

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AMPELOPSIS CANTONIENSIS EXTRACTS CULTIVATED AT DANANG AGAINST CLINICALLY ISOLATED STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Ngô Thái Bích Vân¹, Đào Thị Thu Thảo¹, Hoàng Thanh Trung², Triệu Tuấn Anh³

Võ Dương Nguyễn Sa⁴, Kim Văn Hùng⁴, Phạm Trần Vinh Phú^{3*}

¹University of Danang - Danang University of Science and Technology

²Danang Family Hospital, ³Dong A University - Danang, ⁴Danang Dermato-Venereology Hospital

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 18/4/2022	The Gram-positive <i>Staphylococcus aureus</i> is a common pathogen that causes many serious infectious diseases in humans, especially in hospital settings. Therefore, discovery and development of new antibiotics or new generations of antibiotics to treat infections caused by <i>S. aureus</i> is an urgent issue in Vietnam and all over the world. In this study, we isolated <i>S. aureus</i> from patient sample and investigated the antibacterial potency of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> extracts collected in Da Nang. The results showed that ethanolic crude extract can suppress <i>in vitro</i> growth of this strain after 24 hours. The ethylacetate fraction has the highest inhibitory effect on the growth of <i>S.aureus</i> bacteria, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 0,1 mg/ml and minimum bactericidal concentration (MBC) of 0,4 mg/ml. Whereas, extract of n-hexane fraction does not show antibacterial activity against <i>S. aureus</i> . These initial results are the premise for further studies on the antibacterial mechanism of <i>Ampelopsis cantoniensis</i> in the future.
Revised: 20/7/2022	
Published: 20/7/2022	
KEYWORDS	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
Extracts	
<i>Ampelopsis cantoniensis</i>	
Antimicrobial activity	
MIC	

HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN IN VITRO CỦA CAO CHIẾT TỪ CHÈ DÂY (AMPELOPSIS CANTONIENSIS) THU HÁI TẠI ĐÀ NẴNG TRÊN VI KHUẨN STAPHYLOCCUS AUREUS PHÂN LẬP TỪ BỆNH NHÂN NHIỄM TRÙNG DA

Ngô Thái Bích Vân¹, Đào Thị Thu Thảo¹, Hoàng Thanh Trung², Triệu Tuấn Anh³

Võ Dương Nguyễn Sa⁴, Kim Văn Hùng⁴, Phạm Trần Vinh Phú^{3*}

¹Trường Đại học Bách Khoa – ĐH Đà Nẵng, ²Bệnh viện Gia đình Đà Nẵng

³Trường Đại học Đông Á Đà Nẵng, ⁴Bệnh viện Da liễu Đà Nẵng

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 18/4/2022	Vi khuẩn Gram dương <i>Staphylococcus aureus</i> (tụ cầu vàng) là một mầm bệnh phổ biến gây ra nhiều bệnh truyền nhiễm nghiêm trọng ở người, đặc biệt là ở môi trường bệnh viện. Do đó, việc tìm kiếm và phát triển các loại thuốc kháng sinh mới hoặc các thể hệ kháng sinh mới để điều trị nhiễm trùng do <i>S. aureus</i> đang là vấn đề cấp thiết đối với y học Việt Nam nói riêng và trên toàn thế giới nói chung. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập vi khuẩn <i>S. aureus</i> từ bệnh nhân nhiễm trùng da và tiến hành khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn này bởi các cao chiết từ chè dây thu hái tại khu vực Đà Nẵng. Kết quả cho thấy cao tổng ethanol chè dây có thể ức chế sự phát triển của chủng vi khuẩn này sau 24 giờ nuôi cấy <i>in vitro</i> . Trong các cao phân đoạn, cao ethylacetate có hiệu quả ức chế tăng sinh vi khuẩn <i>S.aureus</i> cao nhất, với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 0,1 mg/ml và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) là 0,4 mg/ml. Ngược lại, cao phân đoạn n-hexane không có tác dụng kháng lại chủng vi khuẩn <i>S.aureus</i> . Kết quả bước đầu này là tiền đề cho những nghiên cứu xa hơn về cơ chế kháng khuẩn của chè dây trong tương lai.
Ngày hoàn thiện: 20/7/2022	
Ngày đăng: 20/7/2022	
TỪ KHÓA	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
Cao chiết	
Chè dây	
Hoạt tính kháng khuẩn	
MIC	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5869>

* Corresponding author. Email: ptvphu0603biotech@gmail.com

1. Giới thiệu

Hiện nay, kháng kháng sinh đang là một vấn đề mang tính toàn cầu, đặc biệt ở các nước đang phát triển như Việt Nam. Trong đó, vi khuẩn *S. aureus* là một trong những tác nhân phổ biến nhất gây nên các bệnh nhiễm trùng ở người [1]. Chủng vi khuẩn này đã và đang gây ra hàng loạt bệnh cho người ở các mức độ khác nhau như nhiễm trùng da nhỏ, viêm mô tế bào, viêm nang lông, hội chứng da có vảy, áp xe, viêm phổi, viêm màng não, viêm tủy xương, viêm nội tâm mạc, nhiễm trùng huyết,... [2]. Một vấn đề đáng lo ngại hơn cả là quần thể *S. aureus* có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm), khả năng kháng kháng sinh vốn có của màng sinh học kèm với sự bảo vệ lý tưởng bởi hàng rào bên ngoài, giúp cho chủng vi khuẩn này có khả năng không dung nạp liệu pháp kháng sinh [3].

Những năm gần đây, nhiều hợp chất kháng sinh tổng hợp, hoặc có nguồn gốc từ tự nhiên đã được sử dụng rộng rãi để giảm thiểu tình trạng kháng thuốc trong lâm sàng. Việt Nam với thảm thực vật phong phú và đa dạng nên đã có nhiều nghiên cứu về cao chiết, hợp chất thiên nhiên có khả năng kháng lại vi khuẩn *S. aureus* được công bố [3]-[5]. Cây chè dây (*Ampelopsis cantoniensis*) là một thảo dược quen thuộc, mọc nhiều ở các vùng núi phía Bắc và Trung bộ [6]. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Thu và cộng sự (2015) đã cho thấy trong chè dây có nhiều hợp chất có khả năng kháng viêm, trong đó hợp chất 5,7,3'-tetrahydroxyflavanone và phloretin làm giảm quá trình tổng hợp nitric oxit (NO) do lipopolysaccharide (LPS) gây ra trong tế bào [7]. Năm 2016, Phạm Thị Kim Thảo và cộng sự đã có công bố về khả năng kháng oxy hóa và kháng khuẩn trên chè dây thu hái tại Quảng Nam và Đà Nẵng, trong đó cho thấy tác dụng ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* và *Salmonella typhi* [8]. Tuy nhiên, nghiên cứu này chỉ khảo sát tác động của cao chiết tổng ethanol trên chủng vi khuẩn *S. aureus* thông thường.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập vi khuẩn *S. aureus* từ bệnh phẩm của bệnh nhân nhiễm trùng da và khảo sát khả năng kháng lại vi khuẩn này của cao tổng ethanol và các cao phân đoạn có độ phân cực tăng dần bao gồm n-hexane, n-butanol và ethylacetate chiết xuất từ chè dây bản địa thu hái tại xã Hoà Bắc, huyện Hoà Vang, thành phố Đà Nẵng. Kết quả nghiên cứu bước đầu là cơ sở cho việc tìm ra các hợp chất từ chè dây có tiềm năng ứng dụng trong hỗ trợ điều trị bệnh nhân nhiễm trùng, từ đó định hướng tiếp tục phát triển thành các sản phẩm thực phẩm chức năng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* được phân lập từ bệnh nhân nhiễm trùng da tại Bệnh viện Da liễu Đà Nẵng. Việc sử dụng mẫu bệnh phẩm cho nghiên cứu này đã được sự chấp thuận của hội đồng Y đức Bệnh viện Da liễu Đà Nẵng. Vi khuẩn được nuôi cấy và bảo quản tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Hóa, Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng.

Mẫu chè dây (bao gồm lá và thân) được thu hái ở khu vực đồi núi thuộc xã Hòa Bắc, huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng từ tháng 6-7/2021. Hình thái phân loại của mẫu chè dây này được xác định bởi TS. Nguyễn Thị Thuỳ Linh, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược – Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất cao tổng

Mẫu chè dây gồm thân và lá sau khi rửa sạch, cắt nhỏ và được sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi bằng máy sấy Memmert UFE 600 (Buechenbach, Germany). Cân 100 g chè dây sau khi sấy ngâm trong 1500 ml dung dịch cồn 70% trong 72 giờ. Phần dung dịch được lọc qua bộ lọc mịn 0,2 cm, phần bã tiếp tục được ngâm trong 1500 ml dung dịch cồn 70% trong 72 giờ. Sau đó, phần dịch lỏng được lọc qua giấy lọc Whatman No.4, dung dịch sau lọc được cô đặc bằng

máy cô quay chân không (EYELA, Nhật Bản). Cuối cùng, dung dịch chiết xuất được phân đoạn trong 3 loại dung môi có độ phân cực tăng dần, lần lượt là n-hexane, n-butanol và ethylacetate.

2.2.2. Phân lập vi khuẩn *S.aureus*

Dùng tăm bông vô khuẩn loại dùng một lần thu lấy dịch mủ từ vết thương ở bàn chân của bệnh nhân, rồi cấy trải trên môi trường chọn lọc Brain Heart Infusion (BHI-Himedia; thành phần bao gồm HM Infusion powder 12,5g/l; bột BHI 5g/l; Proteose peptone 10g/l; Glucose 2g/l; NaCl 5g/l; Na_2HPO_4 2,5g/l; Agar 15g/l; pH=7,4 $\pm$ 0,2) nuôi cấy trong 24 giờ ở 37°C. Những khuẩn lạc có màu vàng được tiếp tục cấy ria trên môi trường thạch máu BA (blood agar – Himedia; HM peptone 10g/l; tryptose 10g/l; NaCl 5g/l; agar 15g/l; pH 7,3 $\pm$ 0,2) có bổ sung 5% máu cừu (mã sản phẩm 79365V -Nam Khoa). Chủng *S.aureus* thuộc nhóm tan máu beta (β -hemolysis). Đồng thời, thực hiện thử nghiệm catalase và coagulase trong ống nghiệm để khẳng định nhóm vi khuẩn tụ cầu vàng [9].

2.2.3. Thử nghiệm catalase

Lấy một khuẩn lạc *S.aureus* đã được nuôi cấy trên môi trường thạch sau 24 giờ ở 37°C và chuyển sang lam kính sạch. Nhỏ 1 giọt H_2O_2 3% lên khuẩn lạc này và quan sát hiện tượng sủi bọt ngay sau đó. Vi khuẩn *S.aureus* thuộc nhóm catalase dương tính nên sẽ thủy phân H_2O_2 thành H_2O và giải phóng O_2 [9].

2.2.4. Thử nghiệm coagulase

Dùng bơm tiêm hút 2 ml dịch canh trường *S.aureus* cho vào lọ huyết tương thỏ đông khô. Xoay đều để hòa tan hỗn hợp, sau đó ủ ở 37°C trong 24h. Quan sát và ghi nhận kết quả, nghiêng nhẹ ống để phát hiện đông vón. Coagulase dương tính là một đặc điểm sinh hóa đặc trưng của nhóm *S.aureus* [9].

2.2.5. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Phương pháp này dựa trên khả năng đối kháng của chất cần khảo sát với vi khuẩn trên môi trường thạch. Chất có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn sẽ tạo vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch.

Chủng vi khuẩn *S. aureus* nuôi cấy qua đêm trong môi trường Mueller Hinton Broth (MHB – Himedia; HM infusion B 300g/l; acicase 17,5g/l; tinh bột 1,5g/l; pH 7,3 $\pm$ 0,1) ở 37°C, 200 vòng/phút, được pha loãng để đạt độ đục tương đương ống chuẩn 0,5 Mcfarland (Nam Khoa). Cho vào 100 μl dịch vi khuẩn đã pha loãng vào đĩa petri đã đổ môi trường Mueller Hinton Agar (MHA – Himedia; HM infusion B 300g/l; acicase 17,5g/l; tinh bột 1,5g/l; agar 15g/l; pH 7,3 $\pm$ 0,1) có độ dày 4 mm (tương đương 20 ml MHA). Dùng que cấy trang đã khử khuẩn trang đều dịch canh trường. Để khô mặt thạch trong 15 phút. Đục các lỗ có đường kính 0,9 cm trên mặt thạch. Cho vào mỗi giếng 100 μl cao chè dây (ở các nồng độ 100 mg/ml và 50 mg/ml) [9]. Trong thí nghiệm này, đối chứng dương là kháng sinh Ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ và đối chứng âm là dung môi hòa tan cao chiết (DMSO 10%). Để yên trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó nhẹ nhàng đặt đĩa vào tủ lạnh 4°C để các chất có thể khuếch tán đều vào môi trường trong 2 giờ. Ủ đĩa ở 37°C trong 24 giờ và đo đường kính vòng vô khuẩn.

2.2.6. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration-MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (minimum bactericidal concentration- MBC) của cao chiết chè dây lên vi khuẩn *S. aureus*

Trong thử nghiệm này, cao chiết này được pha loãng bậc 2 từ nồng độ ban đầu là 50 mg/ml trong DMSO 10%. Dịch vi khuẩn được nuôi qua đêm và được pha loãng đạt mật độ ban đầu là 10^6 CFU/ml. Cho vào mỗi giếng gồm 50 μl dịch vi khuẩn và 50 μl dịch cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau. Các giếng đối chứng âm chỉ chứa cao chiết ở các nồng độ khác nhau và

môi trường MHB. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 2 lần. Ủ đĩa ở 37°C, qua đêm. Sau 24 giờ, thêm 30 µl dung dịch resazurin 0,015% (Santa Cruz, USA) vào mỗi giếng. Giá trị MIC là nồng độ thấp nhất trong dãy thử nghiệm của các cao chiết có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (giếng không làm đổi màu resazurin) [10].

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định bằng phương pháp trải đĩa: 100 µl dịch thử nghiệm trên các giếng không có sự đổi màu resazurin sẽ được trải lên các đĩa thạch chứa môi trường MHA và được ủ ở 37°C, sau 24 giờ quan sát sự tạo thành khuẩn lạc. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của các cao chiết có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn [10].

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả trình bày là giá trị trung bình của ít nhất 3 lần lặp lại thí nghiệm. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

3. Kết quả và bàn luận

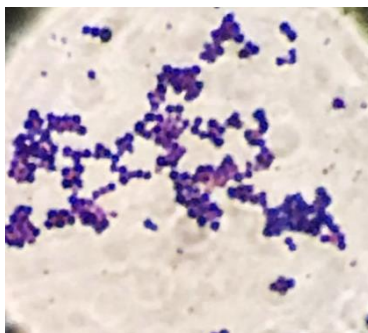
3.1. Phân lập chủng vi khuẩn *S.aureus* từ mẫu lâm sàng

Mẫu bệnh phẩm sau khi thu thập được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường BHI, là môi trường giàu chất dinh dưỡng, thường được sử dụng để phân lập các chủng vi khuẩn gây bệnh. Chúng tôi chọn những khuẩn lạc có màu vàng đặc trưng trên môi trường BHI và tạo vùng tan máu rõ ràng quanh khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 5% máu cừu (nhóm tan máu beta). Kết quả phân lập được thể hiện ở hình 1. Tiếp theo, chúng tôi làm thuần chủng vi khuẩn và nhuộm Gram, kết quả quan sát dưới kính hiển vi cho thấy vi khuẩn thuộc nhóm Gram dương, tế bào hình cầu, tập trung thành cụm, kiểu hình đặc trưng của nhóm tụ cầu vàng (Hình 2). Các thử nghiệm sinh hóa coagulase và catalase dương tính cho phép khẳng định vi khuẩn thuộc loài *S. aureus*.

Như vậy, chúng tôi đã phân lập được chủng vi khuẩn *S. aureus* từ bệnh nhân nhiễm trùng da và sử dụng chủng này làm đối tượng nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của các cao chiết từ lá chè dây.



Hình 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *S.aureus* trên môi trường BHI (trái) và môi trường BA (phải)



Hình 2. Kết quả nhuộm Gram của vi khuẩn phân lập được dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 100X

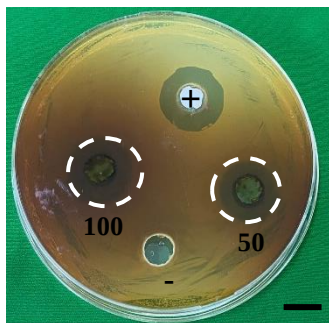
3.2. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết tổng ethanol chè dây

Để phục vụ cho nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu cao chiết tổng số trong dung môi ethanol 70% bằng phương pháp trích ly rắn-lỏng, sau đó phân lập bước đầu các nhóm hoạt chất trong cao tổng bằng cách chiết qua nhiều dung môi khác nhau theo độ phân cực tăng dần bao gồm n-hexane, n-butanol và ethylacetate bằng phương pháp trích ly lỏng-lỏng. Hiệu suất của quá trình chiết được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hiệu suất của quá trình thu cao chiết bằng các dung môi khác nhau

Dung môi	Ethanol 70%	n-hexane	n-butanol	ethylacetate
Hiệu suất chiết (%)	5	10	40	30

Trong thử nghiệm này, chúng tôi khảo sát hoạt tính của cao tổng ethanol chè dây trên vi khuẩn *S. aureus* bằng phương pháp khuếch tán đĩa. Dung môi ethanol 70% được sử dụng cho quá trình thu cao định chuẩn vì ethanol được đánh giá là dung môi toàn năng và không độc. Cao định chuẩn ethanol được hòa tan trong DMSO 10% để đạt nồng độ 100 mg/ml và 50 mg/ml. Hiệu quả ức chế sự phát triển của vi khuẩn được đánh giá dựa trên đường kính vòng vô khuẩn đã trừ đi kích thước lỗ thạch 9 mm (Hình 3). Kết quả được trình bày trong bảng 2.



Hình 3. Kết quả khuếch tán đĩa thạch của các cao chè dây ethanol (100; 50: nồng độ của cao chiết sử dụng (mg/ml); (+): chứng dương Ampiciline; (-): chứng âm DMSO 10%. Thanh kích thước tương ứng 1 cm)

Bảng 2. Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của cao chiết ethanol chè dây

	Nồng độ cao chiết (mg/ml)	
	100	50
Cao tổng ethanol	13,5 ± 2,1	9,5 ± 2,1

(Số liệu thể hiện: giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn)

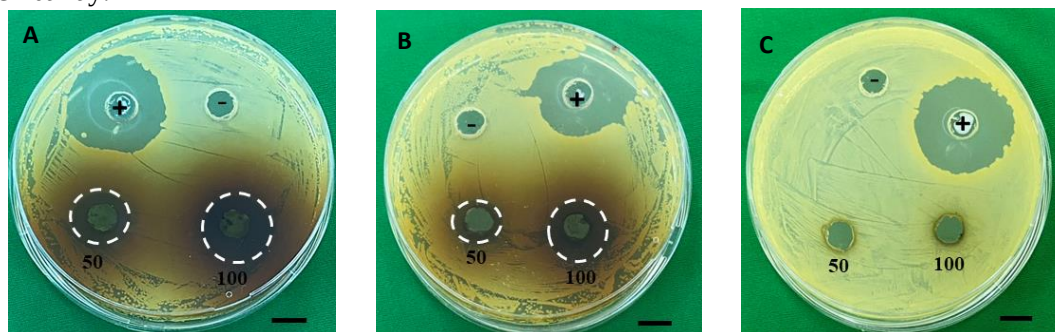
3.3. Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết phân đoạn chè dây

Tiếp theo, chúng tôi so sánh hoạt tính kháng khuẩn của các cao phân đoạn n-hexane, n-butanol và ethylacetate (Hình 4). Kết quả khuếch tán đĩa thạch cho thấy vi khuẩn *S. aureus* nhạy với cao ethylacetate và cao n-butanol do có hình thành vòng vô khuẩn ở nồng độ khảo sát, ngược lại vi khuẩn này kháng lại cao phân đoạn n-hexane. Cụ thể, phân đoạn ethylacetate có hiệu quả kháng khuẩn cao nhất với đường kính vòng vô khuẩn ở nồng độ 100 mg/ml là 13,5 ± 0,7 (mm). Cao phân đoạn n-butanol ở nồng độ 100 mg/ml có hiệu quả kháng khuẩn thấp hơn, đường kính vòng vô khuẩn 9,50 ± 0,21 (mm). Không xuất hiện vòng kháng khuẩn tại các giếng đối chứng âm DMSO 10%, chứng tỏ dung môi sử dụng trong thử nghiệm này không ảnh hưởng đến hoạt tính của các cao chiết (Hình 4).

Từ các kết quả của khảo sát này bước đầu khẳng định các cao chè dây có thể kháng lại vi khuẩn *S. aureus* được phân lập từ mẫu bệnh phẩm.

Kết quả ở Hình 4 cho thấy cao ethylacetate của chè dây cho hoạt tính kháng *S. aureus* mạnh nhất so với các phân đoạn n-hexane và n-butanol. Vì vậy phân đoạn ethylacetate được lựa chọn

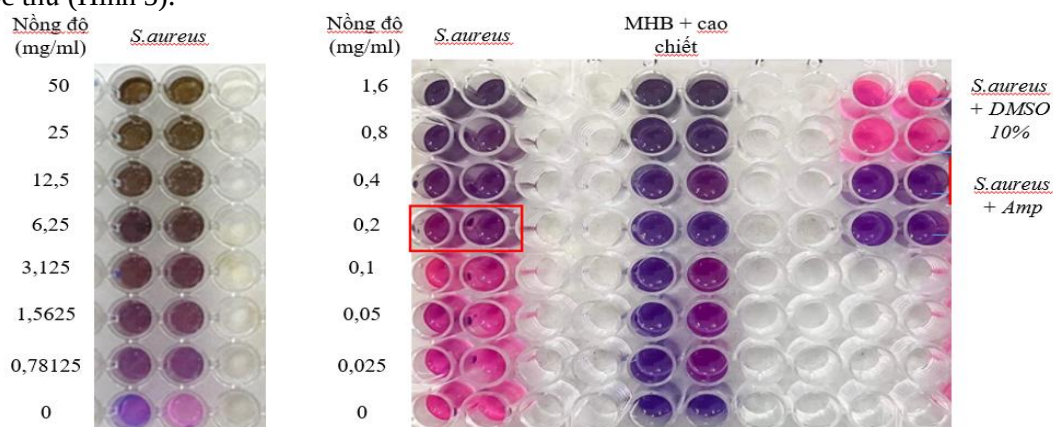
cho các thí nghiệm tiếp theo để đánh giá chi tiết hơn về hoạt tính kháng khuẩn của phân đoạn cao chiết này.



Hình 4. Kết quả khuếch tán đĩa thạch của các cao chèn dây phân đoạn (A)- cao ethylacetate; (B)- Cao n-butanol; (C)- Cao n-hexane (100; 50: nồng độ của cao chiết sử dụng (mg/ml); (+): chứng dương Ampiciline; (-): chứng âm DMSO 10%. Thanh kích thước tương ứng 1 cm)

3.4. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao phân đoạn ethylacetate của chèn dây lên vi khuẩn *S. aureus*

Chúng tôi chọn cao phân đoạn ethylacetate để xác định giá trị MIC và MBC. Dựa vào sự thay đổi màu sắc của thuốc thử resazurin trên đĩa 96 giếng có thể xác định được nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết. Ampicilin nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$ đã ức chế sự phát triển của chủng *S. aureus* nên ở các giếng có bổ sung kháng sinh này thuốc thử resazurin vẫn giữ màu xanh, trong khi đó vi khuẩn ở các mẫu có bổ sung dung môi DMSO 10% vẫn phát triển bình thường nên đã chuyển hóa resazurin (màu xanh) thành resorufin (màu hồng). Các giếng có bổ sung cao chiết nồng độ từ 50 mg/ml đến 0,4 mg/ml vẫn giữ màu xanh của thuốc thử resazurin, chứng tỏ vi khuẩn *S. aureus* đã bị ức chế bởi cao chiết. Trong khi đó, sự chuyển màu của thuốc thử từ xanh sang hồng bắt đầu xuất hiện ở các giếng có nồng độ cao chiết nhỏ hơn hoặc bằng 0,2 mg/ml. Kết quả thể hiện trong hình 5 cho phép xác định giá trị MIC của cao phân đoạn ethylacetate là 0,1 mg/ml. Ở các giếng chỉ có cao chiết và môi trường nuôi cấy vi khuẩn MHB không làm thay đổi màu của dung dịch resazurin, chứng tỏ các thành phần hợp chất trong cao chiết không ảnh hưởng đến hoạt động của thuốc thử (Hình 5).



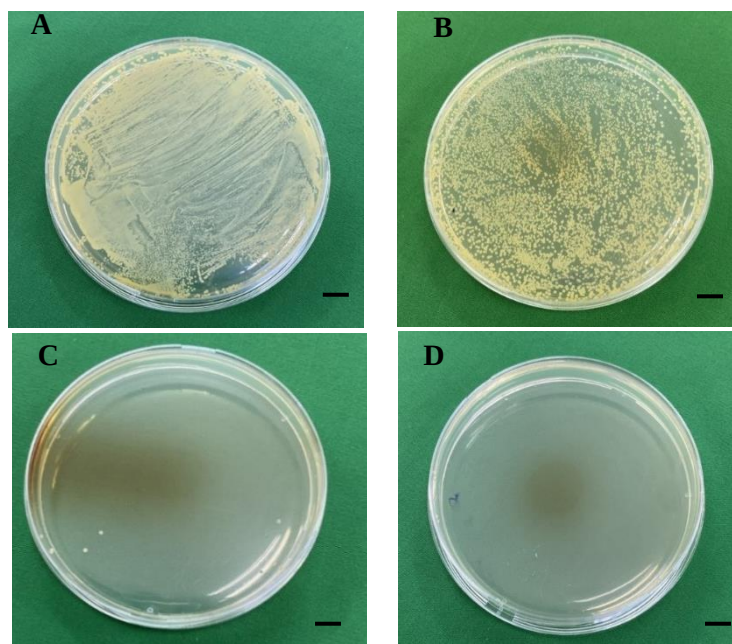
Hình 5. Kết quả xác định giá trị MIC của cao phân đoạn ethylacetate

S. aureus: các giếng được bổ sung dịch vi khuẩn + cao chiết có nồng độ tương ứng với giá trị ghi bên trái (từ 50 mg/ml đến 0 mg/ml); MHB+cao chiết: các giếng được bổ sung cao chiết có nồng độ tương ứng với giá trị ghi bên trái và môi trường nuôi cấy vi khuẩn MHB; chứng dương là giếng chứa dịch vi khuẩn có bổ sung kháng sinh Ampiciline nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$; chứng âm là giếng chứa dịch vi khuẩn có bổ sung dung môi DMSO 10%

Tiếp theo, chúng tôi tiến hành xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC bằng xử lý dịch vi khuẩn *S.aureus* (10^6 CFU/ml) với cao chiết phân đoạn ethylacetate có nồng độ 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml và 0,8 mg/ml và cấy trải trên môi trường MHA. Kết quả cho thấy cao phân đoạn từ nồng độ 0,4 mg/ml có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn nghiên cứu (Hình 6). Như vậy, phân đoạn ethylacetate của chè dây có khả năng kháng khuẩn *S.aureus* do tỉ lệ MBC/MIC bằng 4.

Đã có các nghiên cứu về hoạt tính kháng vi khuẩn *S.aureus* của một số thực vật ở Việt Nam. Cao chiết dichloromethane lá Núc Nác (*Oroxylum indicum* L.) có tác dụng ức chế sự phát triển *S. aureus* ATCC 6538 với giá trị MIC, MBC lần lượt là: $320 < \text{MIC} \leq 640$ $\mu\text{g/mL}$; $640 < \text{MBC} \leq 1280$ $\mu\text{g/mL}$) [11]. Các cao chiết từ lá dâm bụt cũng được chứng minh có khả năng kháng vi khuẩn *S.aureus*, trong đó tiểu phân đoạn E7 (với thành phần chính là neophytadiene, trans-phytol và 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) từ cao phân đoạn ethylacetate có nồng độ MIC và MBC lần lượt là 0,1 mg/ml và 0,2 mg/ml [12]. Như vậy, so sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi có thể thấy rằng, chè dây là tác nhân ức chế tốt vi khuẩn *S.aureus*.

Cao thô chè dây đã được chứng minh có khả năng cảm ứng sự chết theo chương trình (apoptosis) của dòng tế bào ung thư máu leukemia HL-60 thông qua hoạt động của enzyme capase-3 [13]. Gần đây, hai hợp chất ampechomonol A và ampechomonol B, thuộc nhóm meroterpenoid đã được phân lập từ chè dây và có hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 [14]. Nhiều hợp chất có hoạt tính kháng viêm cũng đã được tìm thấy trong lá chè dây [7]. Một số nghiên cứu trong nước cũng đã thực hiện khảo sát khả năng kháng lại vi khuẩn của chè dây. Tuy nhiên, theo hiểu biết của chúng tôi, đây là nghiên cứu đầu tiên cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn *S.aureus* phân lập từ mẫu bệnh phẩm của các cao chiết từ chè dây.



Hình 6. Kết quả cấy trải dịch vi khuẩn *S.aureus* khi xử lý với cao phân đoạn ethylacetate nồng độ 0,1 mg/ml (A); 0,2 mg/ml (B); 0,4 mg/ml (C); và 0,8 mg/ml (D) trên môi trường MHA

4. Kết luận

Kết quả khảo sát trên các cao chiết xuất từ chè dây với các dung môi khác nhau đã chứng minh khả năng ức chế vi khuẩn *S.aureus* phân lập từ mẫu bệnh phẩm, trong đó cao tổng ethanol và cao phân đoạn ethylacetate có đường kính vòng kháng khuẩn tương đương nhau. Từ giá trị MBC và MIC có thể dự đoán trong phân đoạn ethylacetate của chè dây khi trích ly lỏng-lỏng

chứa những hợp chất có tiềm năng kháng lại vi khuẩn *S.aureus*. Đây là cơ sở khoa học cho những nghiên cứu sâu hơn về khả năng ức chế vi khuẩn tụ cầu vàng của chè dây thu hái tại Hòa Bắc, Đà Nẵng và cho rằng việc sử dụng chè dây như là một dược liệu quý trong dân gian.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp cơ sở Sở Khoa học Công nghệ thành phố Đà Nẵng năm 2021 cấp cho Phạm Trần Vĩnh Phú (Quyết định số 199/QĐ-SKHCN ngày 13 tháng 7 năm 2021); Sự hỗ trợ về trang thiết bị tại Khoa Y - Trường Đại học Đông Á và phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học - Khoa Hoá - Trường Đại học Bách khoa Đà Nẵng; Sự hỗ trợ về chẩn đoán lâm sàng tại Bệnh viện Da liễu thành phố Đà Nẵng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. H. Nguyen, N. T. T. Tran, N. H. Cao, and L. L. N. Vu, "Antibiotic resistance prevalence of *Staphylococcus aureus* among the specimens pathological samples in microbiological laboratory at Pasteur Institute in Ho Chi Minh city," *Journal of Preventive Medicine*, vol. 10, no. 146, Special issue, p. 270, 2013.
- [2] T. T. N. L. Mai, H. T. Huynh, S. Nguyen, V. T. Nguyen, H. A. Hoang, and T. V. Truong, "Antibacterial, anti- β -hemolysin, and antibiofilm activity of the ethylacetate fraction of *Grewia asiatica* L. against *Staphylococcus aureus*," in *Proc. Biotechnology Conference*, 2020, pp. 815-820.
- [3] M. I. Abd El-Hamid, E. Y. El-Naenaeey, T. M. Kandeel, W. A. H. Hegazy, R. A. Mosbah, M. S. Nassar, M. A. Bakhrebah, W. H. Abdulaal, N. A. Alhakamy, and M. M. Bendary, "Promising Antibiofilm Agents: Recent Breakthrough against Biofilm Producing Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*," *Antibiotics*, vol. 9, no. 10, p. 667, 2020.
- [4] A. Gnanamani, P. Hariharan, and M. Paul- Satyaseela, *Staphylococcus aureus: Overview of bacteriology; Clinical Diseases, Epidemiology antibiotic resistance and therapeutic approach*, Frontiers in *Staphylococcus aureus*. IntechOpen, 2017.
- [5] T. W. Tan, Y. T. Lin, J. S. Yang, C. C. Lu, J. H. Chiang, C. L. Wu, J. P. Lin, N. Y. Tang, C. C. Yeh, M. J. Fan, and J. G. Chung, "A. cantoniensis inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immunoresponses in vivo," *In Vivo*, vol. 23, no. 4, pp. 561-566, 2009.
- [6] L. H. Nguyen, D. P. Tran, T. V. Pham, H. Le, and T. T. Nguyen, "The Current Production of *Ampelopsis cantoniensis* (Hook. & Arn.) Planch (Vine Tea) in the Tu Commune, Dong Giang District, Quang Nam Province," *Vietnam Journal of Agriculture Science*, vol. 17, no. 6, pp. 443-453, 2019.
- [7] T. V. Nguyen, C. D. To, M. H. Tran, L. V. Hoang, M. H. Woo, J. S. Choi, J. H. Lee, J. A. Kim, and B. S. Min, "Anti-inflammatory compounds from *Ampelopsis cantoniensis*," *Natural Product Communication*, vol. 10, no. 3, pp. 383-385, 2015.
- [8] T. T. K. Pham, T. T. X. Nguyen, and L. D. Dang, "A survey of antioxidant and antibacterial activities of alcoholic extract of *Ampelopsis cantoniensis* leaves from the central region Vietnam," *The University of Danang - Journal of Science and Technology*, vol. 1, no. 110, pp. 136-140, 2017.
- [9] Vietnam Ministry of Health, *Manual of diagnostic clinical microbiology*. Hanoi: Vietnam Ministry of Health, 2017.
- [10] P. Parvekar, J. Palaskar, S. Metgud, R. Maria, and S. Dutta, "The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*," *Biomaterial Investigation in Dentistry*, vol. 7, no. 1, pp. 105-109, 2020.
- [11] T. X. T. Dai, T. T. A. Vo, C. L. Tran, and T. C. T. Nguyen, "Studies on the antimicrobial activities of extracts from *Oroxylum indicum* L.," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 225, no. 8, pp. 3-10, 2020.
- [12] T. M. N. Luong, T. T. L. Nguyen, N. Q. Nguyen, T. N. H. Pham, T. H. H. Truong, T. H. Tran, and T. H. Pham, "Study on the antibacterial activities of *Hibiscus rosa-sinensis* leaf extracts against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*," *Science and Technology Development Journal - Natural Sciences*, vol. 19, no. 4, pp. 84-94, 2016.
- [13] T. W. Tan, H. Y. Tsai, Y. F. Chen, and J. G. Chung, "Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Ampelopsis cantoniensis* crude extract," *In vivo*, vol. 18, no. 4, pp. 457-462, 2004.
- [14] N. Y. T. Nguyen, N. S. L. Pham, P. H. Dang, D. M. N. Huu, H. P. Dang, and Q. L. Tran, "Two new meroterpenoids from the aerial parts of *Ampelopsis cantoniensis* (Vitaceae)," *Journal of Asian Natural Product Research*, vol. 22, no. 12, pp. 1152-1158, 2020.