

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA CAO CHIẾT SÂM XUYỀN ĐÁ (*MYXOPYRUM SMILACIFOLIUM* (WALL.) BLUME) TRÊN MỘT SỐ VI KHUẨN KHÁNG KHÁNG SINH

PRELIMINARY STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SAM XUYEN DA EXTRACTS (*MYXOPYRUM SMILACIFOLIUM* (WALL.) BLUME) ON ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA

Bùi Thị Tho^{1*}, Nguyễn Thị Đông Hằng²

¹Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng, Đà Nẵng, Việt Nam

²Trường THPT Hoà Vang, Đà Nẵng, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: bttho@ued.udn.vn

(Nhận bài / Received: 26/04/2023; Sửa bài / Revised: 23/01/2024; Chấp nhận đăng / Accepted: 25/01/2024)

Tóm tắt - Sâm Xuyên Đá (*Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume) (MS) là một loài sâm quý của Việt Nam. Theo nhiều nghiên cứu, MS chứa nhiều hoạt chất liên quan đến khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống béo phì, giảm đường huyết, hạ mỡ máu. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động kháng khuẩn của cao chiết ethanol củ MS (MSE) trên 5 chủng vi khuẩn kháng kháng sinh. Kết quả cho thấy, MSE ở các nồng độ khác nhau từ 100 đến 800 mg/ml có hiệu quả ức chế rất thấp đến trực khuẩn *E. coli* và *S. paucimobilis*. Ngược lại, MSE lại có tác động ức chế mạnh lên 3 chủng vi khuẩn kháng rộng *S. aureus*, *B. cepacia* và *P. aeruginosa* (đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt đạt 27,83 mm; 24,83 mm và 18,83mm tại nồng độ 800 mg/ml). *B. cepacia*, *S. aureus* và *P. aeruginosa* đều có giá trị MIC 12,5mg/ml và MBC 50mg/ml. *S. paucimobilis* và *E. coli* có MIC tại 25mg/ml. *S. paucimobilis* có MBC tại 100mg/ml; *E. coli* có MBC tại 200mg/ml.

Từ khóa - *Myxopyrum smilacifolium*; sâm Xuyên Đá; kháng khuẩn; kháng kháng sinh.

1. Đặt vấn đề

Cây sâm Xuyên Đá (*Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume) (MS) có tên gọi khác là Nhung lê kim cang, sâm Đá, Xuyên phá thạch. MS là loài thảo dược quý hiếm trong dân gian, một số báo cáo cho thấy nó chứa nhiều hoạt chất sinh học có ích trong điều trị bệnh. Theo nghiên cứu của Vijayalakshmi và Ruckmani, lá của MS có chứa terpenoid, flavonoid, saponin, tanin, glycosid và iridoid, trong dịch chiết nước MS đã xác định được 26 hợp chất [1]. Ngoài ra, MS còn được chứng minh chứa một số thành phần như polysaccharide, saponin, flavonoid và có hoạt tính sinh học liên quan đến khả năng chống oxy hóa, chống béo phì, giảm đường huyết, hạ mỡ máu và kháng khuẩn [2].

Hiện nay, vấn đề kháng kháng sinh đã ảnh hưởng rất lớn đến việc kiểm soát và điều trị các bệnh truyền nhiễm trong cộng đồng và tại các cơ sở y tế trong nước. Ngoài ra, tình trạng kháng kháng sinh cũng đang gây ra những ảnh hưởng nghiêm trọng trên toàn cầu. Theo thống kê, mỗi năm trên thế giới có khoảng 700.000 người tử vong do kháng thuốc [3]. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), đến năm 2050, cứ 3 giây lại có một người chết vì siêu vi khuẩn

Abstract - Sam Xuyen Da (*Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume) (MS) is a precious Vietnamese plant species. According to studies, MS contains many active ingredients related to antioxidants, antibacterial, antiobesity, blood sugar-lowering, and blood fat-lowering. This study investigated the antibacterial effect of the MS root ethanol extract (MSE) on five strains of antibiotic-resistant bacteria. The results showed that MSE at a concentration of 100-800 mg/ml lowly inhibited the development of *E. coli* and *S. paucimobilis* bacteria. In contrast, MSE has strongly inhibited three multidrug-resistant strains, including *S. aureus*, *B. cepacia*, and *P. aeruginosa* (the antibacterial ring diameter reached 27.83 mm; 24.83 mm and 18.83 mm respectively at the 800 mg/ml concentration). *B. cepacia*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* had MIC values of 12.5 mg/ml and MBC values of 50 mg/ml. *S. paucimobilis* and *E. coli* had MICs at 25mg/ml. *S. paucimobilis* has MBC at 100mg/ml; *E. coli* has MBC at 200mg/ml.

Key words - *Myxopyrum smilacifolium*; Sam Xuyen Da; antibacterial; multidrug resistant.

kháng thuốc, xấp xỉ khoảng 10 triệu người mỗi năm. Việt Nam được Tổ chức Y tế Thế giới liệt kê là một trong những quốc gia có tỷ lệ kháng kháng sinh cao nhất thế giới [3]. Một số vi sinh vật ngày càng kháng kháng sinh như *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella*, lần lượt kháng các loại kháng sinh methicillin, vancomycin, β -lactam phổ rộng, penicillin và một số kháng sinh khác [4]. Ở Việt Nam, nhiễm khuẩn bệnh viện chủ yếu do vi sinh vật kháng kháng sinh và thuộc một trong ba trường hợp sau: đa kháng thuốc, kháng thuốc rộng, và toàn kháng. Theo các báo cáo có thể xác định được một số vi khuẩn kháng kháng sinh phổ biến bao gồm *Staphylococcus* kháng methicillin, *Enterococcus faecium* kháng lại vancomycin, *Klebsiella pneumoniae* và *Enterobacter spp.* sinh ESBL/KPC/AmpC kháng lại carbapenem, *Acinetobacter baumannii* và *Pseudomonas aeruginosa* cũng là các chủng đa kháng thuốc [5].

Trong phạm vi thí nghiệm này, tác động kháng khuẩn của MSE đối với 5 chủng vi khuẩn phổ biến ở bệnh viện đã được nghiên cứu, bao gồm: *S. aureus*, *B. cepacia*, *E. coli*,

¹ The University of Danang - University of Science and Education, Danang, Vietnam (Bui Thi Tho)

² Hoa Vang High School, Danang, Vietnam (Nguyen Thi Dong Hang)

S. paucimobilis, *P. aeruginos*. Nghiên cứu này nhằm chứng minh giá trị dược liệu quý của thảo dược Việt Nam thông qua khảo sát tác dụng kháng vi sinh vật của MSE.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- *Nguyên liệu thực vật*: Bộ phận củ của cây MS được thu hái tại xã Sinh Long, huyện Na Hang, tỉnh Tuyên Quang.

- *Vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ)*: nghiên cứu sử dụng 4 chủng vi khuẩn Gram âm: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. paucimobili*, và 1 chủng Gram dương *S. aureus*. VSVKĐ được cung cấp bởi Bệnh viện Ung Bướu Đà Nẵng.

2.2. Chuẩn bị cao chiết

Mẫu củ MS được rửa sạch dưới vòi nước chảy, sàng lọc để loại bỏ những rễ non, rễ hư hỏng. Tiếp theo, củ được thái lát mỏng và sấy khô. Sau đó, được đem nghiền mịn và rây qua lưới có kích thước 0,5mm.

Bột củ MS được chiết với dung môi ethanol 70° sử dụng phương pháp đun hồi lưu, thời gian và nhiệt độ đun hồi lưu lần lượt 3 tiếng và 70°C. Dung dịch sau đun được cô đặc bằng máy cô quay chân không (Stuart RE 400, Mỹ), điều kiện cô quay được điều chỉnh ở 90 bar, 55°C, trong 1 giờ 50 phút. Cao đặc được sấy khô ở nhiệt độ 60°C, trong thời gian 72 giờ, sau đó bảo quản lạnh ở -4°C.

Để tiến hành các thí nghiệm, cao chiết được hoà tan trong DMSO 0,5% và pha loãng trong nước cất vô trùng với các nồng độ cao khác nhau từ 100-800mg/l.

2.3. Phương pháp nuôi cấy vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ) được pha loãng ở nồng độ 10^6 CFU/ml và trải đều lên bề mặt thạch MHA. Các lỗ kích thước đường kính 3 mm được đục trên bề mặt thạch ở mỗi đĩa petri. Lần lượt nhỏ 100µl dịch cao chiết MSE ở các nồng độ 100 - 800 mg/ml và đối chứng DMSO 0,5% vào mỗi lỗ thạch. Đối chứng (kháng sinh) đặt ở trung tâm đĩa; Imipenem (Im) và Ampicillin/sulbactam (As) cho *S.aureus*, Clindamycin (cL) và Ceftazidime (Cz) cho *B. cepacia*, Meropenem (Me) và Imipenem (Im) cho *P. aeruginosa*, Meropenem (Me) và Imipenem (Im) cho *E. coli*, Piperacillin (Pt) và Cefotaxime (Ct) cho *S. paucimobilis*.

Đĩa petri sau cấy được đặt vào tủ lạnh trong 5 giờ để kháng sinh và cao chiết khuếch tán đều vào môi trường thạch. Tiếp tục chuyển đĩa thạch sang tủ ấm (Memmert IN55, Đức) ở 37°C trong 24 đến 48 giờ. Kết quả được đọc sau 24 giờ nuôi cấy. Lặp lại 3 lần với mỗi thí nghiệm.

2.4. Phương pháp làm kháng sinh đồ

Mỗi đĩa giấy chứa kháng sinh với nồng độ quy định theo tiêu chuẩn CLSI được cung cấp bởi công ty TNHH Thương mại và dịch vụ Nam Khoa. Thí nghiệm này sử dụng phương pháp kháng sinh đồ để xác định mức độ đề kháng kháng sinh của VSVKĐ dùng trong nghiên cứu.

Kháng sinh đồ sử dụng các loại kháng sinh được cung cấp bởi Công ty TNHH và Thương mại Dịch vụ Nam Khoa, bao gồm: Amoxicillin 20µg (Ac), Ampicillin 10µg (Am), Amikacin 30µg (Ak), Colistin 10µg (Co), Cefuroxime 30µg (Cu), Ceftriaxone 30µg (Cx),

Cefoperazone 30µg (Cs), Ciprofloxacin 30µg (Ci), Cefepime 30µg (Cm), Cefotaxime 30µg (Ct), Clindamycin 2µg (cL), Cefoxitin 30µg (Cn), Erythromycin 15µg (Er), Ertapenem 10µg (En), Imipenem 10µg (Im), Levofloxacin 5µg (Lv), Netilmicin 30µg (NI), Meropenem 10µg (Me), Vacomycin 30µg (Va), Piperacillin 100µg (Pt).

Các VSVKĐ khác nhau được cấy dần đều trên các đĩa thạch MHA với nồng độ 10^6 CFU/ml. Sau đó, đặt các đĩa kháng sinh trên bề mặt thạch, đặt đĩa petri trong tủ lạnh khoảng 5 giờ để kháng sinh khuếch tán đều ra môi trường thạch. Ủ đĩa petri trong tủ ấm (Memmert IN55, Đức) ở 37°C. Kết quả được ghi nhận sau 24 giờ.

Biện luận kết quả kháng sinh đồ dựa theo mẫu biện luận được cung cấp bởi Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa – mẫu được biên soạn dựa trên tài liệu M100-Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Informational Supplement. 2019, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [6, 7].

2.5. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Khảo sát khả năng kháng VSVKĐ của MSE bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch [8]. Khả năng kháng VSVKĐ của cao chiết được xác định dựa trên đường kính vòng ức chế VSV (ĐK) của cao chiết. Công thức tính ĐK vòng ức chế VSV: ĐK (mm) = D – d, trong đó D là ĐK vòng ức chế VSV, d là ĐK đục lỗ (nơi chứa dịch cao chiết hoặc ĐK đĩa giấy kháng sinh) [8].

2.6. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

Dùng pipet lấy 50µl dịch VSVKĐ nồng độ 10^6 CFU/ml nhỏ lần lượt vào 8 giếng chứa môi trường MHA lỏng, thêm vào 50µl dịch MSE ở các nồng độ pha loãng khác nhau từ 3,125-200 mg/ml vào 8 giếng trên. Giếng đối chứng chứa dịch VSVKĐ và môi trường MHA. Giếng đối chứng âm chứa cao chiết MSE và môi trường MHA. Ủ qua đêm ở 37°C. Sau 24 giờ, thêm vào mỗi giếng 30µl chất chỉ thị màu resazurin pha loãng 0,015%. Ủ ở 37°C, theo dõi và ghi nhận sự thay đổi màu sắc ở mỗi giếng. Ghi nhận giá trị tại giếng có nồng độ thấp nhất trong dãy thử nghiệm không có sự đổi màu resazurin, giá trị MIC được xác định bằng ½ nồng độ cao chiết tại giếng đó. Tiếp tục xác định MBC bằng phương pháp trải đĩa. Lấy 100µl dung dịch trong các giếng ở trên mà không có sự đổi màu bởi resazurin, cấy dần đều dung dịch đó lên các đĩa thạch rắn MHA, ủ đĩa trong tủ ấm 37°C, ghi nhận sự xuất hiện khuẩn lạc sau 24 giờ. MBC của cao chiết được ghi nhận tại nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm không xuất hiện khuẩn lạc [9].

3. Kết quả và thảo luận

Nghiên cứu này nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của MSE trên 5 loại VSVKĐ khác nhau. Hoạt tính kháng khuẩn của MSE được đánh giá ở các dãy nồng độ từ thấp đến cao (100, 200, 400, 600, 800 mg/ml) trên 4 chủng Gram âm: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. paucimobili*, *B. cepacia*, và 1 chủng Gram dương *S. aureus*. Tác động kháng VSVKĐ được thể hiện thông qua việc đo đường kính vòng vô khuẩn.

3.1. Kết quả kháng sinh đồ

VSVKĐ được cung cấp bởi bệnh viện và lưu tại phòng

thí nghiệm Vi sinh vật Khoa Sinh – Môi trường. Nhóm tác giả tiến hành đánh giá mức độ kháng kháng sinh của 5 chủng VSVKĐ thông qua phương pháp kháng sinh đồ. Kết quả đo đường kính vòng vô khuẩn được so sánh với mẫu biến loạn kháng sinh đồ cung cấp bởi công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Nam Khoa để đưa ra kết luận.

Kết quả cho thấy, trong số 14 kháng sinh thử nghiệm, *S. aureus* kháng với 8 loại kháng sinh bao gồm Ct, Am, Cf, cL, En, Va, Ge, Ak và kháng trung bình với 2 loại kháng sinh gồm: Pt, NI. *B. cepacia* kháng với 12 loại kháng sinh bao gồm Im, Cm, Cx, Cu, cL, Lv, Co, Cz, Ge, En, As, Bt. *P. aeruginosa* kháng với 11 loại kháng sinh bao gồm Co, Pt, Me, As, Im, Cu, Cx, Cm, Ci, Ct, Cf và kháng trung bình với 2 loại kháng sinh gồm: Ak, NI. *E. coli* kháng với 9 loại kháng sinh bao gồm Ci, Cx, Cu, Cm, Ct, Ak, Co, Pt, As và kháng trung bình với 1 kháng sinh Lv. *S. paucimobilis* kháng với 9 loại kháng sinh bao gồm Va, Cz, Ge, Ak, cL, Am, Ct, Cf, En, và kháng trung bình với 2 loại kháng sinh gồm: Im, Pt.

Như vậy, cả 5 chủng VSVKĐ đều là chủng đa kháng. Các VSVKĐ kháng kháng sinh được ký hiệu lần lượt là Sa8 (*S. aureus*), Bc12 (*B. cepacia*), Pa11 (*P. aeruginosa*), Ec9 (*E. coli*), Sp9 (*S. paucimobili*) và được lưu mẫu tại Phòng Công nghệ Vi sinh vật, Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng.

3.2. Tác dụng ức chế của MSE lên VSVKĐ

VSVKĐ *S. aureus* trong thí nghiệm này là vi khuẩn đa kháng, kháng lại 10 loại thuốc kháng sinh hiện hành. Khả năng kháng VSVKĐ *S. aureus* của MSE được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1. Kết quả chỉ ra rằng, MSE có tác động kiềm chế *S. aureus* ở tất cả các nồng độ cao (100 mg/ml đến 800 mg/ml). Hiệu quả kháng *S. aureus* của cao chiết tỷ lệ thuận với chiều tăng của nồng độ cao. Đường kính vòng ức chế có giá trị cao nhất 27,67mm và thấp nhất đạt 20,83mm lần lượt ở nồng độ cao 800 mg/m và 100 mg/ml. Bên cạnh đó, đường kính vòng ức chế của Imipenem (kháng sinh đối chứng âm) chỉ 12,33mm và Ampicillin/sulbactam (kháng sinh đối chứng dương) đạt 26,33 mm. Kết quả này chứng tỏ khả năng kháng *S. aureus* của cao MSE là khá mạnh khi so sánh với hai loại kháng sinh đối chứng.



Hình 1. Khả năng kháng *S. aureus* của MSE.

MSE ức chế sinh trưởng *S. aureus* tại các nồng độ (1) 800 mg/ml, (2) 600 mg/ml, (3) 400 mg/ml, (4) 200 mg/ml, (5) 100 mg/ml, (6) DMSO 0,5%, (7) Imipenem (Im)

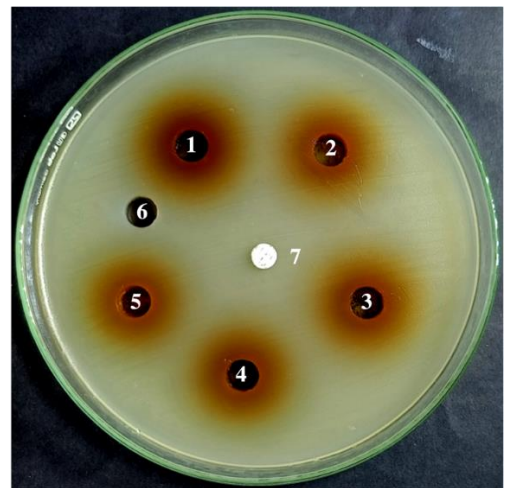
Bảng 1. Tác dụng kháng *Staphylococcus aureus* của MSE

Đối chứng	MSE (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
-	800	27,67±5,42
-	600	26,67±5,42
-	400	24,00±4,02
-	200	22,00±2,90
-	100	20,83±2,40
DMSO 0,5%	-	0
Imipenem (Im)	-	12,33±6,03
Ampicillin/sulbactam (As)	-	26,33±2,89

VSVKĐ *B. cepacia* là chủng vi khuẩn đa kháng, kháng lại 12 loại thuốc kháng sinh. Trong thí nghiệm này, 2 loại bao gồm kháng sinh nhạy là Ceftazidime (Cz) và kháng sinh bị kháng Clindamycin (cL) được sử dụng làm đối chứng.

Bảng 2. Khả năng kháng *B. cepacia* của MSE

Đối chứng	MSE (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
-	800	24,83±1,94
-	600	24,00±1,94
-	400	23,83±2,50
-	200	22,67±2,50
-	100	21,83±2,04
DMSO 0,5%	-	0
Clindamycin (cL)	-	0
Ceftazidime (Cz)	-	22,00±0,58



Hình 2. Khả năng kháng *B. cepacia* của MSE.

MSE ức chế *B. cepacia* ở các nồng độ (1) 800 mg/ml, (2) 600 mg/ml, (3) 400 mg/ml, (4) 200 mg/ml, (5) 100 mg/ml, (6) DMSO 0,5%, (7) Clindamycin (cL)

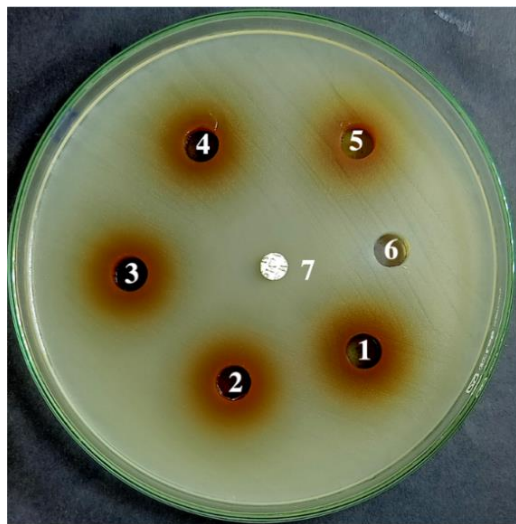
Tác động kháng *B. cepacia* của MSE được trình bày ở Bảng 2 và Hình 2. Kết quả chỉ ra rằng MSE có hiệu quả ức chế *B. cepacia* ở tất cả các nồng độ cao khảo sát (100 mg/ml - 800 mg/ml). Tác động kháng *B. cepacia* tăng dần khi nồng độ cao tăng. Với nồng độ MSE cao nhất, đường kính vòng ức chế cũng đạt giá trị cao nhất 24,83mm. Bên cạnh đó, vòng ức chế của hai kháng sinh đối chứng Ceftazidime là 22,00mm và Clindamycin là 0mm. Kết quả này cho thấy, MSE có hiệu quả kháng mạnh đến sinh trưởng của *B. cepacia* kháng thuốc. Và khả năng kháng *B. cepacia* mạnh tương đương với kháng sinh nhạy Ceftazidime đang dùng điều trị *B. cepacia* hiện nay.

VSVKĐ *P. aeruginosa* được xác định là vi khuẩn đa kháng, kháng lại 13 loại thuốc kháng sinh. 2 loại bao gồm kháng sinh nhạy là Meropenem (Me) và kháng sinh bị kháng là Imipenem (Im) được sử dụng làm đối chứng với MSE.

Khả năng kháng *P. aeruginosa* của MSE được thể hiện ở Bảng 3 và Hình 3. Cao chiết MSE có tác động kiềm chế *P. aeruginosa* ở tất cả các nồng độ được khảo sát (100 mg/ml - 800 mg/ml). Hiệu quả kháng *P. aeruginosa* được thể hiện qua đường kính vòng ức chế, nồng độ cao chiết tăng thì đường kính vòng ức chế cũng tăng. Tại nồng độ MSE 800 và 100mg/ml, vòng ức chế lần lượt đạt 19,83mm và 13,33mm. Bên cạnh đó, Meropenem (đối chứng dương) có đường kính vòng vô khuẩn đạt 31,33mm và Imipenem (đối chứng âm) là 4,67mm. Kết quả này thể hiện MSE tuy có hiệu quả ức chế nhưng không mạnh lên sự sinh trưởng của *P. aeruginosa*, và thấp hơn nhiều so với kháng sinh nhạy Meropenem điều trị hiện hành.

Bảng 3. Tác động kháng *P. aeruginosa* của MSE

Đối chứng	MSE (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
-	800	19,83±4,40
-	600	19,00±4,40
-	400	18,75±1,91
-	200	16,83±4,42
-	100	13,33±1,21
DMSO 0,5%	-	0
Meropenem (Me)	-	31,33±0,58
Imipenem (Im)	-	4,67±1,15



Hình 3. Tác động kháng *P. aeruginosa* của MSE. MSE ức chế *P. aeruginosa* ở các nồng độ (1) 800 mg/ml, (2) 600 mg/ml, (3) 400 mg/ml, (4) 200 mg/ml, (5) 100 mg/ml, (6) DMSO 0,5%, (7) Meropenem (Me)

Bảng 4 và Hình 4 thể hiện khả năng kháng VSVKĐ *E. coli* của MSE. Số liệu cho thấy MSE có tác động ức chế rất yếu lên *E. coli* ở tất cả các nồng độ cao khảo sát. Khi nồng độ MSE tăng dần, đường kính vòng vô khuẩn cũng tăng theo, tuy nhiên giá trị đạt rất thấp, chỉ dao động từ 3,83 – 9,17mm. Kháng sinh đối chứng dương Meropenem có vòng vô khuẩn đạt 28,33 mm và Imipenem đạt 12,00mm.

Bảng 4. Tác động kháng *E. coli* của MSE

Đối chứng	MSE (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
-	800	9,17±0,98
-	600	6,00±0,98
-	400	5,33±1,76
-	200	4,33±1,63
-	100	3,83±1,17
DMSO 0,5%	-	0
Meropenem (Me)	-	28,33±3,06
Imipenem (Im)	-	12,00±3,61



Hình 4. Khả năng kháng *E. coli* của MSE. MSE ức chế *E. coli* ở các nồng độ (1) 800 mg/ml, (2) 600 mg/ml, (3) 400 mg/ml, (4) 200 mg/ml, (5) 100 mg/ml, (6) DMSO 0,5%, (7) Meropenem (Me)

Khả năng kháng *S. paucimobilis* của MSE được trình bày qua Bảng 5 và Hình 5. Đường kính vòng vô khuẩn cho thấy, MSE có khả năng ức chế yếu *S. paucimobilis* ở các nồng độ 100 mg/ml đến 800 mg/ml. Khi nồng độ cao chiết tăng dần, đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 7,17 – 9,75mm. Đối chứng dương Piperacillin cho đường kính vòng vô khuẩn 18,33mm và đối chứng âm Cefotaxime là 4,00mm. Với kết quả trên, có thể nhận thấy MSE có hiệu quả ức chế *S. paucimobilis* khá yếu so với kháng sinh hiện hành.

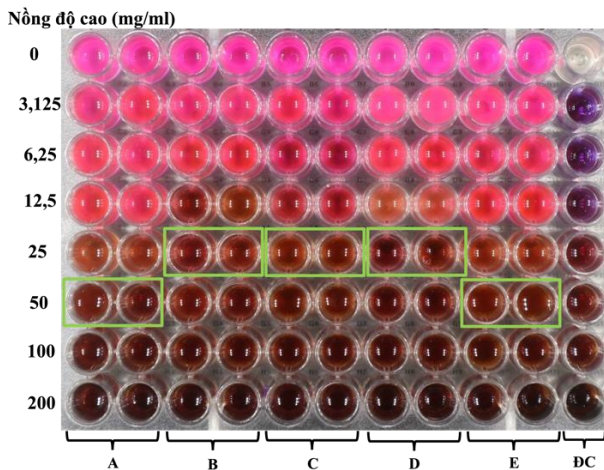


Hình 5. Khả năng kháng *S. paucimobilis* của MSE. MSE ức chế *S. paucimobilis* ở các nồng độ (1) 800 mg/ml, (2) 600 mg/ml, (3) 400 mg/ml, (4) 200 mg/ml, (5) 100 mg/ml, (6) DMSO 0,5%, (7) Piperacillin (Pt)

Bảng 5. Khả năng kháng *S. paucimobilis* của MSE

Đối chứng	MSE (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
-	800	9,75±2,72
-	600	8,83±2,27
-	400	8,75±1,24
-	200	8,00±0,95
-	100	7,17±0,82
DMSO 0,5%	-	0
Piperacillin (Pt)	-	18,33±1,53
Cefotaxime (Ct)	-	4,00±2,00

Hình 6 và Bảng 6 thể hiện nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của MSE lên các VSVKĐ. Để xác định MIC, dung dịch resazurin 0,015% được sử dụng làm chất chỉ thị màu. Dung dịch resazurin được thêm vào các giếng thí nghiệm, ban đầu có màu xanh tím, trong môi trường có sự hoạt động của vi sinh vật resazurin sẽ bị khử do enzyme tiết ra bởi VSV và chuyển sang dạng resorufin có màu hồng [9]. Như vậy, tại các giếng MSE ức chế VSVKĐ, môi trường sẽ không xuất hiện sự đổi màu của resazurin. Trong dãy nồng độ thử nghiệm, ghi nhận nồng độ thấp nhất không có sự thay đổi màu sắc của thuốc thử resazurin, giá trị MIC được xác định bằng ½ nồng độ cao tại giếng có nồng độ cao thấp nhất không đổi màu. Tại các giếng không xuất hiện sự thay đổi màu sắc của resazurin, lấy 100µl dung dịch cấy lên các đĩa môi trường thạch MHA để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC). MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy cao chiết có khả năng tiêu diệt toàn bộ VSVKĐ, đồng nghĩa với việc không xuất hiện khuẩn lạc nào trên bề mặt thạch MHA. Mỗi nồng độ MSE được bố trí trên 2 giếng, 1 giếng cuối cùng là đối chứng âm không có VSVKĐ.

**Hình 6.** Xác định giá trị MIC của MSE trên 5 chủng VSVKĐ

A: *S. paucimobilis*; B: *B. cepacia*; C: *P. aeruginosa*;
D: *S. aureus*; E: *E. coli*; ĐC: MSE + MHA

Bảng 6. Giá trị MIC và MBC của MSE trên 5 loại VSVKĐ

VSVKĐ	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	12,5	50
<i>B. cepacia</i>	12,5	50
<i>P. aeruginosa</i>	12,5	50
<i>E. coli</i>	25	200
<i>S. paucimobilis</i>	25	100

Kết quả ở Hình 6 cho thấy, các giá trị MIC được xác định bằng ½ giá trị tại các ô được đánh dấu khung xanh lá cây (ô không đổi màu resazurin). Như vậy, ba chủng VSVKĐ *B. cepacia*, *S. aureus* và *P. aeruginosa* đều có MIC tại nồng độ cao 12,5mg/ml. Hai chủng *S. paucimobilis* và *E. coli* có MIC tại nồng độ cao 25mg/ml. MBC được xác định tại nồng độ không xuất hiện khuẩn lạc trên đĩa thạch. Ba chủng *B. cepacia*, *S. aureus* và *P. aeruginosa* đều có MBC tại nồng độ cao 50mg/ml. *S. paucimobilis* có MBC tại nồng độ cao 100mg/ml. *E. coli* có MBC tại nồng độ cao 200mg/ml.

Việc khảo sát MIC/MBC nhằm cung cấp cái nhìn cụ thể hơn về mức độ ức chế của cao MSE lên VSVKĐ. Tương ứng với kết quả khảo sát đường kính vòng kháng khuẩn, các giá trị MIC/MBC đã cung cấp số liệu cụ thể hơn về tác động ức chế mạnh trên 3 chủng *B. cepacia*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* và ức chế yếu trên 2 chủng *S. paucimobilis* và *E. coli*. Gill và Holley cho rằng, các nhóm hoạt chất kháng khuẩn phân lập từ cao chiết thực vật như polyphenol, alkaloid và terpenoid đã có tác dụng ức chế enzyme sinh tổng hợp amino acid của vi khuẩn hoặc ức chế sự tương tác với các nhóm protein hay enzyme trên màng tế bào vi khuẩn gây ra sự chết tế bào (apoptosis) [10].

4. Bàn luận

Tình trạng kháng kháng sinh trong ngành y tế và chăn nuôi đã trở nên báo động tại Việt Nam và trên toàn thế giới. Vi sinh vật luôn không ngừng tiến hoá để thích nghi nhanh chóng với môi trường mới, điều này gây khó khăn cho việc tìm các loại thuốc kháng sinh mới để điều trị. Hiện nay, việc điều trị nhiễm khuẩn ở bệnh viện, các cơ sở y tế trong và ngoài nước phải đối mặt với nhiều khó khăn do các đối tượng vi sinh vật gây bệnh đột biến thành các chủng kháng kháng sinh như: đa kháng, kháng rộng và toàn kháng. Trong bối cảnh đó, việc tìm kiếm các nguồn thảo dược có hoạt tính kháng vi sinh vật đang rất được quan tâm nhờ tính hiệu quả và an toàn.

Trong thí nghiệm này, MSE được đánh giá khả năng kháng khuẩn trên 5 chủng vi khuẩn bệnh viện phổ biến bao gồm *S. aureus*, *B. cepacia*, *E. coli*, *S. paucimobilis* và *P. aeruginosa*.

Kết quả thu được trong 5 chủng VSVKĐ khảo sát, cao chiết MS đã có hiệu quả tiêu diệt mạnh lên sự sinh trưởng của 3 chủng bao gồm: vi khuẩn tụ cầu vàng *S. aureus*, *B. cepacia* và *P. aeruginosa*. Đáng lưu ý, *S. aureus* là chủng tụ cầu đa kháng, tức là kháng lại 8/14 thuốc kháng sinh trong thí nghiệm kháng sinh đồ. Tương tự, *B. cepacia* cũng là chủng đa kháng, kháng lại 12 loại kháng sinh. *P. aeruginosa* kháng 11 loại kháng sinh. Ở nồng độ cao khảo sát cao nhất (800 mg/ml) đường kính vòng kháng khuẩn của *S. aureus* đạt 27,83mm; *B. cepacia* đạt 24,83mm và *P. aeruginosa* đạt 19,83mm. Các chỉ số này tương đương với đường kính vòng kháng khuẩn của kháng sinh nhạy với *S. aureus* là Ampicillin/sulbactam (26,33mm) và kháng sinh nhạy với *B. cepacia* là Ceftazidime (22,00mm). Riêng với *P. aeruginosa* có đường kính vòng ức chế tuy cao (19,83mm) nhưng vẫn thấp hơn nhiều so với kháng sinh đối chứng Meropenem (31,33mm). Với những kết quả thu được, MS có thể được xem là một loại thảo dược tiềm năng dùng để phòng trị các

bệnh liên quan đến VSV đa kháng như trực khuẩn *B. cepacia*, trực khuẩn mũ xanh *P. aeruginosa* và vi khuẩn tụ cầu vàng *S. aureus*.

Tuy nhiên, MS lại có hiệu quả ức chế thấp hơn trên 2 chủng *S. paucimobilis* và trực khuẩn *E. coli* trong số 5 chủng VSVKĐ.

Cho đến nay, chỉ có 1 nghiên cứu khác về hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất rễ cây MS. Theo nghiên cứu của Lưu Hồng Sơn và cộng sự, cao polysaccharit phân lập từ rễ MS có khả năng ức chế không mạnh lên sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn gây bệnh bao gồm *B. subtilis*; *E. coli*; *S. aureus* K; *S. aureus*; *S. flexneri*; *S. spp* và *P. pseudomonas spp.*; đường kính vòng kháng khuẩn trên các VSV lần lượt là 8,01; 18,06; 8,03; 6,84; 15,33; 9,39 và 10,13mm [11]. Kết quả của nghiên cứu này có sự tương đồng với kết quả của tác giả Lưu Hồng Sơn về khả năng ức chế yếu của cao chiết MS lên *E. coli*. Nhưng có sự khác nhau về mức độ tác động của cao chiết lên *S. aureus* và *P. spp*. Kết quả của nhóm tác giả cho thấy tác động của cao chiết tổng lên *S. aureus* đa kháng là khá cao (20,83-27,67mm). Trong khi kết quả của tác giả Lưu Hồng Sơn và cộng sự cho thấy, tác động của cao chiết polysaccharit tổng lên *S. aureus* K và *S. aureus* thì thấp hơn (8,01 và 18,06mm). Tương tự với *P. aeruginosa*, khả năng tác động của cao chiết tổng trong thí nghiệm này lên *P. aeruginosa* (13,33 -19,83mm) cao hơn so với cao chiết polysaccharit (9,39mm). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này nhóm tác giả sử dụng các chủng vi sinh đa kháng kháng sinh, nên việc so sánh kết quả giữa hai nghiên cứu chỉ mang tính tương đối bởi thành phần cao chiết khác nhau và đối tượng VSVKĐ ở cũng khác nhau.

5. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy:

- Cao chiết ethanol củ MS trong phạm vi nồng độ 100 mg/ml - 800 mg/ml có hiệu quả ức chế mạnh mẽ lên trực khuẩn *B. cepacia*, tụ cầu vàng *S. aureus* và trực khuẩn mũ

xanh *Pseudomonas aeruginosa* đa kháng.

- Cao chiết ethanol củ MS trong phạm vi nồng độ 100 mg/ml - 800 mg/ml có hiệu quả ức chế yếu vi khuẩn *S.s paucimobilis* và trực khuẩn *E. coli*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Vijayalakshmi and K. Ruckmani, "Ferric Reducing Anti-Oxidant Power Assay in Plant Extract", *Bangladesh Journal of Pharmacology*, vol. 11, no. 3, pp.570-572, 2016.
- [2] D. T. K. Hoa, L. H. Son, N. T. Tinh, T. T. Luong, and N. X. Binh, "Study on the Process of Tea Bags Leaves Myxopyrum Smilacifolium (Wall.) Blume Thai Nguyen Province", *Journal of Tan Trao University*, no. 22, pp. 64-70, 2021.
- [3] J. J. O'Neill, *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nation*, Review on Antimicrobial Resistance, 2014.
- [4] J. Conly, "Antimicrobial resistance in Canada", *Canadian Medical Association journal*, vol. 167, no. 8, pp. 885-891, 2002.
- [5] P. H. Van, "Antibiotic resistance and current antibiotic resistance mechanisms", *Ho Chi Minh City Journal of Science*, no. 03, pp. 37-42, 2017.
- [6] P. T. Binh and P. H. Van, *Antibiogram argument form*, Nam Khoa Trade Production & Service Company Limited, 2019.
- [7] P. H. Van and P. T. Binh, *Antibiotics - Antibiotic resistance - Antibiogram techniques - Common basic problems*, Medical Publishing House, 2013.
- [8] F. Hadacek and H. Greger, "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice", *Phytochem Anal.*, vol. 11, no. 3, pp. 137-147, 2000.
- [9] E. Mohamed, A. Syed, F. Scott, D. Paul, M. G. Mark, M. Roger, and M.B. Ibrahim, "Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants", *Biotechnology letter*, vol. 38, no. 6, pp. 1015-1019, 2016.
- [10] A. O. Gill and R. A. Holley, "Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics", *International journal of food microbiology*, vol. 108, no. 1, pp. 1-9, 2006.
- [11] L. H. Son, V. T. Hanh, N. T. Tinh, T. T. Luong, D. T. K. Hoa, and N. X. Binh, "Optimization of parameters in polysaccharide extraction and bioactive analysis from *Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) blume roots", *Vietnam journal of Agricultural Sciences*, vol. 19, no. 6, pp. 829-839, 2021.