



# KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM CỦA CÁC CAO PHÂN ĐOẠN CHIẾT TỪ THÂN HÀNH TRÌNH NỮ HOÀNG CUNG

## Studies on antibacterial and antifungal activities of extract from bulbs of *Crinum latifolium* (L)

Nguyễn Thị Ngọc Hà<sup>1</sup>, Võ Thị Bạch Huệ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai

<sup>2</sup>Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh

**TÓM TẮT.** Trình nữ Hoàng cung (TNHC) từ lâu đã đã được biết đến với nhiều tác dụng sinh học. Nghiên cứu được thực hiện với mục đích xác định hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cao chiết từ thân hành trình nữ hoàng cung, một bộ phận dùng chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học. Sàng lọc bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường rắn, cao ethyl acetat thể hiện tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm. Tiếp tục tách cao F1 thành các phân đoạn nhỏ hơn và nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm. Kết quả thu được cho thấy tác dụng kháng khuẩn của các cao chiết từ thân hành TNHC còn hạn chế, với cao F1 cho MIC > 10 mg/ml, các cao phân đoạn F1.4 và F1.5 cho MIC > 5mg/ml. Tuy nhiên khả năng kháng nấm *Candida albicans* của các phân đoạn tốt, với F1.6 cho hiệu quả tốt nhất có MIC = 0,64 mg/ml.

**TỪ KHÓA:** Trình nữ hoàng cung, thân hành, kháng khuẩn, kháng nấm

**ABSTRACT.** *Crinum latifolium* is a widely used traditional herb in Viet Nam. The purpose of this research is to study the antibacterial, antifungal activity and to determine the MIC of the extract from the bulbs of *C. latifolium*. Even though there are many studies into/of/on *Crinum latifolium* L. little is known about the phytochemicals and biological activities of *C. latifolium* (L) bulbs extract. 7 fractions of ethyl acetate extract were fractionated using vacuum liquid chromatography, namely F1 to F7. The results showed that the F1 has slight activity against bacteria with a MIC > 10 mg/mL, similarly for F1.4 and F1.5 MIC with a MIC > 5mg/ml. However, the F1.6 possesses significant antifungal activity with a MIC of 0,64 mg/mL.

**KEYWORDS:** *Crinum latifolium* (L), bulbs, antibacterial, antifungal

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Trình Nữ Hoàng cung (*Crinum latifolium* L. Amaryllidaceae) từ lâu đã là cây thuốc quý đã được lưu truyền trong y học dân gian, thường được sử dụng với công dụng kháng viêm, kháng khối u, chống oxy hóa, giảm đau....

Alkaloid và flavonoid là hai nhóm hợp chất được nghiên cứu nhiều ở TNHC. Nghiên cứu tác dụng sinh học luôn được thực hiện song song với nghiên cứu thành phần hóa học trong dược liệu. Nhờ các nghiên cứu về tác dụng sinh học đã chứng minh công dụng của dược liệu vốn được dân gian sử dụng để chữa bệnh, đồng thời các nghiên cứu còn góp phần phát hiện phương pháp điều trị mới.

Các công trình nghiên cứu về TNHC đã chứng minh các dịch chiết và các hợp chất tinh khiết được phân lập từ TNHC cho tác dụng kháng khối u, chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn.... Trong đó, dịch chiết methanol từ lá TNHC đã được chứng minh có tác dụng kháng vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli*.

Hiện nay, các nghiên cứu về TNHC chủ yếu thực hiện trên lá và tại Việt Nam nghiên cứu được thực hiện trên thân hành TNHC rất ít. Do đó, nghiên cứu được thực hiện với mong muốn khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của cao chiết từ thân hành TNHC.

### 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1 Điều chế các cao phân đoạn

Thân hành cây TNHC được thu hái tại Bình Định vào tháng 3/2016. Dược liệu được rửa sạch, cắt nhỏ, phơi hoặc sấy đến độ ẩm thích hợp, xay thành bột thô để chiết xuất. 5 kg bột thân hành TNHC được chiết với ethanol 70% bằng

phương pháp ngâm kiệt. Dịch chiết cồn được cô thu hồi dung môi và tiến hành chiết phân bố lỏng - lỏng với ethyl acetat để thu được cao ethyl acetat (cao F1). Từ cao F1 tiến hành sắc ký cột nhanh với các dung môi rửa giải *n* - hexan, cloroform, ethyl acetat và methanol để thu được các cao phân đoạn.

#### 2.2 Chủng vi sinh vật và môi trường

Các chủng vi sinh vật được sử dụng trong thử nghiệm gồm *Escherichia coli* ATCC 25922; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Staphylococcus aureus* để kháng methicillin (MRSA) ATCC 43300 và vi nấm *Candida albicans* ATCC 10231.

Môi trường MHA cho vi khuẩn và môi trường MHA bổ sung glucose 2% cho vi nấm.

#### 2.3 Phương pháp nghiên cứu

**Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường rắn.**

Mẫu cao được hòa tan trong DMSO 10% để thu được mẫu thử có nồng độ 100 mg/ml. Vi khuẩn và vi nấm được nuôi cấy trên môi trường BHA trong 16 - 24 giờ; sử dụng 3 - 5 khóm vi sinh vật để pha huyền dịch có độ đục 0,5 McFarland, tương ứng với giá trị OD 600 nm (vi khuẩn), OD 530 nm (nấm men) từ 0,08 - 0,12. Giá trị tương đương 10<sup>8</sup> CFU/ml.

Received: April, 19th, 2019

Accepted: July, 25th, 2019

\*Corresponding Author

Email: hangoc266@gmail.com

Huyền dịch vi khuẩn được trải đều trên bề mặt đĩa thạch, sau đó đĩa thạch được để khô 15 phút. Tiến hành đục lỗ đường kính 6 mm và nhỏ 50 µl dịch thử vào mỗi lỗ. Ủ đĩa thạch trong tủ ẩm ở 35 - 37 °C. Đọc kết quả sau 16 - 18 giờ đối với vi khuẩn và 20 - 24 giờ đối với vi nấm. Chất thử có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm sẽ cho vòng ức chế xung quanh giếng có chất thử.

Chuẩn bị mẫu chứng âm là DMSO 10%; mẫu kháng sinh ampicillin và amoxicillin được sử dụng như đối chứng dương.

#### Xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) bằng phương pháp pha loãng trên đĩa thạch.

Tiến hành pha dung dịch chất thử mẹ trong DMSO 10%, dung dịch này có nồng độ gấp 20 lần so với nồng độ thử nghiệm. Pha loãng liên tục 1/2 lần trong môi trường MHB, để được dãy nồng độ giảm dần. Hút chính xác 1 mL dung dịch mẹ ở mỗi nồng độ trên, phân tán trong 9 mL môi trường MHA, cho vào hộp petri.

Vi khuẩn, vi nấm được pha loãng trong dung dịch nước muối sinh lý đến nồng độ 10<sup>6</sup> CFU/ml. Dùng micropipet hút 1 µl dịch vi khuẩn/ vi nấm nhỏ lên bản thạch ở những vị trí được đánh dấu sẵn. Ủ vi khuẩn ở 37 °C trong vòng 24 giờ, vi nấm ở 35 °C trong 48 giờ.

Đọc kết quả, so với mẫu chứng chứa DMSO là dung môi pha chất thử nghiệm. MIC là nồng độ thấp nhất ức chế sự phát triển của vi sinh vật thử nghiệm.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1 Điều chế các cao phân đoạn

Từ 5 kg bột dược liệu sau khi chết ngấm kiệt với ethanol 70% và cô thu hồi dung môi thu được 2,1 kg cao còn đặc. Cao còn đặc thu được hòa lại trong nước và chiết phân bố lỏng – lỏng với ethyl acetat thu được 16 g cao ethyl acetat (cao F1). Từ cao F1 tiến hành sắc ký cột và rửa giải bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần thu được 6 cao phân đoạn được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Kết quả tách các phân đoạn từ cao F1

Phân đoạn	Dung môi rửa giải	Khối lượng (mg)
F1.1	n-hexan	47,0
F1.2	n-hexan – CHCl <sub>3</sub> (1:1)	20,3
F1.3	CHCl <sub>3</sub>	932,5
F1.4	CHCl <sub>3</sub> - EtOAc (1:1)	460,6
F1.5	EtOAc	542,6
F1.6	EtOAc – MeOH (1:1)	3244,8
F1.7	MeOH	499,0

#### 3.2 Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn

Các chủng vi sinh vật được ký hiệu *Escherichia coli* (EC); *Klebsiella pneumoniae*(KP); *Pseudomonas aeruginosa* (PA) ; *Staphylococcus aureus*(MSSA); *Staphylococcus aureus* đề kháng methicillin (MRSA) và vi nấm *Candida albicans* ATCC 10231 (CA).

Cao F1 cho tác dụng kháng khuẩn trên cả 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm và kháng nấm. Tiếp tục thử tác dụng của các phân đoạn F1.1 đến F1.7 được tách từ cao F1. Kết quả thể hiện ở Bảng 2.

Cao F1 có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm tốt. Tuy nhiên khi tách cao F1 thành các phân đoạn nhỏ thì không phải tất cả các phân đoạn đều cho tác dụng kháng khuẩn. Cụ

thể chỉ có phân đoạn F1.4 và F1.5 cho tác dụng kháng khuẩn tốt, trên nhiều chủng vi khuẩn, đặc biệt là trên chủng *S. aureus*. Hình 1A thể hiện sự ức chế ức chế vi khuẩn *S. aureus* của cao F1, hình 1B sự ức chế ức chế vi khuẩn *S. aureus* của các cao phân đoạn, trong đó chỉ có cao F1.4 và F1.5 ức chế sự phát triển của vi khuẩn xung quanh vị trí mẫu thử khuếch tán.

Phân đoạn F1.6 và F1.7 không có tác dụng kháng vi khuẩn nhưng cho tác dụng kháng nấm *Candida albicans* tốt được thể hiện ở hình 1D.

Như vậy, khả năng kháng vi sinh vật chỉ do một vài hợp chất thể hiện. Các phân đoạn cao có hoạt tính sẽ được lựa chọn để xác định khả năng ức chế vi sinh vật.

**Bảng 2.** Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn

Mẫu thử	MSSA	MRSA	EC	KP	PA	CA
F1	+	+	+	+	+	+
F1.1	-	-	-	-	-	-
F1.2	-	-	-	-	-	-
F1.3	-	-	-	-	-	-
F1.4	+	+	+	+	+	-
F1.5	+	+	+	+	+	-
F1.6	-	-	-	-	-	+
F1.7	-	-	-	-	-	+

Chú thích

“+”: có hoạt tính kháng khuẩn  
“-”: không có hoạt tính kháng khuẩn.

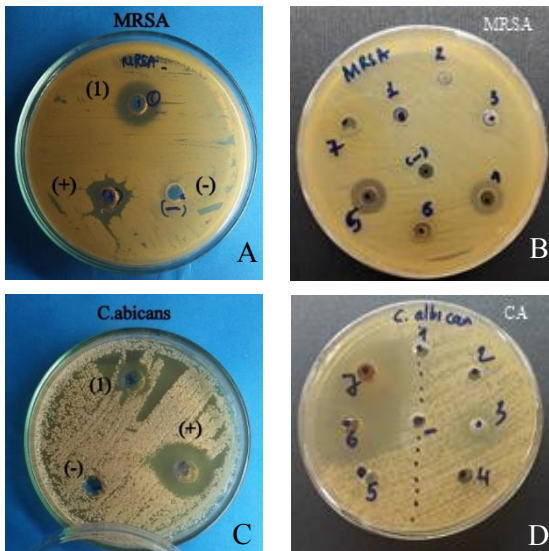
#### 3.3 Xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC)

Các phân đoạn cao thử tác dụng kháng khuẩn sẽ được pha theo dãy nồng độ 5; 10; 20 và 40 (mg/ml). Trong 3 mẫu cao thử nghiệm, cao F1.4 cho tác dụng kháng khuẩn tốt nhất. Trong 5 mẫu vi khuẩn được sử dụng, cao F1.4 cho tác dụng ức chế mạnh nhất trên 2 chủng *S. aureus*. Tuy nhiên, tác dụng ức chế vi khuẩn của các cao F1, F1.4 và F1.5 yếu, nồng độ ức chế tối thiểu cao. Như vậy, việc ứng dụng vào thực tế sẽ không khả thi khi phải sử dụng một lượng lớn dược liệu mới cho thấy được hiệu quả điều trị.

Trên đối tượng là vi nấm, các mẫu cao sẽ được pha với nồng độ từ 0,16 mg/ml đến 1,28 mg/ml. Phân đoạn F1.6 cho tác dụng kháng vi nấm *C. albicans* tốt nhất với MIC là 0,64 mg/ml. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả xác định MIC các mẫu có hoạt tính

Mẫu thử	MIC (mg/ml)					
	MSSA	MRSA	EC	PA	KP	CA
F1	10	10	20	20	20	1,28
F1.4	5	5	10	10	10	-
F1.5	10	10	10	10	10	-
F1.6	-	-	-	-	-	0,64
F1.7	-	-	-	-	-	1,28



**Hình 1.** Khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus* và vi nấm *C. albicans* của cao F1 và các cao phân đoạn

Kết quả nghiên cứu cho thấy tác dụng kháng khuẩn của dịch chiết từ thân hành TNHC thể hiện yếu. Các công trình đã công bố như tác giả Rahman (2016) đã thực hiện khảo sát tác dụng kháng *S. aureus* và *E. coli* của dịch chiết methanol từ lá, cũng cho kết quả kháng khuẩn yếu. Như vậy, hoạt tính kháng khuẩn của Trinh nữ hoàng cung là rất thấp và ít có ý nghĩa thực tế.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả sàng lọc cho thấy cao F1 cho tác dụng ức chế nhiều chủng vi khuẩn và vi nấm *Candida albicans*. Tiếp tục sàng lọc trên các cao phân đoạn cho kết quả có 2 phân đoạn là F1.4 và F1.5 cho tác dụng kháng khuẩn, và F1.6, F1.7 cho tác dụng kháng nấm. Tuy nhiên, khả năng ức chế vi khuẩn ở phân đoạn F1.4 và F1.5 còn khiêm tốn, cần sử dụng các cao, phân đoạn ở nồng độ cao, nên việc ứng dụng vào thực tế không hiệu quả. Tuy nhiên, khả năng kháng nấm ở phân đoạn F1.6 cho hiệu quả tốt, với MIC = 0,64 mg/ml, từ đó tiếp tục phân lập và khảo sát các hợp chất có tác dụng kháng nấm từ phân đoạn F1.6.

#### 5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trương Thị Thu Hiền. *Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học cây dầu dậu lá nhẵn Tetradium glabrifolium (Benth.) Hartl*. Luận văn Tiến sĩ Hóa học, Viện Hóa Học, Thành phố Hồ Chí Minh, **2014**.
- [2] Nguyễn Hữu Lạc Thủy. *Nghiên cứu thành phần hóa học, thiết lập chất đối chiếu và xây dựng quy trình kiểm nghiệm thành phần alkaloid và flavonoid cho cây Trinh nữ hoàng cung (Crinum latifolium L., Amaryllidaceae)*. Luận văn Tiến sĩ Dược học, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, TP, HCM, **2014**.
- [3] Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, **2016**, 6 (2), 71-79.
- [4] Rahman, M. A., Hussain, M. S., Millat, M. S., Ray, M. C., Amin, M. T., & Moghal, M. M. R. Screenings of *In-vitro* antimicrobial, cytotoxic and anti-inflammatory activity of crude methanolic extracts of *Crinum latifolium* (Leaves). *Journal of Medicinal Plants Research*, **2016**, 10 (37), 649 - 665.