sinh chuẩn với vòng kháng khuẩn của dịch chiết nước từ cây khế ở nồng độ 10g sinh khối tươi/ml tương đương 28.5 mg tổng khối lượng chất tan/ml cho kích thước vòng kháng khuẩn tương đương nhau cụ thể là đối với 2 chủng vi khuẩn *E.coli* và *Staphylococcus aureus*, chủng vi khuẩn kháng cefalexin là 15 ± 0, 14.7 ± 0.4, 14 ± 0.

3.2. Khảo sát bộ phận cho hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất trên cây khế trên chủng vi khuẩn kháng cefalexin

Kết quả cho thấy ở cùng nồng độ 10g sinh khối tươi/ml, chỉ có lá và quả của cây khế cho khả năng kháng khuẩn. Đối với quả, ở nồng độ 10g sinh khối tươi/ml tương đương 165.19 mg tổng khối lượng chất tan/ml, kích thước vòng kháng khuẩn 10.3 (mm)±0.4. Còn đối với lá, ở nồng độ 10g sinh khối tươi/ml tương đương 28.5mg tổng chất tan/ml, kích thước vòng kháng khuẩn trung bình bằng 10(mm)±0. Ở cùng hai nồng độ sinh khối tươi ban đầu, nhưng nồng độ tổng khối lượng chất tan/ml của dịch lá nhỏ hơn gần 6 lần so với nồng độ tổng khối lượng chất tan /ml của dịch quả, nhưng hoạt tính kháng khuẩn từ dịch chiết cho kết quả gần tương với dịch chiết quả. Điều này cho thấy tiềm năng kháng khuẩn từ dịch chiết lá có thể cho hoạt tính kháng khuẩn cao hơn dịch chiết quả. Như vậy từ trước đến nay trong dân gian hay các bài thuốc cổ truyền trị các bệnh nhiễm khuẩn như ho, cảm cúm... thường sử dụng bộ phận hoa, nhưng trong

ngiên cứu này các bộ phận như quả và lá lại cho hoạt tính kháng khuẩn, còn dịch chiết

nước hoa của cây khế thì không có khả năng kháng khuẩn.



Dịch chiết Hoa pH=6.8



Dịch chiết lá pH=6.5.



Dịch chiết Quả có pH=3.

Hình 1: Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch chiết từ các bộ phận hoa, lá, quả của cây Khế *Averrhoa carambola* L.

4. KẾT LUẬN

Dịch chiết tươi trong dung môi nước từ cây khế cho khả năng kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, chủng vi khuẩn kháng cefalexin. Bộ phận quả và lá của cây khế cho hoạt tính

kháng khuẩn mạnh trên tất cả các chủng khảo sát. Dịch chiết từ lá cho hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất so với các dịch chiết từ bộ phận hoa và quả của cây Khế *Averrhoa carambola* L.

SCREENING THE ANTIBACTERIAL FROM THE AQUEOUS EXTRACTS AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Mai Thi Ngoc Lan Thanh, Ngo Thi Lanh

ABSTRACT

The plant could offer a source of natural compounds for drug discovery of infectious diseases. This research aims to evaluate the aqueous *Averrhoa carambola* L extracts which against antibiotic resistant bacteria by the diffusion method and microdilution method. There are twenty one species is screened but there are eleven species which against all of bacteria. Specially, The *Averrhoa carambola* L extracts in which is concentrated 10g (biomass of fresh specimens)/ml, inhibit the best for all of screening bacteria. Two species of antibiotic resistant bacteria are inhibited by the *Averrhoa carambola* L extracts. The minimum inhibited concentration of the aqueous *Averrhoa carambola* L extracts is the equivalent of 3g (biomass of fresh specimens)/ml of 29.05 mg total solute/ml which can against two species of antibiotic-resistant bacteria. The results indicated the aqueous *Averrhoa carambola* L extracts concentrated in is 10g (biomass of fresh specimens)/ml that is equivalent to 96.85 mg total solute/ml, which create the inhibition zone of sizes are 13 ± 0.4 (fresh extracts) and 15 ± 0 (overnight extracts) for *E.coli*, 15 ± 0.7 (fresh extracts) and 14.7 ± 0.4 (overnight extracts) for *Staphylococcus aureus*, 11 ± 0.7 (fresh extracts) and 14 ± 0 (overnight extracts) for cefalexin-resistant bacteria. The minimum bactericidal concentration (MBC) of aqueous *Averrhoa carambola* L is 9g (biomass of fresh specimens)/ml that is equivalent to 25.65 mg total solute/ml. Therefore, these results offer the novel polarizable phytocids through the ability of inhibited bacteria from the aqueous *Averrhoa carambola* L extracts.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Kính, N.V. (2010), *Phân tích thực trạng sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh ở Việt Nam*, Hội thảo khoa học lần thứ nhất GARP-Việt Nam.
- [2] Cos, P., et al. (2006), *Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'*. Journal of ethnopharmacology. **106**(3): p. 290-302.
- [3] Mahesh, B. and S. Satish (2008), *Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens*, World journal of agricultural sciences, **4**(5): p. 839-843.
- [4] Seyyednejad, S. and H. Motamedi (2010), *A review on native medicinal plants in Khuzestan, Iran with antibacterial properties*, International Journal of Pharmacology, **6**(5): p. 551-560.
- [5] Okamura, S., et al. (2015), *Action mechanism of 6, 6'-dihydroxythiobinupharidine from Nuphar japonicum, which showed anti-MRSA and anti-VRE activities*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, **1850**(6): p. 1245-1252.
- [6] Wikler, M.A. and F.R. Cockerill, 2008. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute,.
- [7] Carson, C., K. Hammer, and T. Riley, 1994. *Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of Escherichia coli and Staphylococcus aureus to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil)*. Microbios. **82**(332): p. 181-185.
- [8] Shanholtzer, C.J., et al., 1984 *MBCs for Staphylococcus aureus as determined by macrodilution and microdilution techniques*. Antimicrobial agents and chemotherapy. **26**(2): p. 214-219.

- Ngày nhận bài: 26/03/2016
- Chấp nhận đăng: 30/05/2016

Liên hệ: Mai Thị Ngọc Lan Thanh

Khoa Khoa học Tự Nhiên Trường Đại học Thủ Dầu Một
Số 6 Trần Văn Ôn, Phú Hòa – Thủ Dầu Một – Bình Dương
Email: thanhmtnnl@tdmu.edu.vn.