

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT METHANOL LÁ MƠ XANH (*PAEDERIA CONSIMILIS*)

Hồ Ngọc Trinh*, Nguyễn Thị Thùy Dương, Trần Thị Như Ý,
Huỳnh Tuấn Kiệt, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Đức Độ.
Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Liên hệ email: ngoctrinh419@gmail.com

TÓM TẮT

Cao chiết lá Mơ xanh khi ly trích bằng dung môi methanol thu được nhiều hợp chất thực vật như polyphenol, saponin, steroid, flavonoid. Hàm lượng saponin có trong cao chiết đạt $29,7 \pm 2,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. Cao chiết có khả năng khử gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} là 178,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và cho kết quả khử sắt với giá trị IC_{50} là $42,1 \pm 1,6$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, thấp hơn so với vitamin C (1,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cao chiết có thể ức chế hoạt động của các vi sinh vật, ở nồng độ 100 mg/mL đối với vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. và *Erwinia* sp. đường kính vòng ức chế dao động từ 2,7 mm đến 7,3 mm. Đối với *Saccharomyces* sp. và *Candida* sp. đường kính vòng ức chế dao động từ 2,2 mm đến 3,2 mm thấp hơn so với loại kháng sinh được sử dụng là nystatin 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ với giá trị đường kính vòng ức chế là 7,7 mm. Các loại nấm như *Rhizoctonia* sp., *Neoscytalidium* sp., *Fusarium* sp., thì giá trị bán kính vòng ức chế là 1,8 đến 7,5 mm.

Từ khóa: Cao chiết, nấm, *Paederia consimilis*, saponin, vi khuẩn.

Nhận bài: 31/08/2018 Hoàn thành phản biện: 28/10/2018

Chấp nhận bài: 30/10/2018

1. MỞ ĐẦU

Paederia cosimilis tên Việt Nam là Mơ xanh hay còn gọi Thúi địt, dây leo quấn, không lông, lá có phiến thon hẹp, gân phụ 4 - 6 cặp, lá bẹ nhọn, cuống dài 4 - 6 mm. Chùm tụ tán dài 12 cm, hoa không cọng, tím, đài trong, trắng, tiểu nhụy không thò. Quả nhân cứng, hơi dẹp, dày 6 mm, vàng láng, nhân 2, dẹp (Phạm Hoàng Hộ, 1999) thuộc họ Cà phê Rubiaceae, loài thân thảo, có nhiều loài mọc hoang, được trồng làm gia vị và thuốc tại nhiều nơi ở Việt Nam, Ấn Độ, Đông Nam Á. Cây nhỏ, khi va chạm có mùi rất hôi, nhánh yếu. Lá mọc đối, ít khi mọc vòng. Chi *Paederia* được xem như là một loại thuốc lợi tiểu, điều trị thấp khớp, rối loạn đường ruột, viêm khớp, táo bón, tiểu đường, ho, đau bụng, tiêu chảy, kiết lỵ, thương hàn, viêm phổi, đau răng... Lá Mơ leo [*Paederia scandens* (Lour.) Merr.] có vị ngọt, hơi đắng, tính bình và có thể dùng làm rau nên từ xưa y học dân tộc đã sử dụng lá Mơ leo để điều trị nhiều bệnh thường gặp như ho, giảm đau, giải độc, các chứng co thắt túi mật, dạ dày và ruột. Lá Mơ xanh còn được sử dụng để trị viêm gan, vàng da, phong thấp... (Đỗ Tất Lợi, 2004). Các nghiên cứu cho thấy *Paederia foetida* L. chứa paederolone, paederone, β -sitosterol, paederoside, asperuloside. Lá của cây có nhiều chất caroten, vitamin C, và alkaloid (Soni và cs, 2013). Ở Việt Nam, Mơ xanh mọc dại ở nhiều nơi, chúng được xem như là một loại rau, thuốc dân gian. Nhận thấy được những công dụng hữu ích nên lá Mơ xanh được nghiên cứu nhằm mục đích tạo ra những loại dược liệu có thể thay thế cho kháng sinh trong tương lai, vì thế đã thu hút được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất

2.1.1 Vật liệu

Lá Mơ xanh (*Paederia consimilis*) được hái tại Quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ, được tiến hành thu vào buổi sáng và chọn những lá tươi, không bị sâu bệnh. Sau đó, được đem về phòng thí nghiệm rửa sạch đến khi ráo nước.

Cao chiết methanol lá Mơ xanh.

Các loài vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Erwinia* sp. và nấm *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Rhizoctonia* sp., *Neoscytalidium* sp., *Fusarium* sp..

2.1.2. Hóa chất

Các hóa chất cần thiết gồm có trypticase peptone (Trung Quốc), yeast extract (Ấn Độ), sodium chloride (Việt Nam), $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (Trung Quốc), dextrose (Trung Quốc), agar (Việt Nam), DMSO (Pháp), methanol (Việt Nam), NaOH (Trung Quốc). Các loại kháng sinh sử dụng như ampicillin, nystatin.

Môi trường nuôi vi khuẩn Luria Bertani (LB), môi trường nuôi cấy nấm Potato Dextrose Agar (PDA).

2.2. Sơ lược về việc tạo cao chiết lá Mơ xanh trong dung môi methanol

Lá Mơ xanh được nghiền nhỏ với dung môi methanol 96% bằng máy xay rồi cho hỗn hợp vào becker. Nghiệm thức sử dụng sóng siêu âm, được cho vào máy tạo sóng siêu âm ở 120 W trong 60 phút, hỗn hợp được đem cô quay và tạo cao, sau đó trữ ở nhiệt độ -4°C .

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Khảo sát thành phần hợp chất thực vật có trong cao chiết lá Mơ xanh.

Thành phần các hợp chất thực vật (HCTV) có trong cao chiết được xác định bằng cách, hòa tan cao chiết trong dung môi methanol tại nồng độ $100 \mu\text{g/mL}$, đo giá trị hấp thụ của máy đo quang phổ U 1500 Hitachi. Chi tiết về bước sóng và tài liệu tham khảo được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Phân tích các HCTV có trong cao chiết methanol lá Mơ xanh.

Hợp chất	Bước sóng (nm)	Nguồn tham khảo
Steroid	190 - 220	Scott, 1964
Triterpenoid	200 - 260	Chengyuan Liang và cs., 2014
Quinone	240 - 290	Scott, 1964
Polyphenol	250 - 260	Scott, 1964
Tannin	244 - 277	Roggia và cs., 2016
Flavonoid	270 - 330	Scott, 1964
Carotenoid	400 - 500	Scott, 1964
Saponin	535 - 550	Hiai và cs., 1976 và Eva Madland, 2013
Alkaloid	500 - 600	Scott, 1964

2.3.2. Khảo sát hàm lượng saponin có trong cao chiết

Khảo sát hàm lượng saponin dựa trên phương pháp nghiên cứu của Hiai và cs. (1976) xác định độ màu cho saponin ở bước sóng 550 nm. Đặc biệt là saponin triterpenoid là một phương pháp đơn giản, nhanh chóng và chính xác đã được sử dụng rộng rãi để đánh giá hợp chất saponin. Phương pháp này áp dụng vanillin và acid sulfuric làm thuốc thử cho việc tạo

màu dưới điều kiện 70°C. Vanillin dễ tạo ra màu tím đậm khi bị oxy hóa bởi axit perchloric. Sau khi hỗn hợp thuốc thử phản ứng với saponin, một sắc tố màu nâu đỏ xuất hiện và hấp thụ tia cực tím cực đại ở 550 nm. Cao chiết được sử dụng ở nồng độ 1,0 mg/mL.

2.3.3. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp khử gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết lá Mơ xanh (*Paederia consimilis*) được thực hiện theo phương pháp DPPH. Dây nồng độ của cao chiết (10, 20, 40, 60, 80 và 100 µg/mL) và dây nồng độ chất đối chứng là vitamin C (10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL) được xây dựng bằng cách hòa tan cao chiết hoặc vitamin C vào dung môi methanol. Tại mỗi nồng độ, 1 mL dung dịch được sử dụng để phản ứng với 2 mL DPPH 0,1mM (mỗi dây nồng độ lặp lại 3 lần). Hỗn hợp phản ứng được ủ 30 phút trong tối, sau đó được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. Khả năng kháng oxy hóa được tính dựa vào giá trị IC₅₀ của mỗi loại cao chiết. (Blois, M. S.,1958).

Công thức tính phần trăm ức chế:

$$\text{Phần trăm ức chế} = [(A_0 - A_1)/A_0].100\%$$

Trong đó: A₀ là giá trị quang mẫu không có tác nhân phản ứng và A₁ là giá trị quang của mẫu (hoặc vitamin C) ghi nhận.

2.3.4. Khảo sát năng lực khử sắt

Thí nghiệm được thực hiện dựa trên phương pháp của Vijayalakshmi và Ruckmani (2016) có hiệu chỉnh.

Lần lượt cho vào ống nghiệm 500 µL đệm phosphate 0,2 M, 500 µL K₃(FeCN)₆ 1%, 200 µL mẫu cao chiết vào ống nghiệm, ủ ở 50°C trong 20 phút. Sau khi ủ, thêm 500 µL CCl₃COOH 10%, lắc đều. Sử dụng 1,25 mL dung dịch trên tiếp tục thêm 1,25 mL nước khử ion và 250 µL FeCl₃ 0,1%, lắc đều để dung dịch phản ứng. Xác định độ hấp thụ ở bước sóng 700 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xác định giá trị phần trăm khử sắt của mẫu hoặc vitamin C dựa trên công thức:

$$\text{Phần trăm ức chế} = [(A - A_0)/A_0].100$$

Trong đó: A là giá trị OD đo từ mẫu

A₀ là giá trị OD đo từ mẫu trắng

2.3.5. Chuẩn bị đĩa thạch nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn là môi trường LB có bổ sung agar (Miller, 1972), và môi trường PDA để nuôi cấy các chủng nấm. Sau khi môi trường được đem đi khử trùng, đĩa thạch được tạo và cấy trải các chủng vi sinh vật đã được phân lập từ phòng thí nghiệm. Đĩa thạch được đục lỗ tạo giếng để chuẩn bị bổ sung các nghiệm thức cao. Thao tác được thực hiện trong tủ cấy.

2.3.6. Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Bổ sung các dung dịch nghiệm thức cao (20 µL) vào các giếng trong đĩa thạch theo thứ tự là đối chứng âm DMSO 100%, các mẫu cao chiết và cuối cùng là đối chứng dương là ampicillin (500 µg/mL). Kết quả được thu nhận ít nhất sau 24 giờ nuôi ủ tại 37 °C thông qua đo đường kính vòng ức chế. Tất cả các thí nghiệm trên đều được lặp lại 3 lần ngẫu nhiên.

2.3.7. Khảo sát khả năng ức chế các loại nấm men

Hút 50 μ L huyền phù nấm trái đều trên môi trường nuôi cấy, để ráo khoảng 10 phút. Tạo các giếng với đường kính 6 mm sao cho mỗi giếng cách đều nhau. Bổ sung 20 μ L các dung dịch nghiệm thức vào các giếng theo thứ tự là đối chứng âm DMSO 100%, các mẫu cao chiết và cuối cùng là đối chứng dương nystatin 0,3 mg/mL. Đem ủ trong 24 giờ ở 37°C. Kết quả thu nhận được thông qua đo đường kính vòng ức chế vì đây là nấm có cấu tạo đơn bào nên thu nhận kết quả giống như vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ngẫu nhiên.

2.3.8 Khảo sát khả năng ức chế các chủng nấm sợi

Thí nghiệm được mô tả theo Khan và Nasreen (2010) có hiệu chỉnh: Tạo một khoanh khuẩn ty nấm có đường kính 6 mm đặt vào trung tâm đĩa môi trường PDA. Tạo 6 giếng trên đĩa sao cho các giếng cách đều nhau cách khuẩn ty nấm là 2,5 cm. Bơm 20 μ L lần lượt đối chứng âm, các nghiệm thức cao chiết, đối chứng dương vào các giếng, để yên 15 phút, sau đó đem ủ 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết quả thu nhận được thông qua việc đo bán kính vòng ức chế từ vị trí khuẩn ty nấm đến miệng giếng. Thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần ngẫu nhiên.

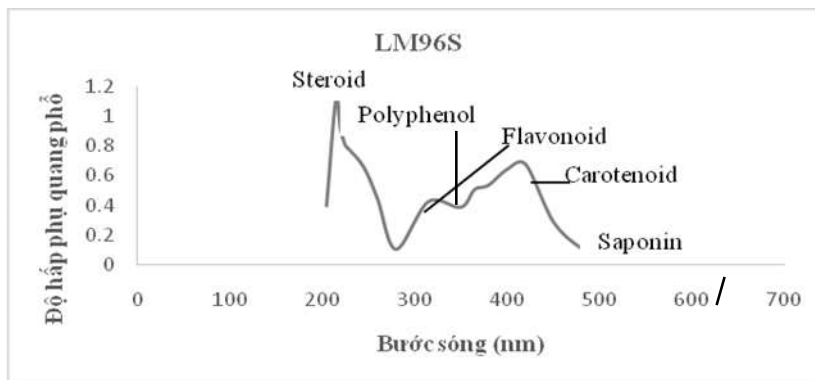
2.4. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phân tích thống kê bằng chương trình Minitab 16, phân tích ANOVA và các giá trị trung bình được so sánh bằng kiểm định Tukey.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định tính các hợp chất thực vật có trong cao chiết bằng phương pháp quang phổ UV – Vis.

Dựa vào phân tích biểu đồ và số liệu kết quả đo độ hấp thụ quang phổ của cao chiết (Hình 1) cho thấy ở những bước sóng nhất định đều có sự hiện diện của các hợp chất thực vật tương ứng, chỉ số hấp thụ quang phổ > 0. Điều đó chứng tỏ các nhóm hợp chất phenolic, terpenoid, alkaloid và saponin đều tồn tại trong cao chiết methanol lá Mơ xanh. Tương tự nghiên cứu Chanda (2014) trên loài *Paederia foetida* được ly trích phương pháp Soxhlet với dung môi là methanol, cho kết quả định tính có mặt các hợp chất: alkaloid, glycoside, steroid, triterpenoid. Điều này cho thấy kết quả định tính trên cao chiết lá Mơ xanh là hợp lí.

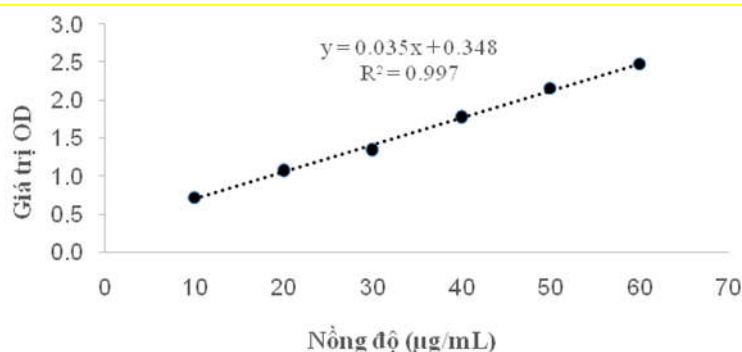


Hình 1. Kết quả định tính các hợp chất có trong cao chiết methanol lá Mơ xanh.

So sánh với trà đen *Camellia sinensis*, thử nghiệm định tính cho thấy sự có mặt của phenol và tannin, flavonoid, quinone, coumarin, alkaloid, terpenoid, saponin, steroid (Geoffrey

và cs., 2014; Latteef, 2012) thì cao chiết lá Mơ xanh cũng cho kết quả tương tự. Tuy chưa xác định hàm lượng các chất, nhưng qua kết quả định tính, nhận thấy cao chiết lá Mơ xanh rất có tiềm năng nghiên cứu vì chứa hầu hết các hợp chất thực vật thứ cấp quan trọng.

3.2. Kết quả xác định hàm lượng saponin trong cao chiết

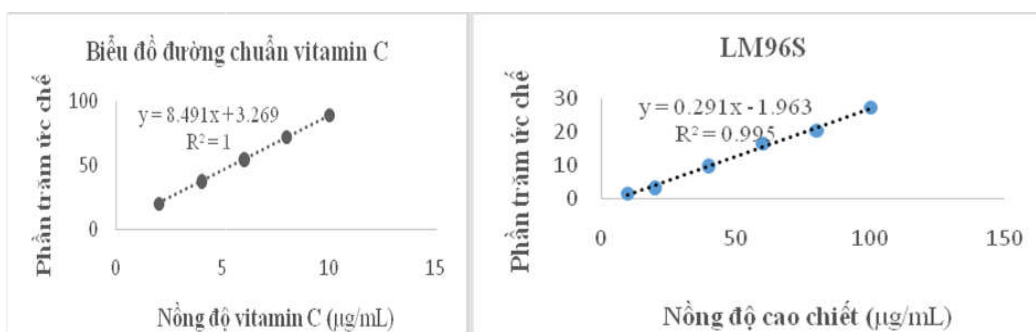


Hình 2. Biểu đồ đường chuẩn Ginsenoside (Rb1, Rg1, Rg3).

Để khảo sát hàm lượng saponin trong cao chiết, đường chuẩn ginsenoside được sử dụng để xác định hàm lượng saponin, trong đó Rb1, Rg1 và Rg3 trong nhân sâm được sử dụng làm chất chuẩn. Từ kết quả định lượng, so sánh với đường chuẩn cho thấy hàm lượng saponin trong cao chiết methanol lá Mơ xanh là khoảng 29,7 mg/g chiết xuất tương đương khoảng 2,9%. Theo James Matthew Searels và cs (2013) khi nghiên cứu trên nhân sâm của Mỹ *Panax quinquefolius*, trên cả lá và rễ cho thấy hàm lượng saponin trong lá cao hơn so với ở rễ và hàm lượng này thay đổi phụ thuộc vào độ tuổi của cây. Khi thực hiện xác định hàm lượng saponin trong cây Bướm bạc thuộc họ Cà phê (Mpofu SJ và cs., 2014) chứng minh được rằng khi sử dụng hai loại dung môi là nước và methanol để ly trích thì dung môi methanol cho hàm lượng saponin cao hơn (0,71%) so với khi sử dụng nước (0,21%). Từ đó cho thấy dung môi methanol là dung môi thích hợp để ly trích các hợp chất thực vật.

3.3. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH

Khả năng kháng oxy hóa là khả năng của một hợp chất trong việc chống lại các gốc tự do để từ đó ngăn ngừa hiệu ứng độc hại đến tế bào. Các hợp chất polyphenol có khả năng



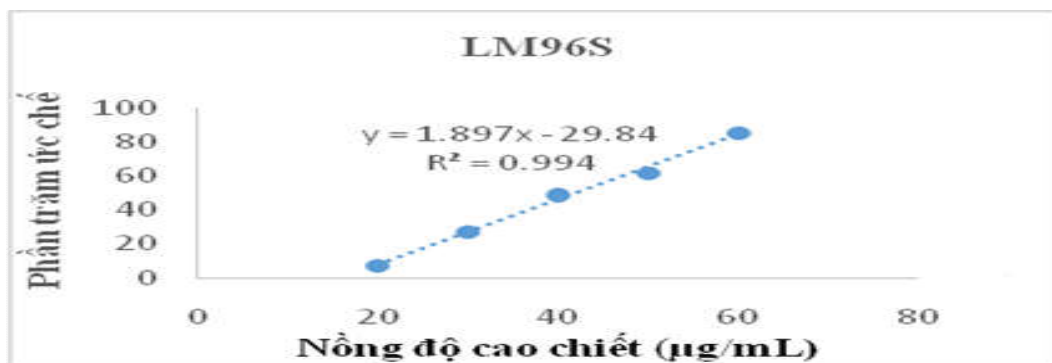
khử gốc tự do bằng cách nhường nguyên tử hydro (Riaz và cs., 2012).

Hình 3. Biểu đồ thể hiện phần trăm ức chế DPPH của vitamin C và nghiệm thức cao chiết lá Mơ xanh.

Để so sánh khả năng kháng oxy hóa của cao chiết, giá trị IC_{50} được dùng để đánh giá khả năng ức chế mạnh hoặc yếu của mẫu khảo sát. IC_{50} được định nghĩa là nồng độ của mẫu

mà tại đó nó có thể ức chế 50% gốc tự do hoặc tế bào hoặc enzyme và mẫu có hoạt tính càng cao thì giá trị IC_{50} càng thấp. Từ biểu đồ đường chuẩn cho thấy giá trị IC_{50} của vitamin C khoảng 5,5 $\mu\text{g/mL}$, trong khi đó, cao chiết methanol lá Mơ xanh cho giá trị IC_{50} là 178,2 $\mu\text{g/mL}$ cao hơn của vitamin C rất nhiều lần. Một số nghiên cứu kháng oxy hóa bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH của một số tác giả như: nghiên cứu trên loài *Paederia foetida* hoang dại của Sahoo và Bhatnagar (2015), cho giá trị IC_{50} bằng 121,21 $\mu\text{g/mL}$ thấp hơn IC_{50} cao chiết lá Mơ xanh hay so với chiết xuất methanol từ lá trà ô long ($IC_{50} = 0,279 \text{ mg/mL}$), cao chiết lá Mơ xanh vẫn thể hiện khả năng khử gốc tự do cao hơn ($IC_{50} = 0,1782 \text{ mg/mL}$). Nói cách khác, cao chiết methanol lá Mơ xanh vẫn có khả năng khử gốc tự do DPPH. Điều này là phù hợp với kết quả định tính, có sự tồn tại của các nhóm hợp chất hóa học thực vật nên có khả năng khử gốc tự do DPPH.

3.4. Khả năng kháng oxy hóa bằng khả năng khử sắt

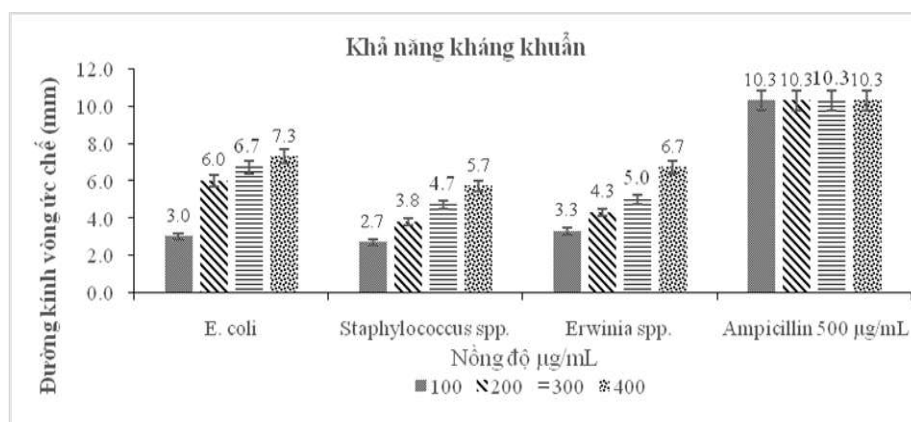


Hình 4. Biểu đồ thể hiện phần trăm khử sắt của vitamin C và nghiệm thức cao chiết lá Mơ xanh.

Thử nghiệm năng lực khử thường được sử dụng để đánh giá khả năng nhường electron của các chất kháng oxy hóa tự nhiên (Yildirim và cs., 2000; Dorman và cs., 2003). Nhiều báo cáo đã tiết lộ rằng có một sự tương quan trực tiếp giữa các hoạt động chống oxy hóa và năng lực khử của các chất chiết xuất thực vật (Duh, 1998; Duh và cs., 1999; Yildirim và cs., 2001). Từ kết quả khảo sát cho thấy, cao chiết methanol lá Mơ xanh được chiết xuất bằng phương pháp có xử lý sóng siêu âm cho kết quả khử sắt với giá trị IC_{50} là 41,2 $\mu\text{g/mL}$. Tuy nhiên, khả năng khử sắt của cao chiết methanol vẫn thấp hơn so với đối chứng là vitamin C (1,7 $\mu\text{g/mL}$). Điều này có thể giải thích là do vitamin C là một đơn chất có khả năng chống oxy hóa được tổng hợp theo quy mô công nghiệp nên hoạt tính rất cao, còn đối với cao chiết là nhóm các hợp chất hóa học thực vật chưa trải qua tinh sạch nên ngoài các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa thì còn tồn tại những tạp chất có thể làm giảm đi hoạt tính này. Nguyên nhân có thể do khi dịch chiết được xử lý sóng siêu âm, hàm lượng cũng như các loại hợp chất thực vật được ly trích nhiều hơn, trong đó có các hợp chất có khả năng chống oxy hóa (Cocito và cs., 1995; Masuzawa và cs., 2000; Vilku và cs., 2008; Bhat và cs., 2011).

3.5. Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn của cao chiết

Sau 24 giờ khảo sát, nghiệm thức cao chiết methanol lá Mơ xanh cho thấy được hiệu quả kháng các chủng vi khuẩn và khi nồng độ cao chiết tăng lên thì khả năng kháng vi khuẩn cũng tăng. (Hình 5)



Hình 5. Biểu đồ thể hiện khả năng kháng các chủng vi khuẩn ở nồng độ 100, 200, 300, và 400 mg/mL.

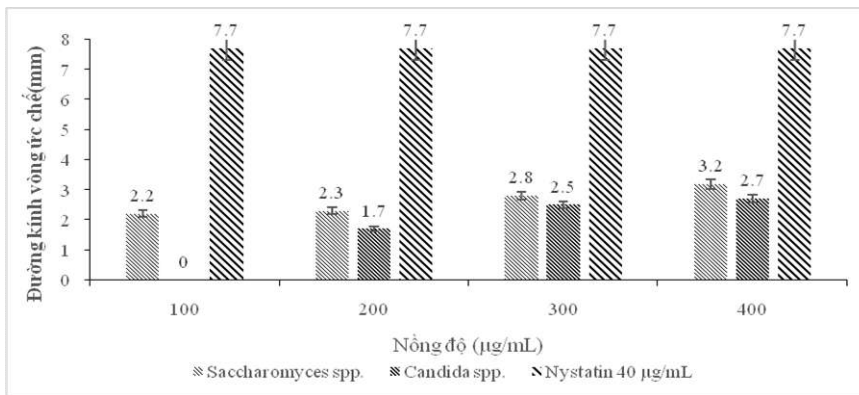
Theo nghiên cứu của Upadhyaya (2013), lá Mơ xanh có chứa các hợp chất thực vật (phytochemical) có hoạt tính sinh học là những hợp chất thuộc nhóm flavonoid, phenol, terpenoid, saponin, alkaloid và cardiac glycoside đều có khả năng kháng khuẩn. Ví dụ, flavonoid liên kết với adhesin – yếu tố độc lực của vi khuẩn Gram âm và ức chế giải phóng acetylcholine – thành phần lớp phospholipid, làm mất chức năng của chúng. Bên cạnh đó, alkaloid xen vào vách tế bào làm phá vỡ cấu trúc và làm bất hoạt các enzyme liên quan quá trình tổng hợp peptidoglycan của vi khuẩn, đặc biệt là enzyme transpeptidase. (Soni và cs., 2013). Đối với vi khuẩn *Staphylococcus sp.*, sau 24 giờ khảo sát, tất cả các nghiệm thức đều có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Staphylococcus sp.*. Tuy nhiên giá trị đường kính vòng ức chế thấp hơn so với *E. coli* và *Erwinia sp.* sự khác nhau này có được là do *Staphylococcus sp.* thuộc vi khuẩn Gram dương, có lớp peptidoglycan khá dày, dày hơn vi khuẩn Gram âm như *E. coli* (Carter, 2005). Ngoài ra, khả năng hoạt động của *Staphylococcus sp.* có liên quan đến sự hình thành màng sinh học (biofilm) (Hall-Stoodley và cs., 2004; Masadeh, 2013). Trong quá trình nhiễm bệnh, *Staphylococcus sp.* thường gắn với vật chủ hoặc bề mặt tế bào (mô), và dần dần tạo thành cấu trúc màng sinh học (Costerton và cs., 1999). Sau khi hình thành màng sinh học, sự đề kháng của vi khuẩn đối với các chất diệt khuẩn hay kháng sinh có thể tăng lên rất nhiều lần. Vì thế ở nồng độ 100 mg/mL hiệu quả kháng khuẩn của 4 nghiệm thức cao chiết biểu hiện chưa cao. Trong khi đó, ampicilline là một kháng sinh diệt khuẩn bằng cách ức chế bước đầu trong quá trình tổng hợp peptidoglycan của vi khuẩn. Nó ức chế enzyme enolpyruvyl transferase, dẫn đến làm giảm sự tạo thành acid uridin diphosphat – N – acetylmuramic trong giai đoạn đầu của quá trình tổng hợp sinh peptidoglycan, dẫn đến sự phân li và chết của tế bào vi khuẩn (Kahan và cs., 1974).

3.6. Khảo sát khả năng kháng nấm men *Saccharomyces sp.* và *Candida sp.*

Sau 24 giờ khảo sát, các nghiệm thức cao chiết đều có thể hiện hiệu quả kháng nấm, tại các nồng độ 200, 300, 400 mg/mL, hiệu quả kháng của cao chiết đối với các loại nấm men dao động từ $1,7 \pm 0,3$ đến $3,2 \pm 0,8$ mm, thấp hơn và khác biệt, có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với kháng sinh nystatin 40 µg/mL, có giá trị đường kính vòng ức chế là $7,7 \pm 0,6$ mm.

Ở nồng độ 100 mg/mL cao chiết có khả năng kháng ức chế *Saccharomyces sp.*, còn đối với *Candida sp.* thì đường kính vòng ức chế bằng 0. Hiệu quả ức chế tăng dần và cao nhất là ở nồng độ 400 mg/mL, đối với *Saccharomyces sp.* thì đường kính vòng ức chế là 3,2

$\pm 0,8$ mm còn với *Candida* sp. thì đường kính vòng ức chế là $2,7 \pm 0,3$ mm. Dựa theo kết quả định tính thì cao chiết có chứa các hợp chất như flavonoid, alkaloid, terpenoid với hàm lượng khác nhau. Theo nghiên cứu cho thấy flavonoid phức hợp phá vỡ cấu trúc thành tế bào, alkaloid hoạt động phá vỡ thành tế bào (Tiwari và cs., 2011); terpenoid liên quan đến sự phá vỡ cấu trúc màng, ức chế ATPase trong ty thể và tiêu diệt ty thể nấm (Lagrouh và cs., 2017). Từ đó, các hợp chất thực vật tấn công ức chế nấm hiệu quả theo nhiều cách khác nhau. Ngoài ra, một trong các yếu tố tạo nên hiệu quả một chất kháng là lượng tác động phải đủ lớn (Dzidic và cs., 2008). Vì thế khi nồng độ tăng cao trên mức 100 mg/mL thì hiệu quả ức chế *Candida* sp. mới được thể hiện. Bên cạnh đó, cao chiết là tổ hợp của nhiều chất có vai trò cộng gộp trong hoạt tính kháng vi sinh và mức độ tiếp xúc của *Saccharomyces* sp. trong tự nhiên với các hợp chất này là rất thấp, vì vậy khả năng đề kháng cao chiết với nấm men cũng thấp hơn so với kháng sinh. (Croteau và cs., 2000; Khan & Nasreen, 2010).



Hình 6. Biểu đồ thể hiện khả năng kháng các loại nấm men ở nồng độ 100, 200, 300, và 400 mg/mL.

Ở thí nghiệm của Hela và cs. (2012) về hoạt động kháng nấm của cao chiết methanol lá *Peaderia foetida*. Theo đó, bột lá *P. foetida* Linn. được ngâm 7 ngày trong dung môi methanol 70% sau đó để bay hơi tự nhiên và tiến hành thí nghiệm với nồng độ 300 µg/mL. Kết quả cao chiết không có hoạt tính kháng cả nấm *Candida albicans* và *Aspergillus niger*. Trong khi đó, ở thí nghiệm này, đều thể hiện hoạt tính kháng đối với nấm *Candida* sp. với giá trị đường kính vòng ức chế từ 1,7 mm đến 3,2 mm. Sự khác biệt này có thể được giải thích dựa vào sự khác nhau về phương pháp ly trích, nồng độ cao chiết và tùy thuộc vào từng loại thực vật bản địa.

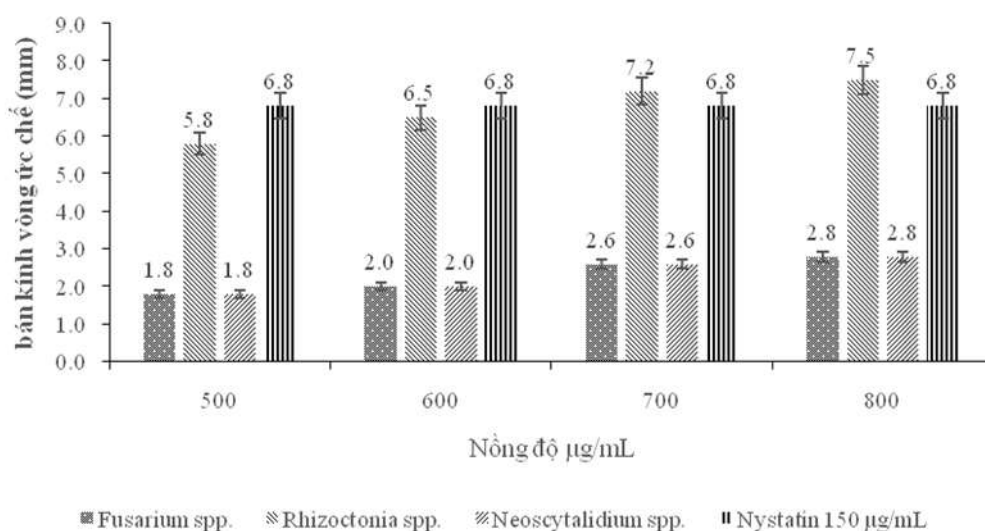
Hiệu quả ức chế của cao chiết đối với *Candida* sp. thấp hơn so với *Saccharomyces* sp. qua so sánh đường kính vòng ức chế. Điều này có thể do việc sử dụng kháng sinh nystatin trong điều trị các bệnh do nấm *Candida* sp. gây ra cũng tạo điều kiện cho loại nấm này hình thành các cơ chế đề kháng lại chất kháng sinh. Bên cạnh đó, *Candida* sp. còn có khả năng hình thành màng sinh học tạo điều kiện cho sự kết dính các tế bào lên bề mặt và làm cho cơ thể tương đối kháng với các liệu pháp kháng nấm (Ingroff, 2008). Theo Soliman và cs. (2017), *Candida* sp. được biết đến là loài vi sinh vật kháng thuốc nghiêm trọng.

3.7. Khảo sát khả năng kháng các loài nấm sợi *Rhizoctonia* sp., *Neoscytalidium* sp. và *Fusarium* sp.

Sau 24 giờ khảo sát cho thấy, khi nồng độ cao chiết tăng lên thì khả năng ức chế cũng tăng. Hiệu quả ức chế của cao chiết đối với nấm *Rhizoctonia* sp. là cao nhất (bán kính vòng ức chế dao động từ 5,8 đến 7,5 mm) tương đương với kháng sinh nystatin nồng độ 150

$\mu\text{g/mL}$, kế tiếp là *Neoscytalidium* sp. và cuối cùng là *Fusarium* sp. Đối với *Fusarium* sp. khi nồng độ cao chiết tăng từ 500 mg/mL lên 700 mg/mL thì giá trị bán kính vùng ức chế tăng lên, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nồng độ 500 mg/mL.

Kết quả thí nghiệm phù hợp với nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để tìm ra các hoạt chất từ chiết xuất nhiều loài thực vật nhằm chống lại sự phát triển của các dòng nấm gây hại. Kim và cs. (2004) đã báo cáo tác dụng kháng nấm của một số hợp chất phenolic bao gồm acid cinnamic, acid m-coumaric, acid p-coumaric và acid caffeic. Đồng thời theo kết quả đã xác định trong cao chiết chứa các hợp chất như terpenoid, alkaloid, flavonoid, saponin với hàm lượng khác nhau đều có tác dụng ức chế sự phát triển của nấm. Trong đó saponin là hợp chất thực vật phổ biến được chia thành 3 nhóm chính là triterpenoid, steroid hoặc steroid glycoalkaloid có vai trò chống lại nấm gây bệnh nhờ khả năng tạo phức hợp với sterol màng tế bào gây ra sự hình thành lỗ hổng (Osborn, 1996).



Hình 7. Biểu đồ thể hiện khả năng kháng các loại nấm sợi ở nồng độ 500, 600, 700, và 800 mg/mL.

Tại nồng độ 800 mg/mL giá trị bán kính ức chế của cao chiết đối với *Fusarium* sp. và *Neoscytalidium* sp. khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nồng độ 700 mg/mL. Có thể giải thích điều này là do ở nồng độ quá cao, trong khi đó cao chiết ở dạng thô chưa tinh sạch nên ngoài các hợp chất thực vật, cao chiết còn tồn tại lượng tạp chất lớn gây cản trở khuếch tán ra môi trường thạch. Ngoài ra, một chất kháng tiếp xúc gắn kết trên tế bào vi sinh vật gây ức chế, tuy vậy, các mục tiêu gắn kết trên tế bào vi sinh vật có giới hạn nên dù tăng hàm lượng cao hay chất kháng thì hoạt tính cũng không gia tăng được (Dzidic và cs., 2008).

4. KẾT LUẬN

Cao chiết methanol lá Mơ xanh (*Paederia consimilis*) trong nghiên cứu này cho thấy có những hoạt tính như khả năng kháng oxy hóa. Trong tương lai, các hợp chất thực vật có tiềm năng kháng oxy hóa có trong loài cây này nên được phân tích cụ thể hơn để hiểu thêm về các ảnh hưởng của chúng khi chúng tham gia vào quá trình sinh lý, sinh hóa trên sinh vật. Đồng thời, cần sử dụng những loại dung môi khác để ly trích và so sánh hiệu quả ly trích với dung môi methanol đối với khả năng kháng các nhóm vi sinh vật như vi khuẩn, nấm men và nấm sợi. Trong đó, khả năng kháng lại nấm *Rhizoctonia* sp. là cao nhất với giá trị bán kính vòng ức chế chế từ 5,8 mm đến 7,5 mm. Việc khảo sát khả năng kháng vi sinh vật cần thực

hiện ở những nồng độ cao hơn, thời gian kéo dài hơn nhằm so sánh hiệu quả với các loại kháng sinh trong việc ức chế sự phát triển của các vi sinh vật để tìm được nồng độ diệt khuẩn hiệu quả nhất, từ đó có thể hướng tới khả năng sản xuất các hợp chất kháng khuẩn từ những cây dược liệu thay thế cho thuốc kháng sinh hiện nay.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin gửi lời chân thành cảm ơn đến phòng thí nghiệm Protein enzyme, Viện Nghiên Cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện để nghiên cứu diễn ra thành công.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Phạm Hoàng Hộ, 1999. Cây cỏ Việt Nam, Nhà xuất bản trẻ TP. HCM, trang 457.

Đỗ Tất Lợi. (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học, 618-619.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Bhat, R., Kamaruddin, N.S.B.C., Min-Tze, L. and Karim, A.A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 1295-1300.

Bhatnagar and Sahoo. (2015). A comparative analysis of phytochemical and antioxidant profile of *Paederia foetida* L. wild and cultivated varieties. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 1329-1337.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

Carter, Y. S. (2005). Antimicrobial modes of action. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*, 3-15.

Chanda, Sarethy, Biplab De Kuldeep Singh. (2012). *Paederia foetida* - a promising ethanol-medicinal tribal plant of northeastern India. *Indira Journal of Forestry Research*.

Cocito, C., Gaetano, G. and Delfini., C. (1995). Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chemistry*, 52(3), 311-320.

Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.

Croteau, R., T. M. Kutchan and N. G. Lewis. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists*, 1250-1318.

Dorman, H. D., Koşar, M., Kahlos, K., Holm, Y. and Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(16), 4563-4569.

Duh, P. D. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(4), 455-461.

Duh, P. D., Tu, Y. Y. (1999). Antioxidant Activity of Water Extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Science and Technology*, 32(5), 269-277.

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

Espinell Ingroff, A. (2008). Mechanism of resistance to antifungal agents: yeast and filamentous fungi. *Revista iberoamericana de micología*, 25(2), 101.

Geoffrey K. K., John K. M., Naomi M. and Simon K. M. (2014). Qualitative phytochemical screening of *Camellia sinensis* and *Psidium guajava* leave extracts from Kericho and Baringo counties. *International Journal Of Advanced Biotechnology And Research (IJBR)*, 5(3), 506-512.

- Hiai S., Oura H., & Nakajima T. (1976). Color reaction of some saponin and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29(02), 116-122.
- Hall Stoodley L., Costerton J.W. and Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95-108.
- James Matthew Searels, Karissa D. Keen, Jonathan L. Horton, H. David Clarke, Jennifer Rhode Ward. (2013). Comparing Ginsenoside Production in Leaves and Roots of compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Kahan F. M., Kahan J. S., Cassidy P. J. and Kropp H. (1974). The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235(1), 364-386.
- Kim J. H., Campbell B.C., Mahoney N. E., Chan K. L. and Molyneux R. J. (2004). Identification of phenolics for control of *Aspergillus flavus* using *Saccharomyces cerevisiae* in a model target-gene bioassay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7814-7821.
- Khan Z. S. and Nasreen S. (2010). Phytochemical analysis, antifungal activity and mode of action of methanol extracts from plants against pathogens. *Journal of Agricultural Technology*, 6(4), 793-805.
- Lagrouh F., Dakka, N., and Bakri, Y. 2017. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de mycologie medicale*, 27(3), 303-311.
- Latteef. (2012). Phytochemical, antibacterial and antioxidant activity of *Camellia sinensis* ethanolic and aqueous extracts. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11(6), 113-119.
- Liang C., Liu Z., Liu X., Geng Y., Song H., Ding S. and Deng Y. (2014). The extract optimization and identification study of bioactive total triterpenoids from the rare traditional Chinese medicine Qinling Polyporus umbellatus. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(6), 1283-1289.
- Masadeh M. M., Mhaidat N. M., Alzoubi K. H., Hussein E. I. and Al Trad, E. I. (2013). *In vitro* determination of the antibiotic susceptibility of biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. *Infection and drug resistance*, 6, 27-32.
- Masuzawa N., Ohdaira E. and Ide M. (2000). Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics*, 39, 2978.
- Miller J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York.
- Mpofu S. J., Msagati T. A., Krause R. W. (2014). Cytotoxicity, Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Rhizomes of *Elephantorrhiza elephantina* and *Pentanisia Prunelloides*, 11(1), 34-52.
- Osborn A. E. (1996). Performed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The plant cell*, 8(10), 1821.
- Riaz N., Chong F. K., Dutta B. K., Man Z. B., Khan M. S. and Nurlaela E. (2012). Photodegradation of Orange II under visible light using Cu-Ni/TiO₂: effect of calcination temperature. *Chemical Engineering Journal*, 185, 108-119.
- Roggia I., Ziegler S., Cruz I. B. M., Ourique A. F. and Gomes P. (2016). A derivative uv spectrophotometric method for the determination of methylxanthines and tannins in guarana bulk (*Paullinia cupana*). *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 7(6).
- Scott A. I. (1964) *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural*. Pergamon press LTD. Made in Britain.
- Sheetal Gupta, J Prakash. (2009). Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. *Plant food for human nutrition*, 64(1), 39-45.
- Soliman S., Alnajdy D., El-Keblawy A A., Mosa K. A., Khoder G. and Noreddin A. M. (2017). Plants' Natural Products as Alternative Promising Anti-Candida Drugs. *Pharmacognosy reviews*, 11(22), 104.

- Soni, R.K., Irchhaiya, R., Dixit, V. and Alok, S., 2013. *Paederia foetida* Linn: phytochemistry, pharmacological and traditional uses. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(12), 4525-4530.
- Tiwari B. K., Brunton N. P. and Brennan C. (2013). Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction. *John Wiley & Sons*.
- Upadhyaya S. (2013). Screening of phytochemicals, nutritional status, antioxidant and antimicrobial activity of *Paederia foetida* Linn. from different localities of Assam, India. *Journal of Pharmacy research*, 7(1), 139-141.
- Vijayalakshmi M. and Ruckmani K. (2016). Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(3), 570-572.
- Vilkhu K., Mawson R., Simons L. and Bates D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.
- Yildirim, S., 2000. Effects of an educational computing course on preservice and inservice teachers: A discussion and analysis of attitudes and use. *Journal of Research on computing in Education*, 32(4), 479-495.
- Yildirim, A., Oktay, M., 2001. The Antioxidant Activity of the Leaves of *Cydonia vulgaris*. *Academic journal*, 31(2001), 23-27
-

STUDY ON BIOLOGICAL ACTIVITIES OF METHANOL LEAVES EXTRACT OF MO XANH (*Paederia consimilis*)

Hồ Ngọc Trinh, Nguyễn Thị Thùy Dương, Trần Thị Như Ý, Huỳnh Tuấn Kiệt,
Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Đức Độ.
Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Contact email: ngoctrinh419@gmail.com

ABSTRACT

Leaf extract of Mo xanh leaves (*Paederia consimilis*) extracted with methanol 96% solvent, identified as many plant compounds such as phenol, saponin, steroid, flavonoid. The content of saponin in extract was 29.7 ± 2.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$. The LM96S treatment for capable of inhibiting free radicals DPPH with IC_{50} value of 178.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the iron removal capacity of the extract with IC_{50} value of 42.1 ± 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lower than ascorbic acid (1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). At a concentration of 100 mg/mL , this extract had the ability to inhibit bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. and *Erwinia* sp. with halo ring diameter ranging from 2.7 mm to 7.3 mm. For *Saccharomyces* sp. and *Candida* sp. with halo ring diameter ranging from 2.2 mm to 3.2 mm. The molds as *Rhizoctonia* sp., *Neoscytalidium* sp., *Fusarium* sp. value radius of inhibition is from 1.8 mm to 7.5 mm.

Key words: Bacteria, extract, mold, *Paederia consimilis*, saponin.

Received: 19th September 2018 Reviewed: 1st November 2018

Accepted: 30th October 2018