

TỔNG HỢP XANH NANO BẠC SỬ DỤNG CAO CHIẾT LÁ VỎI VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG VI KHUẨN TỤ CẦU VÀNG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING CLEISTOCALYX OPERCULATUS (ROXB.) MERR. ET PERRY EXTRACTS AND INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ngô Thái Bích Vân, Phan Thế Anh*

Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng, Việt Nam¹

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: ptanh@dut.udn.vn

(Nhận bài / Received: 30/4/2024; Sửa bài / Revised: 10/6/2024; Chấp nhận đăng / Accepted: 12/6/2024)

Tóm tắt - Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả thực hiện tổng hợp các hạt nano bạc từ tiền chất dung dịch $AgNO_3$ sử dụng cao chiết từ lá Vối làm tác nhân khử. Đồng thời, hệ nhũ tương gồm cao phân ethyl acetate của lá Vối và dung dịch muối bạc cũng được thử nghiệm trong phản ứng tạo hạt nano. Sự hình thành các hạt nano bạc được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM), đo phổ nhiễu xạ tia X (XRD) và thế Zeta. Các kết quả phân tích cho thấy, hạt nano bạc tổng hợp có kích thước khoảng 20-70 nm. Đồng thời, các hạt nano bạc này có khả năng ức chế vi khuẩn tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 2,39 – 4,78 $\mu g/ml$. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tiềm năng ứng dụng của công nghệ nano xanh trong lĩnh vực điều trị bệnh nhiễm khuẩn.

Từ khóa - Nano bạc; *Cleistocalyx operculatus*; tổng hợp xanh; kháng khuẩn

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, nano bạc (AgNPs) đang ngày càng được quan tâm nghiên cứu, và ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như điện tử, cảm biến sinh học, máy lọc nước gia đình, mỹ phẩm do có khả năng kháng khuẩn [1]. Điều chế nano bạc có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau như sử dụng các tác nhân hóa học, vật lý hay sinh học. Với phương pháp hóa học thường hay sử dụng các chất khử như hydrazin, natri borohydride... những chất này gây ảnh hưởng đến môi trường nên khó ứng dụng khi mở rộng quy mô sản xuất [2]. Phương pháp tổng hợp xanh (green synthesis) hiện đang là phương pháp nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học.

Là một công nghệ mới trong lĩnh vực tổng hợp nano, phương pháp tổng hợp xanh sử dụng các dịch chiết từ dược liệu cho thấy nhiều tiềm năng và ưu thế vì chi phí thấp, hoạt tính sinh học của hạt nano được tổng hợp cao và qui trình thực hiện đơn giản, thân thiện với môi trường. Trong phương pháp này, các hợp chất sinh học như flavonoid, alkaloid, phenolic,... trong thực vật đóng vai trò vừa là tác nhân khử ion Ag^+ thành Ag, vừa có các hoạt tính sinh học mong muốn và cũng là chất ổn định cho các hạt AgNPs tạo thành [3]. Đã có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước thực hiện tổng hợp AgNPs bằng cách sử dụng dịch chiết từ trà xanh [1], từ củ nghệ tươi [4], từ lá Dạ Lý Hương [5], hay từ lá diếp cá [6]. Các AgNPs này cũng được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa.

Abstract - In this study, silver nanoparticles (AgNPs) were produced from $AgNO_3$ precursor solution utilizing water extract as a reducing agent. Simultaneously, the emulsion system consisting of ethyl acetate fraction of *Cleistocalyx operculatus* leaves and silver salt solution was examined in the nanoparticle creation process. The formation of silver nanoparticles was observed using scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) spectroscopy, and Zeta potential. The results demonstrate that, the synthesized AgNPs are approximately 20-70 nm in size. These nanoparticles can inhibit *Staphylococcus aureus* at a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.39 - 4.78 $\mu g/ml$. The findings of the study suggest that, green nanotechnology could be applied to infectious disease treatment.

Key words - Silver nanoparticle; *Cleistocalyx operculatus*; green synthesis; antimicrobial

Vối (*Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr et Perry) là cây thân gỗ thuộc họ Sim (Myrtaceae), được trồng nhiều ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam. Theo kinh nghiệm dân gian, nước lá Vối có tác dụng hỗ trợ điều trị rối loạn tiêu hóa, mỡ máu. Các cao chiết ethanol, methanol từ lá hoặc nụ Vối có tính kháng viêm, có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư, kháng virus [7], [8], [9]. Trong nghiên cứu gần đây của nhóm tác giả, cao chiết nước từ lá Vối thu hái tại Quảng Nam có hiệu quả ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn Gram dương *Listeria monocytogenes* và *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 3,125 mg/ml; Gram âm *Escherichia coli*, và *Salmonella* sp. với giá trị MIC lần lượt là 3,125 mg/ml; 6,25 mg/ml [10]. Bên cạnh đó, cao phân đoạn ethylacetate (EA) đã được chứng minh có hoạt tính kháng vi khuẩn tụ cầu vàng (*S.aureus* ATCC 6538) tốt nhất với giá trị MIC là 0,1 mg/ml và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) là 0,4 mg/ml [11].

Tụ cầu vàng *S.aureus* là một trong những tác nhân phổ biến nhất gây bệnh nhiễm trùng ở người, như nhiễm trùng da, viêm mô tế bào, áp xe, viêm phổi, viêm tủy xương, nhiễm trùng máu... Chủng vi khuẩn này hiện đang có tỉ lệ kháng lại kháng sinh cao do chúng có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm), và những cơ chế biến đổi khác nhằm tránh được các tác động của thuốc [12]. Vì vậy, hiện nay có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước tập trung tìm kiếm các nguồn dược liệu, hợp chất cũng như nhưng liệu

¹ The University of Danang - University of Science and Technology, Vietnam (Ngo Thai Bich Van, Phan The Anh)

pháp mới nhằm giảm thiểu tình trạng kháng thuốc trong lâm sàng.

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả sử dụng cao nước từ lá Vối kết hợp với dung dịch muối bạc nitrat để tổng hợp các hạt AgNPs. Đồng thời thử nghiệm tạo AgNPs từ chất khử cao phân đoạn EA thông qua việc tạo hệ nhũ tương sử dụng chất nhũ hóa Tween 40. Và đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn tụ cầu vàng *S.aureus* của các hạt nano được tổng hợp.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

2.1.1. Lá Vối

Lá Vối tươi được thu hái tại Điện Bàn, Quảng Nam [11]. Nguyên liệu được tuyển chọn kỹ càng, chỉ lấy những lá tươi xanh, khỏe, không bị sâu bệnh. Mẫu lá được sấy ở 50°C bằng máy sấy Memmert UFE 600 (Buechenbach, Đức), lược bỏ gân lá và nghiền nhỏ.

2.1.2. Hóa chất

Nước cất và cồn 70° được sử dụng làm dung môi cho quá trình chiết tách cao tổng. Các dung môi sử dụng để chiết tách cao phân đoạn được mua từ công ty Công ty hóa chất Xilong, Trung Quốc. Tiền chất bạc nitrate (AgNO_3) có độ tinh khiết $\geq 99,5\%$ được mua từ hãng hóa chất Sigma-Aldrich. Trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), ethyl acetate (EA), Tween 40 và một số hóa chất khác được mua từ công ty Công ty Xilong, Trung Quốc.

2.1.3. Chủng vi khuẩn

Vi khuẩn *S.aureus* được phân lập từ những nghiên cứu trước đây của nhóm [12]. 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.

2.2. Tổng hợp nano bạc bằng phương pháp hoá học

Mẫu nano bạc tổng hợp bằng phương pháp hoá học (CAgNPs) được sử dụng làm mẫu đối chứng cho mẫu nano bạc tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp xanh sử dụng dịch chiết lá Vối. Quy trình được thực hiện như sau: cân chính xác 1g chất khử $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ cho vào bình định mức 100 ml rồi thêm nước cất đến vạch. Lấy 11,12 ml dung dịch $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ đã chuẩn bị cho từ từ vào cốc đã chứa sẵn 88,88 ml AgNO_3 1mM đồng thời bật máy khuấy từ. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng lên 90°C và khuấy trong thời gian 30 phút. Hạ nhiệt hỗn hợp, lưu mẫu và quan sát sự biến đổi trong suốt quá trình tạo nano bạc [13], [14].

2.3. Qui trình chiết tách chất khử từ lá Vối

Chuẩn bị cao nước: Các bước thực hiện tương tự như mô tả trong nghiên cứu [10]. Cụ thể, bột lá Vối được ngâm dầm trong nước cất với tỉ lệ 1:50 (w/v) ở nhiệt độ phòng. Sau 1 ngày, tiến hành lọc và thu dịch chiết. Phần bột lá tiếp tục ngâm trong nước cất (lặp lại 2 lần). Tất cả dịch chiết được cô quay chân không 50 vòng/phút ở 60°C để loại bỏ hết nước. Cao thô thu được sau đó hòa tan trở lại trong nước theo các tỉ lệ khác nhau để đạt được nồng độ mong muốn.

Chuẩn bị cao phân đoạn EA: Quá trình thu nhận cao thô ethanol được tiến hành như mô tả trong nghiên cứu [11]. Cao thô ethanol được sử dụng để chiết tách phân đoạn trong dung môi ethyl acetate với tỉ lệ 1:5 (w/v) trong 24 giờ.

2.4. Tổng hợp nano bạc từ dịch chiết lá Vối

2.4.1. Tổng hợp nano bạc từ cao nước (WAgNPs)

Với cao nước, hai thí nghiệm đầu tiên được tiến hành để xác định khoảng nồng độ Ag thích hợp cho quá trình lưu trữ trong thời gian dài. Thí nghiệm 1 (TN1) lấy 66,5 ml dịch chiết nước lá Vối có nồng độ 1 mg/ml rồi nhỏ từ từ vào cốc có chứa 5 ml AgNO_3 1 mM. Tiến hành khuấy trộn, gia nhiệt và duy trì hỗn hợp phản ứng ở 90°C trong 30 phút. Thí nghiệm 2 (TN2) được thực hiện như TN1 nhưng lấy 0,5 ml dịch chiết nước lá Vối có nồng độ 1 mg/ml cho từ từ vào 45 ml AgNO_3 1 mM.

Sau khi đã xác định được nồng độ Ag thích hợp trong hỗn hợp sau cùng, tiến hành các thí nghiệm tương tự với các nồng độ khác nhau của dịch chiết nước lá Vối là: 10 mg/ml, 200 mg/ml, và 900 mg/ml. Tất cả các hỗn hợp sau phản ứng được bảo quản ở nhiệt độ phòng và quan sát các biểu hiện ngoại quan.

2.4.2. Tổng hợp nano bạc từ cao phân đoạn ethyl acetate (EAgNPs)

Với cao phân đoạn EA, các thí nghiệm được tiến hành bằng cách giữ nguyên nồng độ Ag trong hỗn hợp phản ứng như trong trường hợp của cao nước. Hệ phản ứng trong trường hợp này là hệ nhũ tương sử dụng chất nhũ hóa không ion Tween 40. Tỷ lệ thể tích pha nước/pha hữu cơ được giữ không đổi là 9/1. Thành phần nguyên liệu trong các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết và nồng độ chất nhũ hóa được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần nguyên liệu cho các thí nghiệm tổng hợp AgNPs từ cao phân đoạn EA

Tên mẫu	AgNO_3 1 mM (ml)	Tween 40 (g)	Thể tích cao phân đoạn EA (ml)	Nồng độ ban đầu của cao phân đoạn EA (mg/ml)
EA1	45	7,5	5	40
EA2	45	20	5	40
EA3	45	20	5	20

Trước hết lấy 45 ml AgNO_3 1 mM cho vào cốc có dung tích 200 ml và thêm vào đó chất nhũ hóa Tween 40. Hỗn hợp được khuấy trên máy siêu âm đầu dò ở chế độ 3 giây khuấy 1 giây nghỉ, biên độ sóng siêu âm 40%, trong vòng 5 phút. Khi hỗn hợp đã đồng nhất cho từ từ 5 ml cao phân đoạn EA vào đồng thời duy trì khuấy siêu âm thêm 25 phút. Nhiệt sinh ra từ quá trình khuấy siêu âm đủ để phản ứng diễn ra mà không cần tiến hành gia nhiệt, biểu hiện qua sự thay đổi màu sắc từ vàng nhạt sang nâu sẫm của hỗn hợp phản ứng. Bảo quản mẫu ở nhiệt độ phòng và quan sát sự thay đổi ngoại quan.

2.5. Đánh giá các tính chất hóa lý đặc trưng và khả năng kháng khuẩn

2.5.1. Xác định thế Zeta

Hỗn hợp sau phản ứng được gửi đi đo thế Zeta (ξ) trên máy SZ-100 của hãng Horiba Scientific tại trường Đại học Nha Trang. Các mẫu được giữ nguyên nồng độ ban đầu, không có sự pha loãng trong quá trình đo.

2.5.2. Xác định kích thước hạt nano

Kích thước AgNPs được xác định thông qua phép đo chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) trên thiết bị JEOL

JSM-6010 Plus/LV. Mẫu hạt được chuẩn bị bằng cách tiến hành ly tâm hỗn hợp sau phản ứng ở tốc độ 4500 vòng/phút, trong 15 phút. Rửa lại bằng nước cất 2 lần để loại bỏ tạp chất và các thành phần không phản ứng rồi đem đi sấy khô thu được dạng bột mịn. Mẫu bột được đo trực tiếp, không phún xạ bề mặt.

2.5.3. Xác định cấu trúc vật liệu

Cấu trúc của AgNPs được xác định bằng phép đo nhiễu xạ tia X (XRD) trên thiết bị Smartlab X-ray của Rigaku được kết nối với điện cực CuK α tại trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng.

2.5.4. Xác định khả năng kháng khuẩn của hạt nano

Quy trình kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn bằng đĩa giấy kháng sinh được thực hiện tương tự quy trình chuẩn của EUCAST[15]. Chủng vi khuẩn *S.aureus* sau khi tăng sinh trong môi trường Muller Hinton Broth (MHB) ở 37°C, 200 vòng/phút, được pha loãng để đạt độ đục tương ứng 0,5 Mc Farland (Nam Khoa). Hút 100 μ l dịch canh trường vi khuẩn sau pha loãng, cấy trải trên môi trường thạch Muller Hinton Agar (MHA). Khoanh giấy tròn đường kính 6 mm được tẩm 20 μ l các mẫu CAgNPs, WAgNPs và EAgNPs rồi lần lượt đặt lên trên mặt thạch. Trong các thí nghiệm này, chúng dương là kháng sinh Ampicilin 50 μ g/ml, chứng âm là nước hoặc Tween 40. Để yên đĩa trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C để các hạt nano có thể phân tán đều trên mặt thạch. Ủ đĩa ở 37°C trong 24 giờ và đo đường kính vòng vô khuẩn (ZOI – zone of inhibition).

$$\text{ZOI} = D - 6 \text{ (mm)}$$

Với D là đường kính vòng trong suốt quan sát được xung quanh khoanh giấy.

2.5.5. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration-MIC)

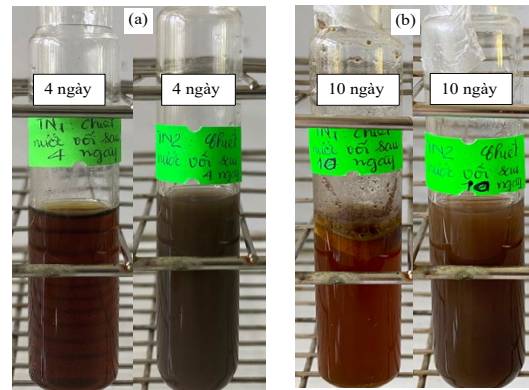
Hỗn hợp AgNPs được pha loãng bậc 2 từ nồng độ ban đầu. Dịch vi khuẩn được nuôi qua đêm và pha loãng đạt mật độ 10^6 CFU/ml. Cho vào mỗi giếng 50 μ l dịch vi khuẩn và 50 μ l dung dịch AgNPs ở các nồng độ pha loãng khác nhau. Ủ đĩa ở 37°C, 24 giờ. Bổ sung 30 μ l dung dịch chỉ thị Resazurin 0,015% (San Cruz, Mỹ) vào mỗi giếng. Giá trị MIC được xác định là giếng có nồng độ AgNPs thấp nhất và không làm đổi màu xanh của chất chỉ thị.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ bạc đến khả năng ổn định của hỗn hợp tạo thành

Từ các kết quả ở Hình 1, nhận thấy sau 4 ngày kể từ khi tổng hợp, cả hai mẫu ở thí nghiệm TN1 và TN2 vẫn có sự ổn định. Tuy nhiên, sang đến ngày thứ 10 thì mẫu ở TN1 có hiện tượng phân lớp, nổi mớ, trong khi mẫu ở TN2 vẫn ổn định và không nổi mớ. Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) của AgNPs có giá trị trong khoảng từ $2,82 \pm 0,68$ μ g/ml đến 90 ± 22 μ g/ml [16]. Trong hai thí nghiệm trên nồng độ bạc tương ứng là 7,55 μ g/ml (TN1) và 106,81 μ g/ml (TN2), đều nằm trong khoảng MIC của AgNPs, tuy nhiên có thể thấy nồng độ bạc cao hơn sẽ cho khả năng ổn định tốt hơn. Từ kết quả này cho phép xác định nồng độ bạc ở TN2 thích hợp cho việc ổn định hệ nano bạc đi từ dịch chiết nước Vôi và nồng độ này được sử dụng cho

các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Khả năng ổn định của AgNPs ở TN1 và TN2 sau thời gian a) 4 ngày, b) 10 ngày

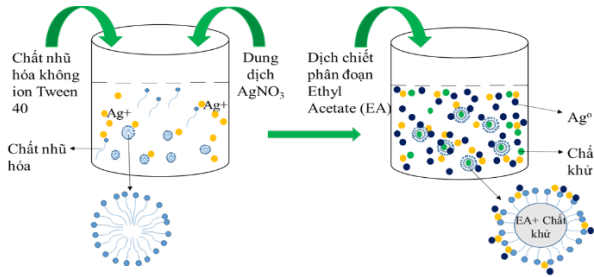
3.2. Nano bạc tổng hợp theo phương pháp hóa học xanh

Với nano bạc đi từ cao nước (WAgNPs) do dung dịch tiền chất AgNO $_3$ và cao nước có khả năng trộn lẫn với nhau nên dễ thu được nồng độ cao chiết trong hỗn hợp sau phản ứng có giá trị khảo sát là 0,1 mg/ml, 1,1 mg/ml, 2,2 mg/ml và 10 mg/ml thì nồng độ cao chiết ban đầu được chuẩn bị ở mức cao tương ứng là 1 mg/ml, 10 mg/ml, 200 mg/ml và 900 mg/ml. Trong dịch chiết nước, chất khử thường là các polysaccharide chiếm hàm lượng lớn hơn nhiều so với các hợp chất kháng khuẩn. Các thành phần chất khử này là nguồn dinh dưỡng cho vi sinh vật trong môi trường phát triển nếu nồng độ bạc không đủ lớn để ức chế sự phát triển của chúng. Với các mẫu thu được khi tăng dần nồng độ dịch chiết từ 1 mg/ml đến 900 mg/ml vẫn thể hiện sự ổn định trong quá trình bảo quản thời gian dài. Điều này một lần nữa khẳng định nồng độ bạc sử dụng trong nghiên cứu này là thích hợp cũng như cho thấy vai trò bảo vệ của bạc trước các quá trình phát triển của vi sinh vật.

Trong thực vật, các hợp chất nhóm flavonoid đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn mạnh [17]. Theo nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả, cao phân đoạn EA có tổng hàm lượng flavonoid cao, tương ứng $83,0 \pm 0,63$ mg quercetin/g (QE/g) [11]. Vì vậy, để kết hợp hoạt tính kháng khuẩn của nano bạc và nhóm flavonoid của lá Vôi, dịch chiết phân đoạn EA được sử dụng để thay thế cho dịch chiết nước trong khảo sát này. Với nồng độ ban đầu của cao EA là 20 mg/ml và 40 mg/ml tương ứng với nồng độ cao trong hỗn hợp phản ứng là 1,4 mg/ml và 2,8 mg/ml. Vì ethyl acetate và nước hòa tan hạn chế vào nhau nên sẽ xảy ra quá trình phân pha (pha nước-pha hữu cơ) làm cho quá trình tiếp xúc của các chất khử hòa tan trong ethyl acetate khó có thể khử ion bạc để tạo nên nano bạc. Hệ nhũ tương với chất nhũ hóa không ion là Tween 40 có khả năng phân tán ổn định ethyl acetate thành các micelle có kích thước nano trong pha nước liên tục [18]. Với hệ nhũ tương tạo thành diện tích bề mặt tiếp xúc giữa pha hữu cơ và pha nước tăng lên đáng kể làm thúc đẩy tốc độ và khả năng hình thành nano bạc. Cơ chế của quá trình tổng hợp trong pha nhũ tương có thể được đề xuất như Hình 2.

Khi có mặt của Tween 40 sẽ hình thành nên các micelle với các đầu phân cực ưa nước hướng ra ngoài và đầu kỵ nước hướng vào trong. Các đầu phân cực ưa nước có xu hướng lưu giữ Ag $^+$ tại bề mặt phân chia pha của

micelle. Sau khi dịch chiết EA được thêm vào thì ethyl acetate và các chất khử tan trong nó có xu hướng dịch chuyển và lưu giữ trong lòng của micelle. Chất khử trong lòng của micelle sẽ phản ứng với Ag^+ tại bề mặt phân pha để tạo các hạt nano bạc. Một phần chất khử cũng có thể nằm bên ngoài micelle, chúng tương tác với Ag^+ để tạo thành Ag^0 (Hình 2).



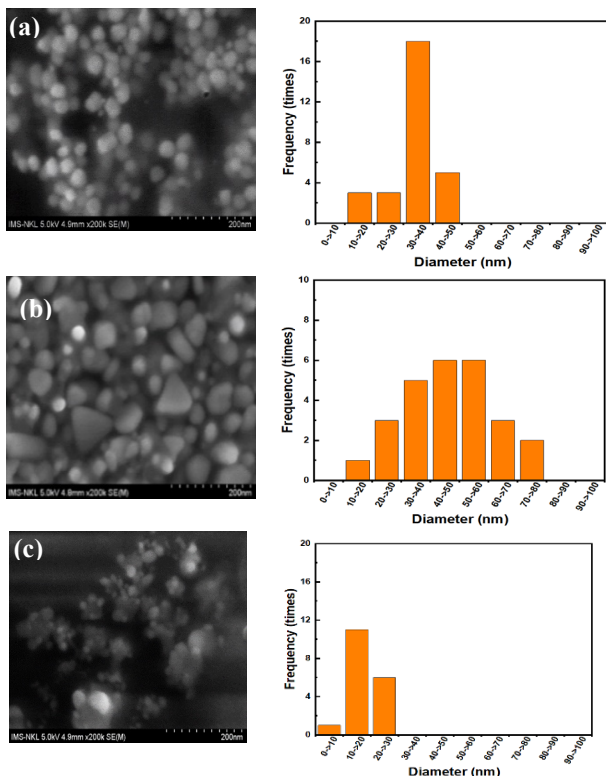
Hình 2. Cơ chế tổng hợp nano bạc bằng phương pháp nhũ tương

- Biểu thị ion Ag^+ trong dung dịch $AgNO_3$
- Biểu thị hạt nano Ag^0
- Biểu thị chất khử hiện diện trong dịch chiết

3.3. Đặc tính của AgNPs tổng hợp theo phương pháp hóa học xanh

3.3.1. Kích thước và sự phân bố kích thước hạt

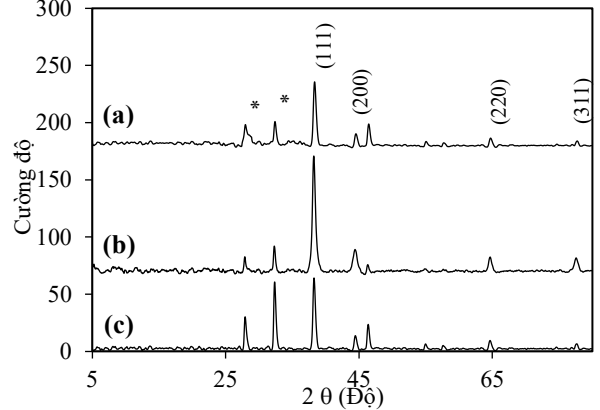
Hình 3 cho thấy, kích thước của mẫu nano bạc được tổng hợp bằng phương pháp hóa học có kích thước hạt đồng nhất hơn khoảng 30-40 nm; mẫu nano bạc được tổng hợp bằng dịch chiết nước Vôi ở nồng độ 200 mg/ml có nhiều hình dạng khác nhau và kích thước hạt lớn hơn khoảng 30-70 nm, cuối cùng là mẫu nano bạc tổng hợp bằng dịch chiết cao phân đoạn EA ở nồng độ 20 mg/ml có kích thước hạt nhỏ nhất khoảng 10-20 nm.



Hình 3. Ảnh SEM và biểu đồ phân bố kích thước hạt của mẫu: (a) CAgNPs, (b) WAgNPs và (c) EAgNPs

3.3.2. Phổ nhiễu xạ tia X (XRD)

Kết quả phổ nhiễu xạ tia X của các mẫu nano bạc được thể hiện trong Hình 4. Các đỉnh ở góc $2\theta = 38,1^\circ; 44,4^\circ; 64,2^\circ$ và $77,6^\circ$ trong phổ của dịch chiết nước và dịch chiết cao phân đoạn EA hoàn toàn trùng với phổ chuẩn của kim loại Ag, tương ứng với các mặt phẳng Bragg trong cấu trúc lập phương tâm mặt của tinh thể Ag lần lượt là (111), (200), (220), (311) [19]. Từ đó, có thể kết luận được sự có mặt của kim loại Ag trong hỗn hợp sau phản ứng hay nói cách khác Ag^+ đã bị khử và chuyển thành Ag kim loại. Ở vị trí góc 2θ quanh 28° có thể được xem là đỉnh kết tinh của pha hữu cơ có trong hỗn hợp bám xung quanh bề mặt AgNPs [20]. Kết quả XRD có thể khẳng định lại rằng các hạt nhìn thấy trên ảnh SEM ở Hình 3 chính là AgNPs.



Hình 4. Giảm nhiễu xạ tia X của các mẫu AgNPs: (a) Hóa học, (b) Dịch chiết nước, (c) Dịch chiết cao phân đoạn EA

3.3.3. Thế Zeta

Thế Zeta là một đại lượng quan trọng để đánh giá sự ổn định của hệ phân tán. Độ lớn của thế Zeta biểu thị mức độ tích điện bề mặt của pha phân tán, trong trường hợp này là các hạt nano bạc. Độ lớn của thế Zeta càng lớn hệ phân tán càng ổn định. Kết quả đo thế Zeta của các hệ nano bạc được tổng hợp trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đo thế Zeta

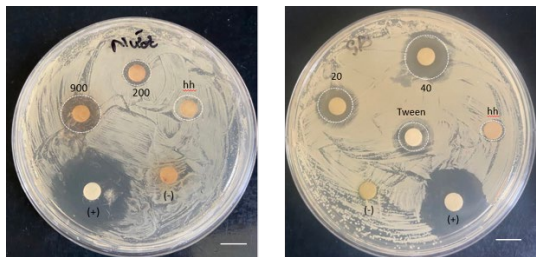
Mẫu	Thế Zeta (mV)
CAgNPs	-28,1
WAgNPs	-33,1
EAgNPs	0,3

Có thể thấy, mẫu nano bạc được tổng hợp từ dịch chiết nước vôi có độ ổn định cao hơn mẫu nano bạc hóa học. Như vậy, ngoài vai trò làm chất khử cho quá trình tổng hợp, có khả năng kháng khuẩn, các hợp chất có trong dịch chiết nước vôi còn đóng vai trò là chất ổn định ngăn cản hiện tượng sa lắng của AgNPs tạo thành. Mẫu nano bạc từ cao chiết EA có giá trị thế Zeta thấp là bởi vì Tween 40 là chất hoạt động bề mặt không ion. Khả năng ổn định của hệ nhũ tương này chủ yếu dựa vào độ nhớt của môi trường phân tán. Trong nghiên cứu này hàm lượng chất nhũ hóa được khảo sát ở hai mức 13% và 28% khối lượng dựa trên nghiên cứu [21]. Kết quả chỉ ra rằng, trong quá trình bảo quản, với hàm lượng 13% khối lượng chất nhũ hóa, hỗn hợp nano bạc tạo thành có xu hướng kết tụ lắng xuống đáy bình mặc dù rất khó quan sát bằng mắt. Trong khi đó, hỗn hợp với 28% chất nhũ hóa vẫn ổn định trong thời gian dài.

3.4. Khả năng ức chế vi khuẩn tụ cầu vàng *S.aureus* của các dung dịch AgNPs

3.4.1. Kết quả khuếch tán trên đĩa thạch

Để đánh giá khả năng kháng khuẩn của các hỗn hợp nano bạc tổng hợp xanh, nhóm tác giả sử dụng phương pháp đĩa giấy (disk diffusion method) như Hình 5. Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn (ZOI) được thể hiện ở Bảng 3.



Hình 5. Hiệu quả kháng khuẩn của các dung dịch AgNPs được tổng hợp xanh sử dụng cao chiết nước (trái) và cao phân đoạn EA (phải) của lá Vối làm tác nhân khử.

("+" chứng dương Ampicilin; "-" chứng âm là cao nước, cao EA lá Vối; "hh" Hạt nano bạc tổng hợp hóa học; "900, 200" nồng độ cao chiết nước lá Vối sử dụng; "40, 20" nồng độ cao phân đoạn EA lá Vối sử dụng)

Bảng 3. Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của các dung dịch AgNPs trên vi khuẩn *S.aureus*

CAGNPs	WAgNP – 200 mg/ml	WAgNP – 900 mg/ml	EAgNP – 20 mg/ml	EAgNP – 40 mg/ml	Tween 40
1,8 ± 0,1	3,3 ± 0,1	5,3 ± 0,2	7,9 ± 0,2	9,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3

Có thể nhận thấy, hoạt tính kháng khuẩn của các hỗn hợp nano bạc phụ thuộc vào loại chất khử và nồng độ chất khử sử dụng. Nồng độ cao tăng, hoạt tính kháng khuẩn tăng. Vối cùng nồng độ bạc sử dụng, EAgNPs có hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn WAgNPs và CAGNPs. Kết quả này là do các thành phần có hoạt tính kháng khuẩn cao trong phân đoạn EA. Bên cạnh đó, hạt EAgNPs có kích thước nhỏ hơn WAgNPs và AgNPs (Hình 3) nên có diện tích bề mặt riêng lớn hơn và khả năng khuếch tán cũng dễ dàng hơn dẫn đến làm tăng hoạt tính kháng khuẩn. Ảnh hưởng của chất nhũ hóa Tween 40 đến khả năng kháng khuẩn cũng được đánh giá trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, Tween 40 thể hiện tính kháng khuẩn không rõ rệt (đường kính vòng kháng chỉ 1,8 ± 0,3 mm).

3.4.2. Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

MIC là nồng độ thấp nhất của chất thử nghiệm ức chế sự phát triển của vi khuẩn có thể nhìn thấy được sau 18-24 giờ nuôi cấy. Để có thể khẳng định về khả năng ức chế vi khuẩn của các dung dịch AgNPs tổng hợp được, nhóm tác giả tiến hành xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu MIC dựa vào sự thay đổi màu sắc của chất chỉ thị resazurin trên đĩa 96 giếng. Ban đầu, dung dịch resazurin có màu xanh, khi bị khử bởi các enzyme trong tế bào vi khuẩn sẽ tạo thành resorufin, có màu hồng [22]. Trong khảo sát này, nồng độ bạc ban đầu trong các mẫu thử đều bằng 76,5 µg/ml. Thực hiện pha loãng bậc 2 các mẫu thử và ghi nhận giá trị MIC là nồng độ thấp nhất của dung dịch hạt nano tại giếng không làm thay đổi màu xanh của thuốc thử.

Tương tự như kết quả khuếch tán đĩa thạch, hạt nano

EAgNP có giá trị MIC thấp nhất, cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn *S.aureus* của dung dịch này tốt hơn so với các hạt nano WAgNP và CAgNP (Bảng 4). Asghar MA và cộng sự đã sử dụng cao chiết nước lá Trâm vối (*Syzygium cumini*), một loại cây cùng họ với Vối để tổng hợp các hạt nano bạc, và xác định giá trị MIC trên *S.aureus* là 8 µg/ml [23]. Khi dùng dịch chiết phân đoạn EA, những hợp chất có khả năng tan tốt trong ethyl acetate không chỉ đóng vai trò là tác nhân khử để tạo nano bạc mà còn đóng vai trò là chất kháng khuẩn. Trong các nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh các cao lá Vối chiết xuất trong dung môi hữu cơ có hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn khi sử dụng dung môi nước [10], [24].

Bảng 4. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu MIC của các dung dịch AgNPs trên vi khuẩn *S.aureus*

	CAGNP	WAgNP	EAgNP
MIC (µg/ml)	38,25	4,78	2,39

4. Kết luận

Cao chiết nước và cao phân đoạn EA từ lá Vối có thể sử dụng để làm tác nhân khử cho quá trình tổng hợp nano bạc. Các hạt nano bạc tạo thành từ cao chiết nước có kích thước 30-70 nm, trong khi đi từ cao phân đoạn EA có kích thước nhỏ hơn khoảng 20 nm. Sự hình thành của các hạt nano bạc đã được khẳng định bằng phổ XRD. Hoạt tính kháng vi khuẩn tụ cầu vàng *S.aureus* của các hạt nano này cũng đã được chứng minh bằng phương pháp đĩa giấy và giá trị MIC. Các hoạt chất có trong cao phân đoạn EA thể hiện tiềm năng to lớn trong các ứng dụng kháng khuẩn. Nghiên cứu cũng là tiền đề cho việc sử dụng nano bạc để thay thế hoặc giảm liều lượng kháng sinh trong việc điều trị các bệnh do nhóm vi khuẩn này gây ra.

Lời cảm ơn: Bài báo này được tài trợ bởi đề tài nghiên cứu có mã số B2024.DNA.08.

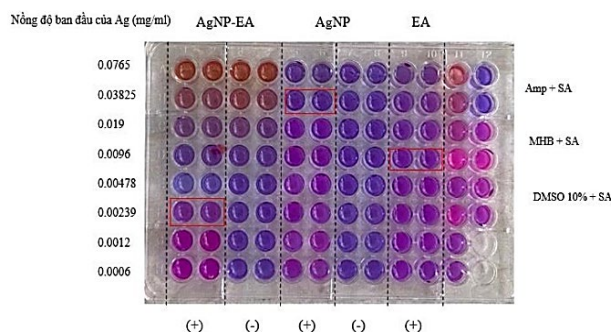
TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Fang *et al.*, "Green synthesis of nano silver by tea extract with high antimicrobial activity", *Inorganic Chemistry Communications*, vol. 132, p. 108808, 2021, doi: 10.1016/j.inoche.2021.108808.
- [2] H. D. Thuan, N. V. Cuong, L. T. T. Hong, T. T. Thao, N. T. N. Quynh, and C. V. Du, "Green synthesis of silver nanoparticles using herbal extract (*Piper betle*, *Muntingia Calabura*)", *Journal of Science of Lac Hong University*, vol. 49, no. 01, pp. 79–84, 2021, doi: 10.46242/jstih.v49i01.1644.
- [3] N. Liaqat, N. Jahan, K. Rahman, T. Anwar, and H. Qureshi, "Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay", *Frontiers in Chemistry*, vol. 10, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.952006.
- [4] V. V. Q. Bao, L. T. K. Anh, and N. T. P. Nga, "Synthesis of silver nanoparticles using extracts from fresh turmeric (*Curcuma Longa* L.) and its antibacterial activity against *Vibrio Parahaemolyticus*", *HUAF Journal of Agricultural Science & Technology*, vol. 6, no. 2, pp. 3050–3057, 2022, doi: 10.46826/huaf-jasat.v6n2y2022.952.
- [5] A. K. Keshari, R. Srivastava, P. Singh, V. B. Yadav, and G. Nath, "Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*", *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, vol. 11, no. 1, pp. 37–44, 2018, doi: 10.1016/j.jaim.2017.11.003.
- [6] T. N. M. An, "Green synthesis of silver nanoparticles from *Houttuynia cordata* leaves extract and AgNO₃", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, vol. 32, pp. 188–192, 2016.

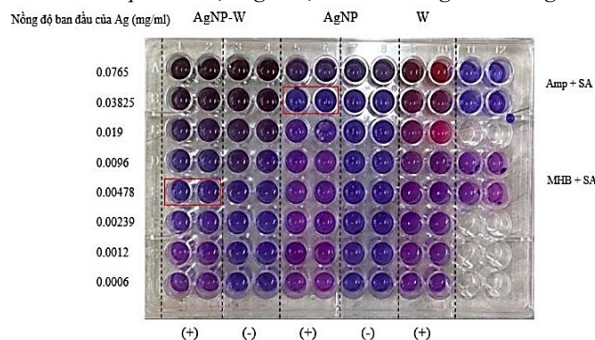
- [7] H. N. Tuan, B. H. Minh, P. T. Tran, and J. H. Lee, "The Effects of 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'- dimethylchalcone from *Cleistocalyx operculatus* Buds on Human Pancreatic Cancer Cell Lines", *Molecules*, vol. 24, no. 2538, pp. 1–11, 2019.
- [8] P. L. Tran *et al.*, "Protective effects of extract of *Cleistocalyx operculatus* flower buds and its isolated major constituent against LPS-induced endotoxic shock by activating the Nrf2/HO-1 pathway", *Food Chem. Toxicol.*, vol. 129, no. December 2018, pp. 125–137, 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.04.035.
- [9] T. T. Dao *et al.*, "C-methylated flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* leaves and their inhibitory effects on novel influenza A (H1N1) neuraminidase", *J. Nat. Prod.*, vol. 73, no. 10, pp. 1636–1642, 2010, doi: 10.1021/np1002753.
- [10] N. T. B. Van, P. T. T. Anh, and T. T. T. Hien, "To investigate antimicrobial activity of crude extract of *Cleistocalyx operculatus* leaves and initially make souble powder", *The University of Danang - Journal of Science and Technology.*, vol. 19, no. 5, pp. 44–47, 2021.
- [11] N. T. B. Van, D. T. T. Thao, H. T. Trung, and P. T. V. Phu, "In vitro antibacterial activity of the fractions from *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry against *Staphylococcus aureus*", *The University of Danang - Journal of Science and Technology*, vol. 21, No. 6.1. pp. 56-60, 2023.
- [12] N. T. B. Van *et al.*, "In vitro antibacterial activity of *Ampelopsis cantoniensis* extracts cultivated at Danang against clinically isolated *Staphylococcus aureus*", *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 227, no. 10, pp. 235–242, 2022.
- [13] K. Gudikandula and S. C. Maringanti, "Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties", *Journal of Experimental Nanoscience.*, vol. 11, no. 9, pp. 714–721, 2016, doi: 10.1080/17458080.2016.1139196.
- [14] S.S. Balu, C. Bhakat, and S. Harke, "Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antimicrobial activity", *International Journal of Engineering Research & Technology* vol. 4, no. 10, pp. 111–113, 2013, doi: 10.7897/2230-8407.041024.
- [15] E. Matuschek, D. F. J. Brown, and G. Kahlmeter, "Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories", *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20, no. 4, pp. O255–O266, 2014, doi: 10.1111/1469-0691.12373.
- [16] N. P. Panpaliya *et al.*, "In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria", *Saudi Dental Journal.*, vol. 31, no. 1, pp. 76–83, 2019, doi: 10.1016/j.sdentj.2018.10.004.
- [17] G. N. Pham, T. Thanh, T. Nguyen, and H. Nguyen-ngoc, "Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of *Syzygium nervosum*", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* vol. 2020, 2020, doi.org/10.1155/2020/8263670
- [18] H. Gao, H. Yang, and C. Wang, "Controllable preparation and mechanism of nano-silver mediated by the microemulsion system of the clove oil", *Results in Physics.*, vol. 7, pp. 3130–3136, 2017, doi: 10.1016/j.rinp.2017.08.032.
- [19] A. R. Allafchian, S. Z. Mirahmadi-Zare, S. A. H. Jalali, S. S. Hashemi, and M. R. Vahabi, "Green synthesis of silver nanoparticles using *Phlomis* leaf extract and investigation of their antibacterial activity", *Journal of Nanostructure in Chemistry.*, vol. 6, no. 2, pp. 129–135, 2016, doi: 10.1007/s40097-016-0187-0.
- [20] R. Sathyavathi, M. B. Krishna, S. V. Rao, R. Saritha, and D. Narayana Rao, "Biosynthesis of silver Nanoparticles using *Coriandrum Sativum* leaf extract and their application in nonlinear optics", *Advanced Science Letters*, vol. 3, no. 2, pp. 138–143, 2010, doi: 10.1166/asl.2010.1099.
- [21] R. D. Rivera-Rangel, M. P. González-Muñoz, M. Avila-Rodriguez, T. A. Razo-Lazcano, and C. Solans, "Green synthesis of silver nanoparticles in oil-in-water microemulsion and nano-emulsion using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent", *Colloids and Surfaces A* vol. 536, no. July 2017, pp. 60–67, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.07.051.
- [22] C. H. Teh, W. A. Nazni, A. H. Nurulhusna, A. Norazah, and H. L. Lee, "Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay", *BMC Microbiology*, vol. 17, no. 1, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1186/s12866-017-0936-3.
- [23] M. A. Asghar, E. Zahir, M. A. Asghar, J. Iqbal, and A. A. Rehman, "Facile, one-pot biosynthesis and characterization of iron, copper and silver nanoparticles using *Syzygium cumini* leaf extract: As an effective antimicrobial and aflatoxin B1 adsorption agents", *PLoS One*, vol. 15, no. 7, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0234964.
- [24] N. T. Dung, J. M. Kim, and S. C. Kang, "Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 12, pp. 3632–3639, 2008, doi: 10.1016/j.fct.2008.09.013.

PHỤ LỤC

Hình ảnh thí nghiệm xác định giá trị MIC thể hiện ở Bảng 4



Hình S1. Kết quả xác định giá trị MIC của EAgNP và CagNP



Hình S2. Kết quả xác định giá trị MIC của WAgNP và CagNP