



# KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN, HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA CAO PHÂN ĐOẠN ETHYL ACETAT VÀ MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ LÁ CÂY TRÚNG CÁ

## Investigation of antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract and some compounds isolated from leaves of *Muntingia calabura* L.

Lê Thị Thu Hồng<sup>1</sup>, Võ Văn Leo<sup>2</sup>  
Hongle5792@gmail.com

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

<sup>2</sup> Khoa Dược, Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh

**TÓM TẮT:** Ở Việt Nam, lá cây Trúng cá được sắc uống để chữa lỵ, tiêu chảy, điều kinh và các bệnh về gan, được trồng để lấy bóng mát ở nhiều nơi trong nước. Tuy nhiên, ở trong nước hầu như có khá ít đề tài nghiên cứu về cây này. Do vậy, đề tài này được thực hiện với mục tiêu xác định hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính chống oxy hóa của cao phân đoạn ethyl acetat và một số hợp chất phân lập được từ cao này. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường rắn. Kết quả thử nghiệm xác định được cao ethyl acetat, hợp chất davidiin và acid gallic ức chế sự phát triển của 3 chủng vi khuẩn *S. aureus*, *Shigella* và *S. epidermidis* (MIC: 500-1000 µg/ml). Hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp đánh bắt gốc tự do với thuốc thử DPPH của cao ethyl acetat (IC<sub>50</sub> 3,13 µg/ml); hợp chất quercetin; acid gallic và davidiin (IC<sub>50</sub> lần lượt 2,73; 1,59 và 3,78 (µg/ml)) cao hơn chứng dương acid ascorbic (IC<sub>50</sub> 4,30 (µg/ml)).

**TỪ KHÓA:** Cây trúng cá, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính chống oxy hóa

**ABSTRACT:** Leaves of *Muntingia calabura* have been used for the treatment of liver diseases and it is widely grown in many regions in Viet nam. However, there are very few studies about the plant in our country. So the purpose of of this study was to evaluate the antibacterial, antioxidant activities of ethylacetat extract and their compounds. Antimicrobial susceptibility testing methods was carried out on the disk diffusion method. Results showed that ethyl acetate extract, davidiin and acid gallic inhibited the growth of *S. aureus*, *Shigella*, *S. epidermidis* at the MIC of 500-1000 µg/ml. Antioxidant activity evaluated by DPPH free radical catching method of ethyl acetate extract (IC<sub>50</sub> 3.13 µg/ml); quercetin, gallic acid and davidiin (IC<sub>50</sub> 2.73; 1.59; 3.78 µg/ml; respectively) is stronger than ascorbic acid (IC<sub>50</sub> 4.30 µg/ml).

**KEYWORDS:** *Muntingia calabura*, leaves, antibacterial, antioxidant

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Trúng cá (*Muntingia calabura* L. Muntingiaceae) có nguồn gốc nhiệt đới châu Mỹ. Ở Việt Nam cây Trúng cá được trồng phổ biến ở nhiều nơi. Flavonoid là thành phần hóa học đã được nghiên cứu nhiều của cây Trúng cá. Từ lâu ở nước ta lá Trúng cá được sắc uống để chữa tiêu chảy, lợi kinh và các bệnh về gan [1],[2]. Trên thế giới có nhiều nghiên cứu về tác dụng của cao chiết và các hợp chất phân lập được từ lá Trúng cá như kháng khuẩn, kháng viêm, độc tế bào và hoạt tính chống oxy hóa [2]. Nhóm nghiên cứu đã phân lập và xác định cấu trúc của 7 hợp chất từ cao phân đoạn ethyl acetat (EA) bằng phương pháp phổ nghiệm [3],[4]. Nối tiếp công trình này, nhóm nghiên cứu tiếp tục công bố kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính chống oxy hóa của cao EA và một số hợp chất tinh khiết đã phân lập được gồm (kaempferol (1), tilirosid (2), kaempferol 3-O-(6''-O-galloyl)-β-D-glucopyranosid (3), quercetin (4), acid gallic (6) và davidiin (7).

### 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Mẫu thử

Mẫu thử cao EA và 6 hợp chất kaempferol (1), tilirosid (2), kaempferol 3-O-(6''-O-galloyl)-β-D-glucopyranosid (3), quercetin (4), acid gallic (6) và davidiin (7) được lấy từ đề tài của nhóm nghiên cứu đã công bố trước đó [3],[4].

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

Các chủng vi sinh vật được sử dụng trong thử nghiệm gồm *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Shigella* ATCC 13313, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922.

MHA (mueller-hinton agar) là môi trường sử dụng trong thử nghiệm. BHI (Brain Heart Infusion) là môi trường không chọn lọc giúp tăng sinh các vi khuẩn đến số lượng phù hợp (khoảng 10<sup>8</sup> CFU/ml) trước khi thử nghiệm.

#### 2.3. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

**Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường rắn.**

Mẫu thử là cao EA và các hợp chất tinh khiết được hòa tan trong dung môi DMSO 10% ở 2 nồng độ 100 và 10 (mg/ml). Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường BHI trong 16 - 24 giờ; sử dụng 3 đến 5 khóm khuẩn để pha huyền dịch có độ đục 0,5 McFarland, tương ứng với giá trị OD 600 nm từ 0,08 đến 0,12. Giá trị tương đương 10<sup>8</sup> CFU/ml.

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 4 mm, sử dụng 30 µl dịch thử cho mỗi lỗ. Ủ đĩa thạch trong tủ ấm ở 35 - 37 °C. Đọc kết quả sau 16 - 18

Received: Nov, 30<sup>th</sup>, 2019

Accepted: May, 18<sup>th</sup>, 2020

\*Corresponding Author

Email: hongle5792@gmail.com

giờ. Mẫu thử có tác động kháng khuẩn cho vòng ức chế xung quanh giếng chứa mẫu thử. Mẫu chứng âm là DMSO 10%.

**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 để được dãy nồng độ giảm dần. Thêm chính xác 1 ml dung dịch mẹ ở mỗi nồng độ trên, phân tán trong 19 ml môi trường MHA, cho vào hộp petri.

Vi khuẩn 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 nhỏ lên bản thạch ở những vị trí được đánh dấu sẵn. Ủ vi khuẩn ở 37 °C trong vòng 24 giờ.

Đọc kết quả, so với mẫu chứng DMSO 10% là dung môi pha chất thử nghiệm. MIC là nồng độ thấp nhất ức chế sự phát triển của vi sinh vật thử nghiệm.

**2.4. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa**

Hoạt tính chống oxy hóa được thử theo phương pháp đo quang với thuốc thử DPPH. Mẫu thử được hòa tan trong methanol. Thuốc thử DPPH được pha trong methanol ở nồng độ 0,5 mM, pha dùng trong ngày, bảo quản ở 4 °C.

**Bảng 1. Cách pha mẫu**

Mẫu	Dung dịch thử (ml)	Dung môi MeOH (ml)	Dung dịch DPPH (ml)
Trắng	0	4	0
Chứng	0	3	1
Thử	1	2	1

Mẫu được trộn theo tỷ lệ được trình bày ở bảng 1. Hỗn hợp được lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối 30 phút. Đo độ hấp thu ở bước sóng 517 nm. Thực hiện đồng thời mẫu trắng, mẫu chứng. Acid ascorbic được sử dụng làm chứng dương.

Khả năng ức chế DPPH được tính theo công thức sau:

$$\%IC = \frac{OD_{\text{Chứng}} - OD_{\text{Thử}}}{OD_{\text{Chứng}} - OD_{\text{Trắng}}} \cdot 100$$

Trong đó: OD<sub>chứng</sub>: độ hấp thu của mẫu đối chứng (không chứa cao chiết); OD<sub>thử</sub>: độ hấp thu của mẫu; OD<sub>trắng</sub>: độ hấp thu của mẫu trắng (methanol).

Xây dựng đường chuẩn y = ax + b với phần trăm ức chế DPPH ở các nồng độ khác nhau. Từ đó, tính giá trị IC<sub>50</sub> của acid ascorbic và các cao chiết.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**3.1. Hoạt tính kháng khuẩn**

**Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn**

Khả năng kháng khuẩn của mẫu thử được xác định dựa trên khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn trên đĩa petri.

Vòng kháng khuẩn của cao EA thể hiện rõ ở các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *Shigella*, *S. epidermidis* với đường kính

kháng khuẩn 10 - 16 mm. Còn đối với vi khuẩn *E. coli* có vòng kháng khuẩn < 9 mm, có hoạt tính kháng khuẩn yếu. Do đó, ở nồng độ 100 mg/ml cao EA có tác dụng kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *Shigella*, *S. epidermidis* (Bảng 2).

Tiếp tục thử nghiệm các hợp chất phân lập được từ cao EA. Các hợp chất flavonoid **1, 2, 3, 4**, không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên cả 4 chủng vi khuẩn. Hợp chất **6,7** lại cho hoạt tính kháng khuẩn trên 3 chủng vi khuẩn *S. aureus*, *Shigella*, *S. epidermidis* với đường kính kháng khuẩn từ (10-16 mm). Vậy ở nồng độ 10 mg/ml hợp chất **6,7** có hoạt tính kháng khuẩn trên chủng vi khuẩn *S. aureus*, *Shigella*, *S. epidermidis* (Bảng 2).

**Bảng 2. Kết quả sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn**

Mẫu thử	SA	S	SE	E	Mẫu thử	SA	S	SE	EC
EA	++	+	++	-	4	-	-	-	-
1	-	-	-	-	6	++	++	++	-
2	-	-	-	-	7	++	+++	++	-
3	-	-	-	-					

Chú thích :

- “+”: có hoạt tính kháng khuẩn yếu d < 9 mm
- “++”: có hoạt tính kháng khuẩn trung bình d: 10-14 mm
- “+++”: có hoạt tính kháng khuẩn mạnh d > 15 mm
- “-”: không có hoạt tính kháng khuẩn.
- SA: *Staphylococcus aureus*
- S: *Shigella*
- SE: *Staphylococcus epidermidis*
- EC: *Escherichia coli*

**Xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC)**

Cao EA sẽ được pha theo dãy nồng độ 5; 10; 20 và 40 (mg/ml). Kết quả trong 3 chủng vi khuẩn, cao EA ức chế *Shigela* ở nồng độ thấp nhất với MIC 500 µg/ml.

Hợp chất tanin Davidiin (7) ức chế ở cả 3 chủng vi khuẩn với nồng độ thấp hơn so với acid gallic (6) với MIC 500 µg/ml.

**Bảng 3. Kết quả xác định MIC cao EA và các hợp chất**

Mẫu thử	MIC (µg/ml)		
	SA	S	SE
EA	1000	500	1000
6	1000	1000	1000
7	500	500	500

Kết quả nghiên cứu cho thấy tác dụng kháng khuẩn của cao EA không mạnh, hoạt tính kháng khuẩn của cao EA do hợp chất tanin có trong cao chiết, đặc biệt hợp chất Davidiin đã phân lập được. Trong các công trình đã công bố trước đó, tác giả Zakaria (2010) và cộng sự đã khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao phân đoạn ethylacetat (EA)

từ lá Trứng cá [5]. Kết quả tác dụng kháng khuẩn của cao EA trên chủng vi khuẩn *S. aureus* (MIC 156 µg/ml) cao hơn so với kết quả của nghiên cứu này (MIC 500 µg/ml). Sufian (2012) và cộng sự đã thử hoạt tính kháng khuẩn của cao phân đoạn petrolium ether, ethyl acetat và nước của lá Trứng cá trên chủng vi khuẩn MSSA, MRSA [6]. Cao ethyl acetat cho hoạt tính mạnh nhất (MIC = 156 µg/ml), từ đó nhóm nghiên cứu đã phân lập các hợp chất từ phân đoạn ethyl acetat. Kết quả có hợp chất 2',4'-dihydroxychalcon hoạt tính kháng khuẩn với MIC 50 µg/ml, 100 µg/ml trên hai chủng vi khuẩn MSSA, MRSA. Hợp chất 2',4'-dihydroxychalcon có MIC nhỏ hơn nhiều so với acid gallic, davidiin (MIC=1000 µg/ml; 500 µg/ml).

### 3.2. Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa được thực hiện bằng phương pháp quang phổ với thuốc thử DPPH theo cơ chế dập tắt gốc tự do. Các chất nghiên cứu có tác dụng chống oxy hóa sẽ làm giảm màu của thuốc thử DPPH. Thuốc thử DPPH sẽ chuyển từ màu tím sang màu vàng. Xác định sự giảm màu qua sự thay đổi độ hấp thụ tại bước sóng 517 nm.

Giá trị IC<sub>50</sub> càng nhỏ thì hoạt tính chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu càng mạnh. Giá trị IC<sub>50</sub> (3,13 µg/ml) của cao EA nhỏ hơn IC<sub>50</sub> (4,30 µg/ml) của acid ascorbic nên cao EA có hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn acid ascorbic theo phương pháp DPPH. Các chất phân lập được từ cao EA trừ hợp chất kaempferol, tillirosid, tất cả đều có hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn acid ascorbic. Đặc biệt hợp chất tanin davidiin có hoạt tính mạnh gấp 6 lần acid ascorbic. Hợp chất kaempferol 3-O-(6''-O-galloyl)-β-D-glucopyranosid (3) quercetin (4), acid gallic (6) có hoạt tính mạnh 2,5 lần acid ascorbic. Hợp chất tillirosid (2) có hoạt tính chống oxy hóa yếu (IC<sub>50</sub> > 1 mg/ml). (Bảng 4).

**Bảng 4.** Giá trị IC<sub>50</sub> của cao EA và các hợp chất

Mẫu thử	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µmol/ml)
EA	3,13	-
1	7,84	27,41
2	-	-
3	5,70	9,50
4	2,73	9,04
6	1,59	9,35
7	3,78	4,03
Acid ascorbic	4,30	24,43

## 4. KẾT LUẬN

Về hoạt tính kháng khuẩn, kết quả thử nghiệm cho thấy cao EA cho tác dụng ức chế 3 chủng vi khuẩn *S. aureus*, *Shigella*, *S. epidermidis*. Tuy nhiên, khả năng ức chế vi khuẩn của cao EA còn khiêm tốn, cần sử dụng các cao ở nồng độ cao (MIC=1000 µg/ml), nên việc ứng dụng vào thực tế không hiệu quả.

Về hoạt tính chống oxy hóa với thuốc thử DPPH, cao EA và hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa tốt, mạnh hơn acid ascorbic theo phương pháp DPPH. Đặc biệt là hợp chất Davidiin vừa cho hoạt tính kháng khuẩn vừa có hoạt tính chống oxy hóa (MIC =500 µg/ml, IC<sub>50</sub> = 1,59 µg/ml).

## 5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam tập 2*, Nhà xuất bản Y học, 75.
- [2] Mahmood N. D. et al., *Muntingia calabura*: A review of its traditional uses, chemical properties, and pharmacological observations, *Pharmaceutical Biology*. 2014, 52 (12), 1598-1623.
- [3] Lê Thị Thu Hồng, Võ Văn Lẹo, Chiết xuất, phân lập một số flavonoid từ lá Trứng cá *Muntingia calabura* L. Muntingiaceae, *Tạp chí Dược học*, 2019, 504, 54-56.
- [4] Lê Thị Thu Hồng, Võ Văn Lẹo, Nghiên cứu thành phần hóa học từ lá Trứng cá, *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 2019, 504, 54-56.
- [5] Zakaria Z. et al., *In vitro* antimicrobial activity of *Muntingia calabura* extracts and fractions, *African Journal of Microbiology Research*. 2010, 4 (4), 304-308.
- [6] Sufian A. S. et al., Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of *Muntingia calabura* L., *Journal of ethnopharmacology*. 2013, 146 (1), 198-204.