

DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.157

## KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG FLAVONOID, ALKALOID VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA CAO CHIẾT CỎ MÀN TRÀU (*Eleusine indica*)

Nguyễn Thanh Nhật Phương<sup>1</sup>, Phạm Tấn Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Trí Tài<sup>1</sup>, Trần Hồng Đức<sup>2</sup> và Nguyễn Đức Độ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Phòng Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn huyện Châu Thành, tỉnh Hậu Giang

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 14/04/2017

Ngày nhận bài sửa: 16/06/2017

Ngày duyệt đăng: 30/11/2017

### Title:

Study on total flavonoid, total alkaloid content, and antimicrobial ability of *Eleusine indica* extract

### Từ khóa:

Alkaloid tổng, cỏ Màn Tràu, flavonoid tổng, kháng khuẩn

### Keywords:

Antimicrobial, *Eleusine indica*, total alkaloid, total flavonoid

### ABSTRACT

Goose grass (*Eleusine indica*) contains plenty of phytochemical compounds with antimicrobial activities. The aim of this study was to investigate the effects of ethanol extraction method comparing to the ultrasound-assisted extraction method on the antimicrobial activities. The yield of ultrasound-assisted extraction method was lower than that of ethanol extraction method. However, the treatment using ultrasound-assisted has higher total flavonoid (25%) and total alkaloid (28%) content. The antimicrobial activity of all treatments was recorded, in which the antimicrobial activity against *Escherichia coli* was higher than *Bacillus subtilis*. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the S70 extract for two bacteria were 12.5 and 50 mg/mL, respectively.

### TÓM TẮT

Cỏ Màn Tràu (*Eleusine indica*) chứa nhiều hợp chất tự nhiên với hoạt tính kháng khuẩn. Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích khảo sát sự ảnh hưởng của phương pháp ly trích thông thường so với phương pháp ly trích có kết hợp sóng siêu âm lên hoạt tính các hợp chất kháng khuẩn. Phương pháp ly trích kết hợp sóng siêu âm có hiệu quả thấp hơn phương pháp truyền thống. Tuy nhiên, ly trích có kết hợp sóng siêu âm mang lại hàm lượng flavonoid tổng và alkaloid tổng cao hơn khoảng 25% và 28%. Khả năng kháng khuẩn ở tất cả nghiệm thức là khá tốt, khả năng kháng đối với *Escherichia coli* cao hơn so với *Bacillus subtilis*. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết S70 tương ứng hai dòng vi khuẩn trên là 12,5 mg/mL và 50 mg/mL.

Trích dẫn: Nguyễn Thanh Nhật Phương, Phạm Tấn Phương, Nguyễn Hoàng Trí Tài, Trần Hồng Đức và Nguyễn Đức Độ, 2017. Khảo sát hàm lượng flavonoid, alkaloid và khả năng kháng khuẩn của cao chiết cỏ Màn Tràu (*Eleusine indica*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53b: 54-60.

## 1 GIỚI THIỆU

Cỏ Màn Tràu có tên khoa học là *Eleusine indica* (L.) Gaertn, thuộc họ Hòa Bản (Poaceae) (Phạm Hoàng Hộ, 1999). Theo Đông y, cỏ Màn Tràu là một vị thuốc có rất nhiều lợi ích, bao gồm các tác dụng như làm mát cơ thể, giảm đau, trị tóc bạc sớm, viêm khớp, viêm ruột, nhuận tràng, nhuận gan, giải độc, chữa cảm sốt,... (Đỗ Tất Lợi, 2003). Ngoài ra, một số nhà nghiên cứu cũng cho biết cỏ

Màn Tràu còn có tác dụng kích thích tiêu hóa, lợi tiểu, trị giun sán, huyết áp cao hay điều trị rối loạn bàng quang... (Chopra *et al.*, 1986; Nguyen Van Dan and Doan Thi Nhu, 1989). Đặc biệt, nhiều nghiên cứu cho thấy cỏ Màn Tràu chứa các chất biến dưỡng thứ cấp như alkaloid, flavonoid, phenol, steroid, tannin, coumarin và saponin (Banglacad *et al.*, 2012; Hari and Savithramma, 2013), những hợp chất này đều có nhiều hoạt tính

sinh học và là thành phần không thể thiếu của các loại thảo dược. Song song đó, các hoạt tính kháng khuẩn từ cỏ Mần Trầu cũng được báo cáo (Alaekwe *et al.*, 2015; Morah *et al.*, 2015). Tuy nhiên, ở Việt Nam, các nghiên cứu về cỏ Mần Trầu còn khá hạn chế. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm ra phương pháp ly trích hiệu quả và khảo sát hoạt kháng khuẩn của cỏ Mần Trầu là rất cần thiết.

**2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**2.1 Phương tiện**

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Sinh hóa, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Cần Thơ. Cỏ Mần Trầu khỏe mạnh, không sâu bệnh ở ven sông Hậu, quận Cái Răng, thành phố Cần Thơ. Sau khi đưa về phòng thí nghiệm, mẫu cỏ được rửa sạch với nước và hong khô tự nhiên ở điều kiện phòng thí nghiệm trong 24 giờ trước khi sử dụng. Hai đồng vi khuẩn *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* được cung cấp bởi phòng Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công Nghệ Sinh Học. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật: trong 1 lít môi trường LB gồm có 10 gram (g) trypton (Đức), 10 gram NaCl (Trung Quốc), 5 gram yeast extract (Ấn Độ) và 15 gram agar (Việt Nam). Môi trường được chuẩn về pH 7.

**Bảng 1: Thử nghiệm định tính hợp chất tự nhiên**

Thử nghiệm	Thí nghiệm	Quan sát
Alkaloid	2 ml cao chiết + 3-4 giọt thuốc thử Wagner	Tủa màu vàng
Flavonoid	1 ml cao chiết + 1 ml Pb(CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> (10%)	Màu vàng
Saponin	2 ml cao chiết + vài giọt dầu oliu + đun nóng trong 2 phút	Nhũ tương màu sữa
Terpenoid	2 ml cao chiết + 2 ml chloroform + vài giọt H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc	Màu xanh ngọc bích
Coumarin	2 ml cao chiết + 3 mL NaOH 10%	Màu vàng
Quinone	2 ml cao chiết + vài giọt HCl đậm đặc	Màu xanh lá cây
Phenol và Tannin	2 ml cao chiết + 2 ml H <sub>2</sub> O + 2-3 FeCl <sub>3</sub> (5%)	Tủa màu xanh đen

**2.2.3 Định lượng flavonoid tổng**

Hàm lượng flavonoid tổng được xác định theo phương pháp tạo màu với AlCl<sub>3</sub> (Chang *et al.*, 2002), bằng cách xây dựng đường chuẩn với quercetin (QE). Hàm lượng flavonoid tổng được biểu diễn theo miligram đương lượng quercetin trên gram cao chiết (mg QE/g cao chiết).

Tiến hành thí nghiệm:

- Xây dựng đường chuẩn: Lần lượt cho hòa tan 0,5 mL dung dịch quercetin pha trong DMSO 100% (nồng độ 20 - 100 µg/mL) và bổ sung 1,5 mL methanol và chờ trong 5 phút. Sau đó, thêm tiếp 0,1 mL AlCl<sub>3</sub> 10% và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm 0,1 mL CH<sub>3</sub>COOK 1M và 2,8 mL nước cất, lắc đều rồi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Sau 45

phút và hóa chất: máy phát sóng siêu âm dạng bể Sonorex digital 10P (Đức), máy đo quang phổ Hitachi U - 1500 (Nhật Bản), dung môi DMSO (Đức), ethanol 96% (Việt Nam), bromocresol green (Đức), atropine (Việt Nam), quercetin (Đức), ampicillin (Việt Nam).

**2.2 Phương pháp**

**2.2.1 Điều chế cao chiết cỏ Mần Trầu**

Nghiền nhỏ 500 g cỏ Mần Trầu (bao gồm cả rễ thân và lá) bằng máy xay. Cho thêm 1500 mL dung môi ethanol 70% hoặc ethanol 96% với tỷ lệ 1:3 (w/v) và ngâm trong 24 giờ. Hai nghiệm thức sau được chuẩn bị tương tự, hỗn hợp được chiếu xạ siêu âm 120W trong 45 phút và ngâm trong 24 giờ. Dịch chiết ở cả hai phương pháp đem đi cô quay và thu được 4 loại cao chiết có ký hiệu K70, S70, K96, S96. (Kí hiệu “K” không kết hợp chiếu xạ siêu âm, “S” có kết hợp chiếu xạ siêu âm, “70” dung môi ethanol 70% và “96” dung môi ethanol 96%)

**2.2.2 Định tính các hợp chất tự nhiên**

Dựa vào các phản ứng tạo màu theo mô tả của Sofowora (1993); Tiwari and Cummins (2011) được trình bày trong Bảng 1.

phút ta tiến hành xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 415 nm.

- Thí nghiệm với mẫu (1 mg/mL): Thực hiện tiến trình thí nghiệm tương tự đối với các mẫu cao như với quercetin.

**2.2.4 Định lượng alkaloid tổng**

Hàm lượng alkaloid tổng được xác định theo phương pháp hình thành phức hợp với bromocresol green (BCG), tạo thành sản phẩm có màu vàng (Shamsa *et al.*, 2008) và xây dựng đường chuẩn với atropine (AE). Hàm lượng alkaloid tổng được biểu diễn theo miligram đương lượng atropine trên gram cao chiết (mg AE/g cao chiết).

Tiến hành thí nghiệm:

- Xây dựng đường chuẩn: Lần lượt cho hòa tan 1 mL dung dịch atropine với dung môi DMSO 100% để đạt được nồng độ từ 0 đến 200 µg/ml. Sau

đó, thêm tiếp 1 ml dung dịch HCl 2N và sau khi phản ứng 5 phút thì dung dịch trên được lọc bằng giấy lọc để loại bỏ cặn. Cho dung dịch trên vào bình tách chiết lần lượt thêm vào 5 mL BCG và 5 mL dung dịch đệm phosphate (pH 4,7). Cuối cùng, hỗn hợp được lắc mạnh bằng bình tách chiết với 10 mL dung dịch chloroform, sau 2 phút phản ứng ở nhiệt độ phòng ta tiến hành xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở các bước sóng 470 nm.

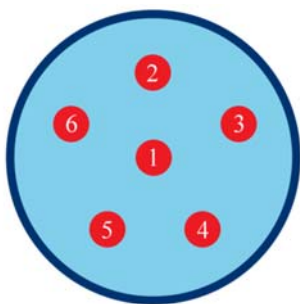
– Thí nghiệm với mẫu (1 mg/mL): Thực hiện tiến trình thí nghiệm tương tự đối với các mẫu cao như với atropine.

2.2.5 Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Xác định khả năng kháng khuẩn của cao chiết cỏ Mần Trầu ở nồng độ 100 mg/mL

Chuẩn bị thí nghiệm: 4 loại cao chiết (K70, S70, K96, S96) được pha trong DMSO 30% để đạt nồng độ 100 mg/mL. Tương tự, pha đối chứng dương ampicillin trong DMSO 30% để đạt nồng độ 10 µg/mL. Huyền phù 2 dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli* được nuôi cấy trong môi trường LB, ủ ở 37°C sau 24 giờ có mật số tương đương 10<sup>6</sup> CFU/mL.

Hút 50 µL dịch huyền phù vi khuẩn của mỗi dòng vi khuẩn trải đều trên môi trường đĩa thạch LB. Tạo 6 giếng với đường kính 6 mm sao cho mỗi giếng cách đều nhau. Cho 20 µL lần lượt các loại cao chiết, đối chứng âm (DMSO 30%) và đối chứng dương (ampicillin 10 µg/mL) đã pha vào mỗi giếng trên đĩa thạch. Ủ 37°C trong 24 giờ. Đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK = “Đường kính vòng Halo” – “Đường kính giếng”, mm) được khảo sát ở các mốc thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ.



Hình 1: Sơ đồ tạo giếng thạch trên môi trường LB

\*(1) DMSO 2% (2) K70 (3) S70 (4) K96 (5) S96 (6) Ampicilin

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

Thí nghiệm được thực hiện theo mô tả của Ruangpan (2004). Dựa vào thí nghiệm kháng khuẩn trên đĩa thạch chọn ra nghiệm thức cao chiết

hiệu quả đối với 2 dòng vi khuẩn để khảo sát giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết cỏ Mần Trầu.

Chuẩn bị thí nghiệm: cao chiết được pha loãng trong DMSO 30% theo dãy nồng độ 75; 50; 25; 12,5; 6,25 và 3,125 mg/mL. Đối chứng âm là DMSO 30%, đối chứng dương là ampicillin 10 µg/mL pha loãng trong DMSO 30%.

Hút 200 µL môi trường LB lỏng cho vào mỗi tube eppendorf (1,5 mL). Bổ sung thêm 250 µL dịch huyền phù vi khuẩn được nuôi trong 24 giờ ở 37°C đạt mật số tương đương 10<sup>6</sup> CFU/mL. Cuối cùng, bơm 50 µL cao chiết ở các nồng độ khác nhau, đối chứng âm (DMSO 30%) và đối chứng dương (ampicillin 10 µg/mL). Ủ các tube mẫu ở 37°C trong 24 giờ. Tiến hành đếm mật số vi khuẩn ở mỗi nồng độ khảo sát bằng phương pháp pha loãng mẫu và đếm trên môi trường đĩa thạch (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2009).

MIC là giá trị mà ở đó nồng độ cao chiết thấp nhất có khả năng ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn.

MBC là giá trị mà ở đó nồng độ cao chiết thấp nhất có khả năng tiêu diệt vi khuẩn.

MIC<sub>50</sub> là giá trị mà ở đó nồng độ cao chiết có hiệu quả ức chế 50% sự phát triển của vi khuẩn. Theo Ruangpan (2004), từ nghiệm thức đối chứng âm không có chất kháng khuẩn thì sự phát triển của vi khuẩn là 100%, từ đó MIC<sub>50</sub> được xác định theo công thức: MIC<sub>50</sub> = (A + B)/2

\*A = (50 x nồng độ mà sự phát triển nhỏ hơn 50%)/sự phát triển nhỏ hơn 50%.

\*B = (50 x nồng độ mà sự phát triển lớn hơn 50%)/sự phát triển lớn hơn 50%.

2.2.6 Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được tính toán và xử lý bằng phần mềm Excel. Phân tích ANOVA và so sánh trung bình bằng phần mềm Minitab 16.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hiệu suất ly trích cao chiết cỏ Mần Trầu

Hiệu suất ly trích cao chiết cỏ Mần Trầu được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Hiệu suất ly trích cỏ Mần Trầu

Các loại cao cỏ Mần Trầu ( <i>Eleusine indica</i> )	Khối lượng cao (gram)	Hiệu suất (%)
K70	1,41	0,28
S70	1,35	0,27
K96	2,68	0,54
S96	2,47	0,49

Ghi chú: Hiệu suất cao dựa trên khối lượng 500 gram mẫu ban đầu

Bảng 2 cho thấy hiệu suất ly trích cỏ Mần Trầu ở tất cả các nghiệm thức nhỏ hơn 1%. Kết quả hiệu suất ly trích cho thấy phương pháp sử dụng chiếu xạ siêu âm ở các nghiệm thức S70 và S96 đều thấp hơn phương pháp không sử dụng phương pháp chiếu xạ siêu âm. Nghiệm thức K96 mang lại khối lượng cao chiết tốt nhất với 2,68 gram sau khi được ly trích từ 500 gram khối lượng mẫu ban đầu.

**3.2 Định tính một số hợp chất tự nhiên**

Các nghiệm thức ở Bảng 3 đều cho thấy có sự hiện diện của các nhóm hợp chất tự nhiên như: alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, coumarin và quinone. Riêng chỉ có thử nghiệm phenol và tannin là không thấy sự hiện diện, có thể là do hàm lượng các hợp chất này trong cao chiết thấp hơn ngưỡng phát hiện của thử nghiệm này.

Nghiên cứu của Alaekwe *et al.* (2015) cũng sử dụng nguyên liệu là cỏ Mần Trầu ly trích bằng dung môi chloroform và tái chiết với dung môi methanol với phương pháp ngâm trong 24 giờ. Kết quả định tính dịch chiết chloroform cho thấy sự hiện diện alkaloid, flavonoid và các hợp chất có tính acid; trong khi đó kết quả định tính dịch chiết chloroform tái chiết với dung môi methanol lại cho

sự hiện diện của alkaloid, tannin, glycoside và các hợp chất có tính acid. Như vậy, phương pháp ly trích trong nghiên cứu này tạo ra nhiều hợp chất tự nhiên hơn so với những nghiên cứu khác.

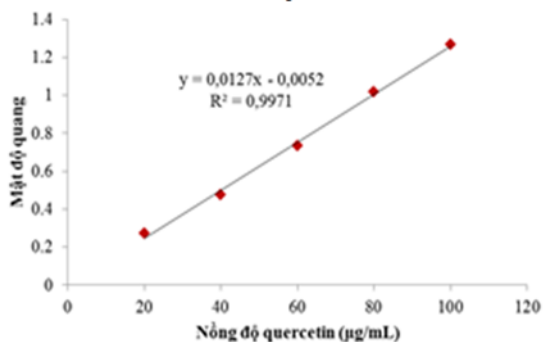
**Bảng 3: Kết quả định tính một số hợp chất tự nhiên trong cao chiết cỏ Mần Trầu**

Thử nghiệm	K70	S70	K96	S96
Alkaloid	+	+	+	+
Flavonoid	+	+	+	+
Saponin	+	+	+	+
Terpenoid	+	+	+	+
Coumarin	+	+	+	+
Quinone	+	+	+	+
Phenol và Tannin	-	-	-	-

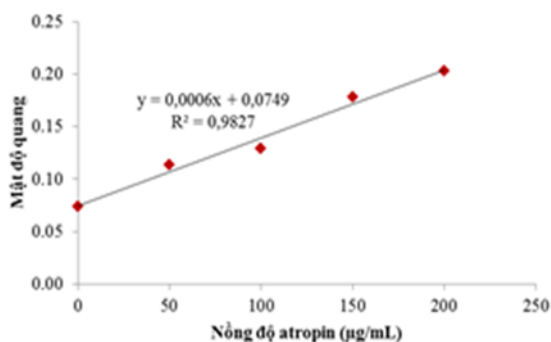
Ghi chú: + có sự hiện diện, - không có sự hiện diện

**3.3 Định lượng Flavonoid và Alkaloid tổng**

Dựa vào phương trình đường chuẩn của quercetin:  $y = 0,0127x - 0,0052$  (Hình 2) và phương trình đường chuẩn của atropine:  $y = 0,0006x + 0,0749$  (Hình 3) để tính ra hàm lượng flavonoid tổng và alkaloid tổng theo công thức:  $T = (c \cdot V) / m$



**Hình 2: Đồ thị đường chuẩn quercetin**



**Hình 3: Đồ thị đường chuẩn atropine**

Ghi chú: T là hàm lượng flavonoid hay alkaloid tổng (mg quercetin (QE)/g cao chiết hay mg atropine (AE)/g cao chiết), c là giá trị x từ đường chuẩn với quercetin hay atropine (µg/mL), V là thể tích dịch chiết (mL) và m là khối lượng cao chiết có trong V (g)

Flavonoid và alkaloid là hai trong những nhóm hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học và đặc biệt là kháng khuẩn (Moura *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Courts-Williamson, 2015). Do đó, định lượng flavonoid tổng và alkaloid tổng là hai chỉ tiêu quan trọng nhằm đánh giá khả năng kháng khuẩn từ cỏ Mần Trầu.

Kết quả hàm lượng flavonoid tổng và alkaloid tổng ở Bảng 4 cho thấy hàm lượng flavonoid tổng ở các mẫu chiết bằng dung môi ethanol 70% đều cao hơn mẫu chiết bằng ethanol 96% khoảng 10%. Đối với hàm lượng alkaloid tổng, các nghiệm thức sử dụng ethanol 70% để chiết thì có hàm lượng cao hơn gấp 2 lần nghiệm thức sử dụng ethanol 96%.

Với sự khác biệt ở độ tin cậy 95%, hàm lượng flavonoid và alkaloid giữa các mẫu có kết hợp phương pháp chiếu xạ siêu âm đều cao hơn so với các mẫu chỉ có ngâm với dung môi trong 24 giờ. Nghiệm thức S70 có hàm lượng flavonoid tổng và alkaloid tổng cao nhất, tương ứng 93,11 mg QE/g cao chiết và 128,5 mg AE/g cao chiết. Có thể thấy, nhờ vào sự kết hợp chiếu xạ siêu âm với khả năng tạo các bọt khí nhỏ giúp sự khuếch tán các nhóm chất từ nguyên liệu vào dung môi tốt hơn, giúp hỗ trợ khuếch tán các hợp chất tự nhiên khi ly trích từ thực vật (Suslick, 1985). Từ đó, hàm lượng các nhóm chất thực vật cũng được ly trích ra nhiều hơn mặc dù hiệu suất ly trích ở thí nghiệm đầu tiên là

dưới 1%, điều này dẫn tới khả năng cao chiết cỏ Mần Trầu có hoạt tính sinh học cao.

**Bảng 4: Hàm lượng flavonoid tổng và alkaloid tổng**

Cao chiết	Flavonoid tổng (mg QE/g cao chiết)	Alkaloid tổng (mg AE/g cao chiết)
K70	75,79 ± 1,6 <sup>bc</sup>	100,17 ± 5,0 <sup>b</sup>
S70	93,11 ± 3,1 <sup>a</sup>	128,50 ± 6,0 <sup>a</sup>
K96	68,55 ± 4,7 <sup>c</sup>	59,056 ± 2,5 <sup>d</sup>
S96	84,23 ± 4,0 <sup>ab</sup>	74,61 ± 6,3 <sup>c</sup>
CV (%)	12,51	30,78

Ghi chú: chữ cái khác nhau đi kèm các kết quả trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở độ tin cậy 95% qua kiểm định Tukey

**3.4 Khả năng kháng khuẩn với 2 dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli***

Khả năng kháng khuẩn ở nồng độ cao chiết 100 mg/mL

Sau 24 giờ, tất cả nghiệm thức cỏ Mần Trầu đều có khả năng kháng 2 dòng vi khuẩn *B. subtilis* và *E. coli*. Theo nghiên cứu Tiwari and Cummins (2011) cỏ Mần trầu có chứa các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học là những hợp chất thuộc nhóm flavonoid, tannin, saponin, alkaloid. Tất cả các hoạt chất thực vật này đều có khả năng kháng khuẩn. Như việc flavonoid liên kết với adhesin – yếu tố độc lực của vi khuẩn Gram âm và ức chế giải phóng acetylcholine – thành phần lớp phospholipid ở màng tế bào làm mất chức năng của chúng. Bên cạnh đó, alkaloid cũng có cơ chế xen vào vách tế bào làm phá vỡ cấu trúc thành tế bào.

**Bảng 5: Kết quả khả năng kháng *B. subtilis* và *E. coli* ở nồng độ 100 mg/mL của cao chiết cỏ Mần Trầu**

Nghiệm thức	ĐKVVK (mm)	
	<i>Bacillus subtilis</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
K70	8,20 ± 0,17 <sup>c</sup>	11,50 ± 1,50 <sup>ab</sup>
S70	9,27 ± 0,25 <sup>b</sup>	10,50 ± 0,50 <sup>b</sup>
K96	6,27 ± 0,25 <sup>d</sup>	9,67 ± 0,29 <sup>b</sup>
S96	5,27 ± 0,25 <sup>e</sup>	7,17 ± 0,76 <sup>c</sup>
Ampicillin (10 µg/mL)	11,33 ± 0,29 <sup>a</sup>	12,67 ± 0,29 <sup>a</sup>
DMSO 30%	0	0
CV (%)	27,77	19,83

Ghi chú: chữ cái khác nhau đi kèm các kết quả trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở độ tin cậy 95% qua kiểm định Tukey

Hiệu quả ức chế *E. coli* của cao chiết cỏ Mần Trầu tốt hơn so với *B. subtilis*. Các nghiệm thức có nồng độ dung môi 70% đều cho thấy khả năng kháng khuẩn tốt hơn so với dung môi có nồng độ 96%. Như vậy, ly trích dung môi bằng ethanol 70%

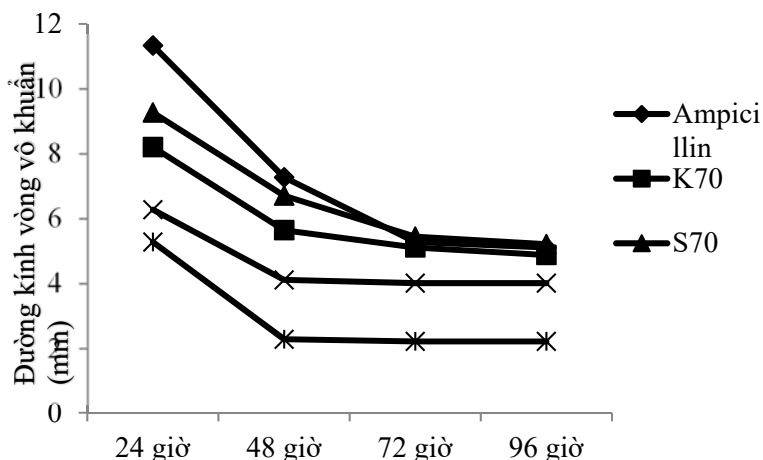
mang lại khả năng ức chế vi khuẩn tốt hơn gấp 1,5 lần so với dung môi ethanol 96%. Điều này là do mỗi loại dung môi khác nhau sẽ mang lại các hợp chất tự nhiên cũng khác nhau, từ đó khả năng kháng khuẩn cũng khác nhau (Okokon *et al.*, 2010; Morah *et al.*, 2015). Cùng với đó, các hợp chất tự nhiên khác nhau sẽ có sự tương tác với nhau khi ở trong cùng loại cao chiết, đó được gọi là sự tương tác cộng hợp (Tiwari *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2015), mang lại khả năng kháng khuẩn tốt hơn.

*Khả năng kháng khuẩn theo thời gian*

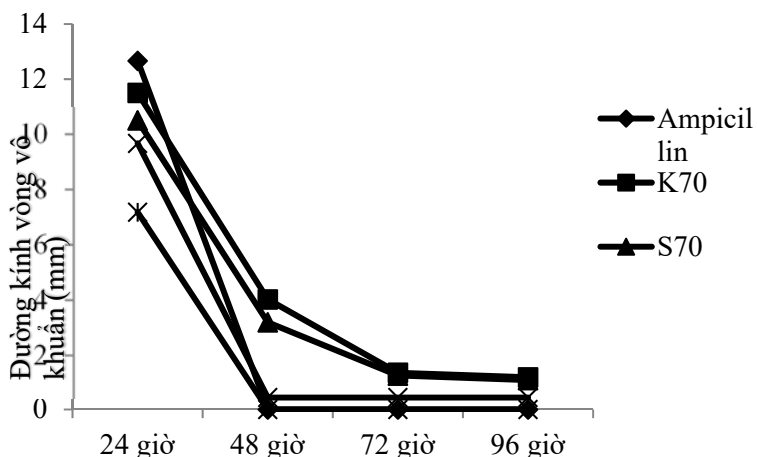
Khả năng kháng khuẩn theo thời gian của các loại cao chiết với 2 dòng vi khuẩn *B. subtilis* và *E. coli* được biểu diễn ở Hình 4 và Hình 5 đều giảm dần theo thời gian. Nguyên nhân là do khi vi khuẩn gặp điều kiện bất lợi như gặp chất ức chế hay diệt khuẩn trong môi trường sống của chúng, chúng sẽ phát triển rất khó khăn. Nhưng chúng vẫn có những cơ chế để thích nghi với môi trường sống bất lợi (Nguyễn Lâm Dũng, 2000). Trong đó, những hợp chất tự nhiên có những cách ức chế vi khuẩn khác nhau. Ví dụ, terpenoid gây phá vỡ màng tế bào, quinone liên kết các thành phần bề mặt màng ngoài, flavonoid ảnh hưởng hoạt động của các enzyme tạo thành peptidoglycan, alkaloid xen vào cấu trúc acid nucleic (Tiwari and Cummins, 2011) làm cho vi khuẩn liên tục bị ức chế, giúp khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết được tốt hơn.

Khả năng diệt khuẩn *B. subtilis* (Hình 4) là từ khoảng thời gian 72 giờ đến 96 giờ của các loại cao chiết cũng như đối chứng không còn nữa. Điều này là do vi khuẩn đã dần thích nghi với môi trường bằng cách tự biến đổi gene diễn ra tự phát bên trong hoặc nhận một gen kháng từ bên ngoài (Dzidic *et al.*, 2008). Hầu hết các chất kháng khuẩn đều khuếch tán vào bên trong tế bào vi khuẩn. Sự khuếch tán này phụ thuộc vào kích thước, tính ưa nước và kỵ nước của chất kháng khuẩn. Do đó, vi khuẩn cần tạo ra nhiều loại enzyme có thể làm bất hoạt chất kháng khuẩn, protein kênh bơm chất kháng khuẩn ra khỏi tế bào, methyl hóa các mục tiêu gắn kết với chất kháng khuẩn hoặc tạo màng sinh học (biofilm) hạn chế tiếp xúc với chất kháng khuẩn (Kumar *et al.*, 2011).

Đối với vi khuẩn *E. coli* (Hình 5) khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết theo thời gian cho thấy sự kém hiệu quả so với *B. subtilis*. Ở mốc thời gian 48 giờ, các loại cao chiết có xu hướng giảm hoạt tính kháng khuẩn đối với *E. coli* nhiều hơn so với *B. subtilis*. Trong khi đó, ở các mốc thời gian từ 72 giờ đến 96 giờ, khả năng kháng *B. subtilis* của các nghiệm thức S70 và K70 cao gấp 5 lần khả năng kháng *E. coli* với ĐKVVK chỉ khoảng 1 mm.



Hình 4: Biểu đồ hiệu quả kháng khuẩn của cao chiết cỏ Mần Trầu ở nồng độ 100 mg/mL đối với *Bacillus subtilis* theo thời gian



Hình 5: Biểu đồ hiệu quả kháng khuẩn của cao chiết cỏ Mần Trầu ở nồng độ 100 mg/mL đối với *Escherichia coli* theo thời gian

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết S70

Dựa vào kết quả các thí nghiệm trước, nghiệm thức S70 có khả năng kháng khuẩn tốt đối với 2 dòng vi khuẩn trên, cho nên được chọn để xác định giá trị MIC và MBC của cao chiết cỏ Mần Trầu. Nồng độ cao chiết càng giảm thì sự phát triển của vi khuẩn càng tăng và có sự khác nhau giữa vi khuẩn *B. subtilis* và *E. coli*. Từ đó, theo phương pháp của Ruangpan (2004), nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của nghiệm thức cao S70 được trình bày ở Bảng 6.

Như vậy, giá trị MIC và MBC của cao chiết S70 đối với vi khuẩn *B. subtilis* tương ứng là 50 mg/mL và 75 mg/mL; đối với vi khuẩn *E. coli* tương ứng là 12,5 mg/mL và 25 mg/mL. Bảng 6 cho thấy MIC<sub>50</sub> của cao chiết S70 đối với 2 dòng vi

khuẩn *B. subtilis* và *E. coli* lần lượt là 9,83 mg/mL và 4,1 mg/mL.

Bảng 6: Kết quả MIC và MBC của cao chiết S70

Nồng độ nghiệm thức S70 (mg/mL)	Sự phát triển của vi khuẩn (%)	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ampicillin 10 µg/mL	0	0
75	0 (MBC)	0
50	2,05 (MIC)	0
25	22,01	0 (MBC)
12,5	42,94	4,23 (MIC)
6,25	61,21	47,55
3,125	91,90	96,44
DMSO 30%	100	100

Cùng một nghiệm thức cao S70 mà hoạt tính kháng khuẩn của nó lại rất khác nhau giữa 2 dòng vi khuẩn *B. subtilis* và *E. coli*. Nguyên nhân chính là do cấu trúc không tương đồng của lớp thành tế

bào 2 dòng vi khuẩn này. Thành tế bào của *B. subtilis* (Gram dương) là lớp peptidoglycan dày khác so với *E. coli* (Gram âm) là lớp mỏng peptidoglycan và lớp lipopolysaccharide bao bọc bên ngoài tạo nên khoảng không gian gọi là khoảng gian bào (Silhavy *et al.*, 2010). Vi khuẩn Gram âm dễ nhạy cảm với chất kháng khuẩn hơn vi khuẩn Gram dương vì các chất kháng khuẩn có tính kỵ nước khuếch tán qua lớp màng ngoài của vi khuẩn Gram âm và được giữ trong khoảng gian bào. Khi đó, chất kháng khuẩn dễ tác động vào tế bào vi khuẩn (Braun, 2002). Như vậy, nồng độ ức chế tối thiểu của S70 đối với *E. coli* thấp hơn so với *B. subtilis*.

#### 4 KẾT LUẬN

Hiệu suất ly trích cỏ Mần Trầu ở tất cả nghiệm thức đều thấp, nhưng vẫn mang lại hàm lượng flavonoid tổng, alkaloid tổng và khả năng kháng khuẩn tốt. Đặc biệt, ở phương pháp ly trích cỏ Mần Trầu sử dụng dung môi ethanol khi có kết hợp chiếu xạ siêu âm có hàm lượng flavonoid tổng, alkaloid tổng cao hơn phương pháp truyền thống. Khả năng kháng khuẩn của tất cả nghiệm thức đối với vi khuẩn *Escherichia coli* hiệu quả hơn so với *Bacillus subtilis*. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với 2 dòng vi khuẩn trên tương ứng là 12,5 mg/mL và 50 mg/mL.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alaekwe I.O, Ajiwe V.I.E, Ajiwe A.C, Aningo G.N, 2015. Phytochemical and Anti – Microbial Screening of the Aerial Parts of *Eleusine indica*. International Journal of Pure & Applied Bioscience, 3(1): 257-264.

Banglacod, Vilma L. Vallejo, Melba Patacsil, 2012. Phytochemical screening and Antibacterial activity of selected medicinal plants of Bayabas, Sablan, Benguet Province, Cordillera Administrative Region, Luzon, Philippines. Indian Journal of Traditional Knowledge, 11: 580-585.

Boa, A. N, 2005. The bacterial cell wall. Microbiology. pp 2-21.

Braun, V, 2002. Active transport of antibiotic across the outer membrane of gram-negative bacteria and its implications in the development of new antibiotics. Membranphysiolgy. (3):345-423.

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2011. Vi sinh vật học đại cương. Trang 24-35. Nxb Đại học Cần Thơ.

Chang C, Yang M., Wen H. and Chem J, 2002. Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(7): 178-182.

Chopra R.N, Nayar S.L, Chopra IC, 1986. Glossary of Indian Medicinal Plants. (Including the

Supplement). Council Scientific Industrial Research. New Delhi. 330 pp.

Courts F. L, and Williamsom G, 2015. The Occurrence, Fate and Biological of C-glycosyl Flavonoids in the Human diet. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55(10):1352-1367.

Đỗ Tất Lợi, 2003. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, 544 trang.

Dzidic S., Suskovic J, and Kos B, 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. Food Technol. Biotachnol. 46(1):11-21.

Hari R and Savithamma N, 2013. Phytochemical screening of underutilized species of Poaceae. *An Int J*, 1(10): 947-51.

Kumar, S., Narwal, S., Kumar, S., and Prakash, O., 2011.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. Pharmacognosy Review, 5(9): 19-29.

Morah F. N. I, and M.E. Otuk, 2015. Antimicrobial and Anthelmintic Activity of *Eleusine indica*. Acta Scientiae et Intellectus, 1: 28-32.

Nguyễn Lâm Dũng, 2000. Giáo trình Vi sinh vật học. Trang 453-564. Nxb Giáo dục.

Nguyen Van Dan and Doan Thi Nhu, 1989. Medical plants in Vietnam. World Health Organization, Manila and Institute of Materia Media. Hanoi.

Okokon J. E., Odomana, C. S., Imabong, E., Obot, J. and Udobang, J. A, 2010. Antiplasmodial and antidiabetic effect of *Eleusine indica*. International Journal of Drug Development and Research. 10(3): 493-500.

Pandey A, and Agnihotri, V, 2015. Antimicrobials from medicinal plants: Research initiatives, challenges, and the future prospects. Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications. 123-140.

Phạm Hoàng Hộ, 1999. Cây cỏ Việt Nam, quyển III. Nxb Trẻ. 1027 trang.

Ruangpan L, 2004. Minimal inhibitory concentration (MIC) test and determination of antimicrobial resistance bacteria. 31-35.

Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, and Verdianrizi M, 2008. Strectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Thai J. Pham. Sci. 32:17-20.

Silhavy T. J., Kahne D. and Walker S, 2010. The bacterial cell envelop. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2: 44.

Sofowora A, 1993. Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. Spectrum Books Limited Ibadan & Nigeria, 191-289.

Suslick K. S and Hammerton D. A, 1985. Determination of local temperatures caused by acoustic cavitation. IEEE Ultrasonics Symp. Proc., 4, 1116.

Tiwari U, and Cummins E, 2013. Fruit and vegetables. *In*: Handbook of plant food phytochemicals: Sources, stability and extraction. John Wiley & Sons. pp.105-137.