

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT TỪ RỄ CÂY CÒ SEN (*Milium velutinum*)

Trần Chí Linh¹, Đái Thị Xuân Trang¹, Phạm Khánh Nguyễn Huân¹,
Võ Thị Tú Anh¹, Lưu Thái Danh², Trần Thanh Mến^{1*}

¹ Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Các hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm và ức chế enzyme (α -amylase; α -glucosidase) của cao chiết từ rễ cây Cò Sen đã được thực hiện để đánh giá triển vọng của loại cây này như là một nguồn dược liệu tự nhiên có tiềm năng điều trị bệnh. Cao chiết được ly trích bằng ethanol cho thấy sự hiện diện của các thành phần hóa học như alkaloid, flavonoid, glycoside, tannin, mang lại kết quả đầy hứa hẹn trong tất cả các thử nghiệm đã thực hiện. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết rễ cây Cò Sen được đánh giá bằng nhiều phương pháp và kết quả cho thấy có tác dụng kháng oxy hóa tốt. Việc đánh giá khả năng kháng khuẩn cho thấy hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* và *Staphylococcus aureus*. Hơn nữa, cao chiết đã chứng minh hoạt tính kháng viêm phụ thuộc vào nồng độ, với giá trị IC_{50} là $73,78 \pm 3,45 \mu\text{g/mL}$. Các hoạt động ức chế enzyme α -amylase, α -glucosidase được đánh giá và so sánh với chất chuẩn acarbose. Cao chiết rễ cây Cò Sen có khả năng ức chế α -amylase với giá trị IC_{50} là $1274,62 \pm 27,99 \mu\text{g/mL}$ và α -glucosidase với IC_{50} là $121,44 \pm 3,09 \mu\text{g/mL}$. Kết quả đã chứng minh rằng cao chiết từ rễ cây Cò Sen có thể là một nguồn dược liệu tự nhiên quan trọng với khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm, và có tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase.

Từ khóa: α -amylase, α -glucosidase, Cò Sen, kháng khuẩn, kháng oxy hóa, kháng viêm.

GIỚI THIỆU

Thực vật đóng vai trò quan trọng như là tác nhân trị liệu nhiều bệnh hiệu quả và tiết kiệm (Balunas, Kinghorn, 2005). Xu hướng sử dụng thuốc tự nhiên và liệu pháp thảo dược ngày càng tăng (Sharifi-Rad *et al.*, 2014). Nhiều hợp chất tự nhiên trong thực vật cho thấy khả năng kháng khuẩn, kháng oxy hóa, kháng nấm, kháng ung thư và kháng viêm đã được chứng minh (Rad *et al.*, 2014). Chính vì vậy, việc nghiên cứu và sàng lọc một số hoạt tính sinh học của các loài thực vật là một việc làm cần thiết, mang đến nhiều giá trị thiết thực phục vụ cho sức khỏe của con người. Chi *Milium* là chi thực vật có hoa, thuộc họ Annonaceae, bao gồm khoảng 50 loài được tìm thấy trong các khu rừng mưa nhiệt đới (Chaowasku, Keßler, 2013). Một số loài thuộc chi *Milium* đã được nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học. Các thành phần hóa học của chi *Milium* đã cho thấy sự hiện diện của alkaloid, acetogenin, terpenoid, các dẫn xuất homogentisic geranylated acid, flavonoid, bicyclic lactone và dimeric styrylpyrone (Wongsa *et al.*, 2011). Các hợp chất này đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn, kháng sốt rét, kháng virus, gây độc tế bào và ức chế enzyme acetylcholinesterase (Wongsa *et al.*, 2011). Trong những loài thuộc chi *Milium* thì cây Cò Sen (*Milium velutinum*) là một loại cây thân gỗ, lâu năm và thường được sử dụng trong Y học dân gian để điều trị ghê lở, bệnh ngoài da, hắc lào, mụn nhọt, đau dạ dày và rất có hiệu quả trong việc điều trị các bệnh liên quan đến viêm. Dựa trên những công bố về thành phần hóa học của chi *Milium* cũng như những tác dụng dược lý trong dân gian, thì việc nghiên cứu hoạt tính sinh học của rễ cây Cò Sen sẽ cung cấp những cơ sở khoa học đáng tin cậy cho hoạt tính sinh học của loài cây này. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá các hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm và kháng đại thực bào đường *in vitro* của cao chiết từ rễ cây Cò Sen.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương tiện

Rễ cây Cò Sen được thu vào tháng 6 năm 2019, tại núi Cấm, tỉnh An Giang, Việt Nam. Cây Cò Sen được xác định dựa vào đặc điểm hình thái theo hệ thống phân loại Cây cỏ Việt Nam dưới sự hỗ trợ của ThS. Phùng Thị Hằng Bộ môn Sinh học, Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ. Sáu chủng vi khuẩn bao gồm: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Bacillus cereus* ATCC® 10876TM, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27855, *Escherichia coli* ATCC® 25922TM và *Salmonella typhimurium* ATCC® 13311TM được cung cấp bởi Trung tâm Phân tích và Kiểm định Hàng hóa Xuất nhập khẩu Viacimex Cần Thơ và được nuôi cấy tại Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: cân điện tử (PA213 Ohaus, USA), tủ cấy vô trùng (TTS V1000, Thien Trung Scientific, Việt Nam), nồi hấp khử trùng nhiệt ướt (Sturdy SA-300VF, Đài Loan), máy vortex (RS-VA10 Phoenix, Đức), máy đo quang phổ (Multiskan, Phần Lan), máy đo pH (Đức) và một số thiết bị khác.

Hóa chất: 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (Sigma), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate (Roche-Đức), quercetin (Merck), Trolox (Mỹ), gallic acid (Trung Quốc), Folin-ciocalteu (Merck) và một số hóa chất khác.

Phương pháp nghiên cứu

Ấm độ trong bột dược liệu của cây Cò Sen: Ấm độ của các mẫu bột dược liệu được xác định bằng cách dùng sức nóng làm bay hết hơi nước trong dược liệu. Cân 1 g bột dược liệu vào đĩa thủy tinh, sau đó mẫu bột dược liệu khô được sấy ở 105°C trong 2 giờ đến khối lượng không đổi, làm nguội trong bình hút ẩm, cân và xác định khối lượng mẫu bột dược liệu sau khi sấy.

Điều chế cao chiết: Sau khi thu về, rễ cây Cò Sen được làm sạch, thái nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ từ 40 - 45°C. Rễ cây Cò Sen khô được xay thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm dầm trong ethanol. Mẫu được ngâm 3 lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô đuổi dung môi thu được cao ethanol rễ cây Cò Sen.

Định tính thành phần hóa học các cao chiết: Các hợp chất alkaloid, flavonoid, glycoside, tannin, steroid, saponin được định tính dựa vào các phản ứng đặc trưng theo mô tả của Nguyễn Kim Phi Phụng (2007).

Định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong các cao chiết: Định lượng polyphenol toàn phần bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu: Hàm lượng polyphenol được xác định theo mô tả như sau: 100 µL cao chiết được pha với 100 µL nước cất và 100 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu. Sau đó, 100 µL Na₂CO₃ 10% được thêm vào và ủ 30 phút ở 40°C. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm. Hàm lượng polyphenol được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn của chất chuẩn gallic acid.

Định lượng flavonoid: Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp so màu AlCl₃ theo mô tả như sau: Phản ứng gồm 100 µL cao chiết pha trong 100 µL nước cất. Sau đó, 20 µL NaNO₂ 5% được thêm vào, để yên 5 phút, tiếp tục thêm 20 µL AlCl₃ 10% và ủ 6 phút, thêm 200 µL NaOH 1M, cuối cùng 60 µL nước được thêm vào, trộn đều và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Hàm lượng flavonoid được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

Khảo sát hoạt động kháng oxy hóa của các cao chiết in vitro

Phương pháp kháng oxy hóa tổng (total antioxidant capacity-TAC): Hoạt tính kháng oxy hoá tổng của cao chiết được xác định như sau. Hỗn hợp phản ứng gồm 100 µL cao chiết được kết hợp với 300 µL thuốc thử phosphomolybdenum (0,6 M acid sulfuric, 28 mM sodium phosphate và 4 mM ammonium molybdate). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 95°C trong 90 phút. Sau đó, độ hấp thụ quang phổ của dung dịch được đo ở bước sóng 695 nm sau khi làm mát ở nhiệt độ phòng.

Phương pháp trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)): Phương pháp trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} được thực hiện như sau: ABTS^{•+} được tạo ra bởi phản ứng ABTS 7 mM với 2,45 mM kali persulfate. Hỗn hợp được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng từ 12-16 giờ. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm là 0,70±0,05. Tiến hành thí nghiệm bằng cách cho 10 µL cao chiết phản ứng với 990 µL ABTS^{•+} ở nhiệt độ phòng trong 6 phút. Hỗn hợp phản ứng cuối cùng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm.

Phương pháp RP (Reducing power): Năng lực khử của cao chiết được thực hiện theo qui trình sau: Cao chiết với thể tích 100 µL được phản ứng với 100 µL đệm phosphate (0,2 M, pH = 6,6) và 100 µL K₃Fe(CN)₆ 1%. Sau khi ủ ở 50°C trong 20 phút, thêm 100 µL CCl₃COOH 10% rồi ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch sau khi ly tâm được rút 100 µL cho vào 20 µL nước và 20 µL FeCl₃ 0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm.

Phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl): Cao chiết có thể tích là 480 µL được phản ứng với 20 µL DPPH (1000 µg/mL). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối 30°C trong thời gian 30 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ của DPPH ở bước sóng 517 nm.

Phương pháp FRAP (Ferric reducing-antioxidant power): Cao chiết ở các nồng độ khác nhau (10 µL) được cho phản ứng với dung dịch FRAP (990 µL) trong 30 phút trong điều kiện tối. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được xác định ở bước sóng 593 nm.

Phương pháp trung hòa nitric oxide (NO[•]): Cao chiết ở các nồng độ khác nhau (100 µL) được phản ứng với 200 µL sodium nitroprusside (5 mM). Sau khi ủ 60 phút ở 25°C, hỗn hợp phản ứng được ly tâm 11000 vòng/ phút trong 15 phút. Dịch ly tâm được bổ sung 300 µL thuốc thử Griess. Sau đó, mẫu được ủ tiếp 5 phút và tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 546 nm.

Khảo sát hoạt tính kháng viêm in vitro: Cao chiết được xác định khả năng kháng viêm thông qua hoạt động ức chế sự biến tính protein. Phản ứng gồm 150 µL cao chiết với 150 µL dung dịch albumin huyết thanh bò 5%. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được ủ ở 27°C trong 15 phút. Sự biến tính protein được gây ra bằng cách giữ hỗn hợp phản ứng ở 60°C trong 10 phút. Mẫu được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 660 nm.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α-amylase: Hỗn hợp phản ứng gồm có 50 µL cao chiết với 50 µL dung dịch đệm phosphate (pH=7) và 50 µL enzyme α-amylase (3 U) được đem ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 phút. Sau đó, tinh bột (2 mg/mL) với thể tích 50 µL được cho vào hỗn hợp trên và tiếp tục ủ ở 37°C trong 15 phút. Tiếp theo, dung dịch HCl đậm đặc với thể tích 200 µL được thêm vào để ngừng phản ứng. Cuối cùng, 300 µL dung dịch thuốc thử iod được thêm vào để nhận biết lượng tinh bột còn dư sau phản ứng. Hỗn hợp trên được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 660 nm.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase: Cao chiết được khảo sát khả năng ức chế enzyme α-glucosidase theo mô tả như sau. Phản ứng gồm có 100 µL dung dịch đệm phosphate (100 mM, pH=6,8), 20 µL enzyme α-glucosidase (1 U) và 40 µL cao chiết. Sau đó ủ ở 37° C trong 15 phút, rồi tiếp tục thêm 40 µL *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (5 mM) được thêm vào và ủ thêm 20 phút ở 37° C. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 100 µL Na₂CO₃ (0,1 M). Độ hấp thụ của hợp chất *p*-nitrophenol giải phóng được đo tại bước sóng 405 nm.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Xác định đường kính vòng kháng khuẩn: Khả năng kháng khuẩn của cao chiết được xác định dựa trên sự hình thành vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch nhỏ cao chiết. Dịch vi khuẩn với mật số 10⁶ vi khuẩn/mL được trải đều trên bề mặt đĩa thạch Luria-Bertani (LB) với thể tích dịch vi khuẩn là 100 µL. Tiến hành đục lỗ tạo giếng thạch và nhỏ vào mỗi giếng thạch 50 µL cao chiết ở các nồng độ 80; 160; 320; 640 và 1280 µg/mL. Đường kính vòng kháng vi khuẩn được đo bằng thước đo đơn vị mm sau 24 giờ ủ mẫu ở nhiệt độ 30°C.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC-Minimum Inhibitory Concentration) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC-Minimum Bactericidal Concentration): Giá trị MIC được xác định dựa vào phương pháp pha loãng vi mô trên đĩa 96 giếng. Hỗn hợp thử nghiệm gồm 50 µL cao chiết hòa tan trong DMS) 10% và 50 µL dịch vi khuẩn (10⁶ vi khuẩn/mL). Các giếng đối chứng chứa dịch vi khuẩn, môi trường và DMSO 10%. Mẫu sau 24 giờ ủ ở 37°C được thêm 20 µL thuốc thử resazurin 0,01% vào mỗi giếng. Quan sát sự thay đổi màu, ghi nhận giá trị MIC. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (nhỏ 10 µL dịch thử nghiệm ở các giếng không có sự đổi màu của resazurin lên các đĩa môi trường LB và được ủ ở 37°C, sau 24 giờ quan sát sự sống sót của vi khuẩn) (Ngan *et al.*, 2012).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thu mẫu, xử lý và ly trích cao chiết từ rễ cây Cò Sen

Rễ cây Cò Sen (1000 g) qua quá trình xử lý thu được 900 g bột dược liệu. Tiến hành tách chiết thu được 9,67 g cao chiết rễ cây Cò Sen với hiệu suất chiết cao là 1,07% (Bảng 1). Cao chiết rễ cây Cò Sen thu được có màu vàng, dạng rắn và có mùi hương đặc trưng. Qua việc sấy khô mẫu xác định được ẩm độ trong rễ cây Cò Sen là 10%. Độ ẩm bột dược liệu rễ cây Cò Sen được xác định là 5,33±0,58%, kết quả cho thấy nguyên liệu có giá trị về độ ẩm nằm trong giới hạn an toàn cho phép đúng theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V.

Bảng 1. Kết quả thu mẫu, xử lý và ly trích cao chiết rễ cây Cò Sen

	Khối lượng (g)		Độ ẩm của mẫu tươi (%)	Độ ẩm bột dược liệu (%)	Hiệu suất chiết cao (%)
	Tươi	Bột dược liệu			
	1000	900	9,67	10	5,33±0,58
					1,07

Kết quả định tính và định lượng cao chiết rễ cây Cò Sen

Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học có trong cao chiết rễ cây Cò Sen cho thấy sự hiện diện của các nhóm chất khác nhau như: alkaloid, flavonoid, glycoside, tannin. Cao chiết rễ cây Cò Sen không chứa các nhóm chất saponin, steroid. Dựa vào kết quả định tính nhóm nghiên cứu đã chọn định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần có trong cao chiết. Bởi vì, nhóm chất flavonoid đã được biết đến là một trong những polyphenol có hoạt tính sinh học cao trong việc ngăn ngừa nhiều bệnh tật. Kết quả định lượng polyphenol và flavonoid trong cao chiết rễ cây Cò Sen cho thấy sự hiện diện của 2 nhóm chất trên với hàm lượng lần lượt là 7,05 ± 0,1 mg GAE/g cao chiết và 143,94 ± 7,69 mg QE/g cao chiết. Từ kết quả cho thấy, trong 1 g cao chiết từ rễ cây Cò Sen có tương đương 7,05 ± 0,1 mg gallic acid (GAE: gallic acid equivalents) và tương đương 143,94 ± 7,69 mg quercetin (QE: quercetin equivalents). Gallic acid là đại diện của nhóm hợp chất polyphenol và quercetin là đại diện cho nhóm hợp chất flavonoid, cả hai nhóm hợp chất này đã được nghiên cứu và chứng minh là có các hoạt tính sinh học cao, có ý nghĩa trong hoạt động kháng oxy hóa, kháng viêm, kháng ung thư, bảo vệ gan (Petti, Scully, 2009). Từ việc định tính và định lượng sơ bộ thành phần hóa học cho thấy trong rễ cây Cò Sen cũng chứa nhiều các nhóm hợp chất có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất dược liệu.

Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro*

Hiệu quả kháng oxy hóa của cao chiết từ rễ cây Cò Sen được khảo sát bằng 6 phương pháp là TAC, FRAP, RP, ABTS^{•+}, DPPH và NO[•]. Khả năng kháng oxy của cao chiết rễ cây Cò Sen được so sánh với chất chuẩn trolox bằng cách sử dụng nồng độ (µg/mL) mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết khử hoặc trung hòa được 50% gốc tự do (EC₅₀-half maximal effective concentration), kết quả được trình bày trong Bảng 2. Hoạt tính kháng oxy hóa tổng của cao chiết rễ cây Cò Sen được xác định dựa trên việc khử Mo (VI) thành Mo (V) bằng các hợp chất kháng oxy hóa và hình thành phức hợp photphat/Mo (V) màu xanh. Theo đó, cao chiết rễ cây Cò Sen (EC₅₀ = 60,77 ± 0,65 µg/mL) có khả năng khử Mo (VI) thành Mo (V) kém hơn trolox (EC₅₀ = 35,02 ± 0,40 µg/mL) là 1,74 lần. Năng lực khử (4,26 ± 0,17 µg/mL) và tiềm năng khử (28,41 ± 0,42 µg/mL) của cao chiết rễ cây Cò Sen kém hơn trolox lần lượt là 2,22 và 7,14 lần. Cao chiết rễ cây Cò Sen còn có khả năng trung hòa các gốc tự do ABTS^{•+}, DPPH và NO[•] với giá trị EC₅₀ lần lượt là 2,53 ± 0,04, 4,68 ± 0,03 và 541,53 ± 1,53 µg/mL. Trong đó, rễ cây Cò Sen có khả năng trung hòa gốc tự do NO[•] hiệu quả hơn tinh chất trolox 1,34 lần. Năm 2014, cao ethanol chiết từ lá cây *Milium wayanadica* (một loài thực vật cùng chi với cây Cò Sen) đã được khảo sát hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH và tiềm năng khử FRAP cho giá trị EC₅₀ lần lượt là 465 µg/mL và 600 µg/mL (Favaz *et al.*, 2014). Như vậy, rễ cây Cò Sen được so sánh hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp DPPH và FRAP với lá của loài thực vật cùng chi là *Milium wayanadica* thì mạnh hơn lần lượt 3,61 và 21,12 lần.

Bảng 2. Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết rễ Cò Sen

Phương pháp	Giá trị EC ₅₀ (µg/mL)	
	Rễ Cò Sen	Trolox
DPPH	128,95 ^a ± 3,43	0,65 ^b ± 0,01
ABTS	69,72 ^a ± 0,39	2,40 ^b ± 0,02
TAC	60,77 ^a ± 0,65	35,02 ^b ± 0,40
RP	4,26 ^a ± 0,17	1,92 ^b ± 0,11
FRAP	28,41 ^a ± 0,42	3,98 ^b ± 0,12
NO	541,53 ^b ± 1,53	727,05 ^a ± 10,00

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một hàng giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Khả năng kháng oxy hóa mà cao chiết rễ Cò Sen sở hữu có mối tương quan chặt chẽ với hàm lượng polyphenol và flavonoid. Các phân tử polyphenol và flavonoid là các thành phần kháng oxy hóa quan trọng, có tác dụng khử các gốc tự do dựa trên khả năng của chúng để chuyển các nguyên tử hydro cho các gốc tự do (Aryal *et al.*, 2019).

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng viêm *in vitro*

Viêm là một phản ứng bảo vệ cho cơ thể với mục đích loại bỏ các chất có hại ngoại sinh và nội sinh được tạo ra bởi các kích thích gây tổn thương. Viêm và là một phần của quá trình chữa lành trong các mô bị tổn thương. Tuy nhiên, nếu phản ứng viêm không được kiểm soát có thể tiến triển thành một loạt các bệnh viêm mãn tính (Gaestel *et al.*, 2009). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sự biến tính protein là một trong những nguyên nhân gây viêm khớp dạng thấp. Cơ chế biến tính protein có thể liên quan đến sự thay đổi trong liên kết tĩnh điện, hydro, kỵ nước và disulfide (Iffath & Caroline, 2018). Trong nghiên cứu này albumin huyết thanh bò (Bovine Serum Albumin - BSA) được sử dụng như nguồn protein bị biến tính. Khi BSA được làm nóng, nó trải qua quá trình biến tính và biểu hiện các kháng nguyên liên quan đến phản ứng quá mẫn type 3 và có liên quan đến các bệnh như bệnh huyết thanh, viêm cầu thận, viêm khớp dạng thấp và bệnh lupus ban đỏ (Iffath, Caroline, 2018). Cao chiết rễ cây Cò Sen có hoạt tính kháng viêm với giá trị IC₅₀ là 73,78 ± 3,45 µg/mL (Bảng 3). Hoạt tính kháng viêm mà rễ cây Cò Sen có được có thể là do sự hiện diện của các nhóm chất tannin, flavonoid có trong cao chiết đã được định tính ở trên (Rose, Hina, 2016).

Bảng 3. Khả năng kháng viêm của cao chiết rễ cây Cò Sen

Cao chiết và chất chuẩn	Giá trị IC ₅₀ (µg/mL)
Rễ Cò Sen	73,78 ^a ± 3,45
Diclofenac	0,57 ^b ± 0,21
Prednisolon	0,39 ^b ± 0,17

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một hàng giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Kết quả hoạt tính ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase

Enzyme α-amylase là một trong những enzyme chính ở người liên quan trực tiếp đến sự thủy phân tinh bột thành các loại đường đơn giản hơn. Enzyme α-glucosidase là một enzyme có trong ruột non, xúc tác cho quá trình

chuyển hóa tinh bột thành glucose. Các chất ức chế enzyme α -glucosidase làm giảm tốc độ chuyển hóa carbohydrate và trì hoãn sự hấp thụ glucose (Kang *et al.*, 2015). Việc đánh giá hoạt tính kháng đái tháo đường *in vitro* dựa trên sự ức chế hoạt động enzyme α -amylase và α -glucosidase đã được thực hiện ở nhiều nghiên cứu trước đây (Etsassala *et al.*, 2019).

Bảng 4. Khả năng ức chế enzyme của cao chiết rễ cây Cò Sen

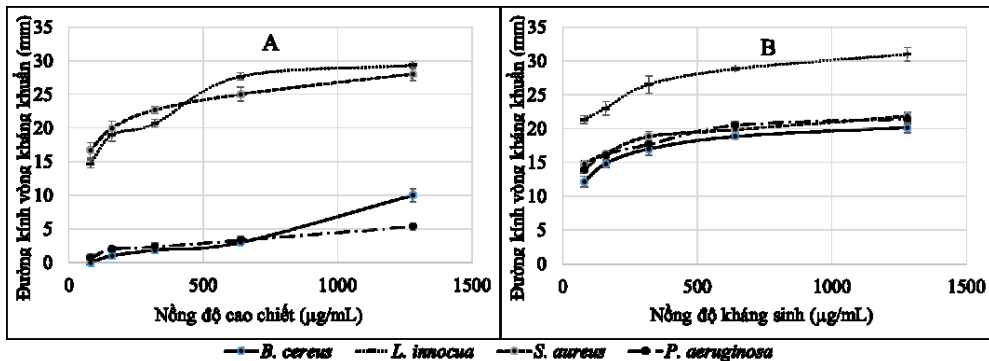
Cao chiết và chất chuẩn	Giá trị IC ₅₀ (μ g/mL)	
	Enzyme α -amylase	Enzyme α -glucosidase
Rễ Cò Sen	1274,62 ^a ±27,99	121,44 ^a ±3,09
Acarbose	12,13 ^b ±0,19	6,74 ^b ±0,13

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Trong nghiên cứu này, hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của cao chiết rễ cây Cò Sen đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy, cao chiết có hoạt tính ức chế α -amylase và α -glucosidase với giá trị IC₅₀ lần lượt là 1274,62 ± 27,99 và 121,44 ± 3,09 μ g/mL, đều kém hơn chất chuẩn acarbose (Bảng 4). Khả năng ức chế enzyme của cao chiết rễ cây Cò Sen có liên quan đến hoạt tính kháng oxy hóa. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng ngoài khả năng trung hòa và khử các gốc tự do ra thì các chất kháng oxy hóa còn có khả năng ức chế α -glucosidase và α -amylase mạnh (Thilagam *et al.*, 2013). Ngoài ra, ở bệnh nhân đái tháo đường có sự gia tăng các dấu hiệu viêm, bao gồm protein phản ứng C, TNF- α và phân tử bám dính giữa các tế bào (Keaney *et al.*, 2004). Chính vì vậy, rễ Cò Sen với hoạt tính kháng viêm và ức chế các enzyme ức chế α -amylase và α -glucosidase đã được chứng minh ở trên có thể ứng dụng kết hợp hỗ trợ điều trị cho người bệnh đái tháo đường.

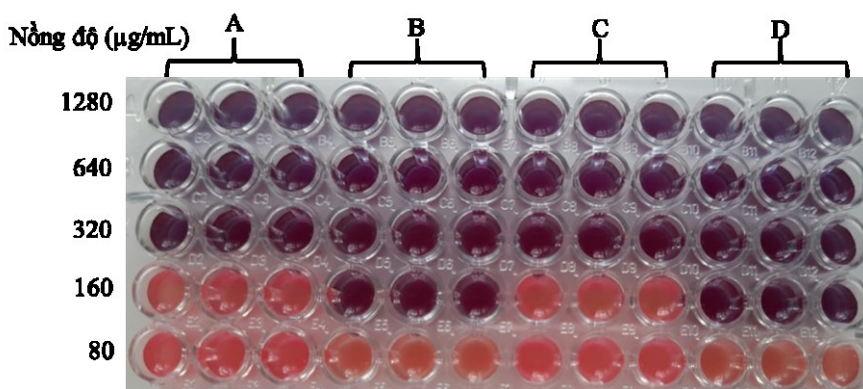
Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của rễ cây Cò Sen

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết rễ cây Cò Sen được xác định dựa vào đường kính vòng kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán giếng thạch trình bày trong Hình 1. Kết quả nghiên cứu cho thấy đường kính vòng kháng các chủng vi khuẩn của cao chiết rễ cây Cò Sen dao động từ 0,67 - 29,33 mm. Trong đó cao chiết rễ cây Cò Sen thể hiện hoạt tính kháng chủng vi khuẩn *L. innocua* mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 29,33 ± 0,58 mm ở nồng độ 1.280 μ g/mL.



Hình 1. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết rễ cây Cò Sen và kháng sinh Vancomycin
A, Cao chiết rễ Cò Sen và B, Kháng sinh Vancomycin

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 rễ Cò Sen đối với từng chủng vi khuẩn có sự khác nhau trình bày trong Hình 2 và Bảng 5. Các giếng có sự đổi màu của thuốc thử resazurin từ màu xanh sang màu hồng cho thấy có sự tăng trưởng của vi khuẩn trong giếng. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được định nghĩa là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm của cao chiết thực vật có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (không làm đổi màu resazurin). Các giếng không có sự đổi màu của resazurin được trải lên các đĩa môi trường thạch LB. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của các cao chiết thực vật có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn trong giếng, không có khuẩn lạc nào xuất hiện trên đĩa môi trường thạch LB. Như vậy, cao chiết rễ Cò Sen có giá trị 80 < MIC ≤ 160 μ g/mL đối với vi khuẩn *L. innocua*, *S. aureus* và 160 < MIC ≤ 320 đối với *P. aeruginosa*, *B. cereus*. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của cao chiết rễ cây Cò Sen đối với các chủng vi khuẩn thử nghiệm lớn hơn 1.280 μ g/mL. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết rễ cây Cò Sen vẫn yếu hơn kháng sinh thương mại Vancomycin và cả hai không có khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli*, *S. typhimurium* trong dãy nồng độ khảo sát.



Hình 2. Sự thay đổi màu sắc của thuốc thử resazurin trên đĩa 96 giếng
A, *P. aeruginosa*; B, *L. innocua*; C, *B. cereus* và D, *S. aureus*

Nhiều nghiên cứu thực nghiệm cho thấy mối tương quan giữa hoạt động kháng khuẩn của các cao chiết thực vật với hoạt tính kháng oxy hóa và các hợp chất thứ cấp có trong thực vật (Ben *et al.*, 2015). Trong đó các nghiên cứu chỉ ra rằng, cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa cao cũng cho hiệu quả kháng khuẩn cao. Một số nhà nghiên cứu cho rằng các thành phần kháng khuẩn có trong cao chiết thực vật như terpenoid, alkaloid và polyphenol tương tác với các enzyme và protein của màng tế bào vi khuẩn gây ra sự phân tán của dòng proton về phía bên ngoài tế bào dẫn đến sự chết của tế bào hoặc có thể ức chế enzyme sinh tổng hợp amino acid của vi khuẩn (Gill, Holley, 2006). Các vi khuẩn *L. innocua*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* đang nổi lên như là những chủng vi khuẩn có khả năng kháng kháng sinh nguy hiểm. Tổ chức Y tế thế giới đã khuyến cáo cần những ưu tiên nghiên cứu, tìm những phương pháp mới chống lại các vi khuẩn này. Thành phần hóa học có trong rễ cây Cò Sen có thể tiếp tục nghiên cứu, phát triển những hợp chất ức chế các vi khuẩn này.

Bảng 5. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết rễ cây Cò Sen

Chủng vi khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu (µg/mL)		Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (µg/mL)	
	Rễ Cò Sen	Vancomycin	Rễ Cò Sen	Vancomycin
<i>L. innocua</i>	80 < MIC ≤ 160	0 < MIC ≤ 80	MBC > 1280	0 < MBC ≤ 80
<i>P. aeruginosa</i>	160 < MIC ≤ 320	80 < MIC ≤ 160	MBC > 1280	160 < MBC ≤ 320
<i>B. cereus</i>	160 < MIC ≤ 320	80 < MIC ≤ 160	MBC > 1280	320 < MBC ≤ 640
<i>S. aureus</i>	80 < MIC ≤ 160	0 < MIC ≤ 80	MBC > 1280	0 < MBC ≤ 80

KẾT LUẬN

Rễ cây Cò Sen được ly trích các hoạt chất bằng dung môi ethanol và được đánh giá một số hoạt tính sinh học bằng các phép thử nghiệm tiêu chuẩn. Kết quả cho thấy rễ cây Cò Sen chứa nhiều hợp chất có tiềm năng sinh học. Bên cạnh đó, rễ cây Cò Sen cũng thể hiện tốt hoạt tính kháng oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase. Từ những kết quả trên có thể thấy rễ cây Cò Sen có thể sẽ là một nguồn dược liệu tự nhiên tiềm năng cho nhiều bệnh hiểm nghèo hiện nay. Cần có các công trình nghiên cứu tiếp theo để đánh giá hoạt tính sinh học của cây Cò Sen để góp phần cung cấp thêm bằng chứng khoa học về tiềm năng dược liệu của loài thực vật này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ kinh phí bởi Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh An Giang về hóa chất thí nghiệm (mã số đề tài: 373.2018.06). Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Trung tâm Phân tích và Kiểm định Hàng hóa Xuất nhập khẩu Viacimex Cần Thơ đã hỗ trợ chúng vi khuẩn thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aryal S, Baniya MK, Danekhu K, Kunwar P, Gurung R, Koirala N (2019). Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. *Plant* 8(4): 96.
- Balunas MJ, Kinghorn AD (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5): 431-441.
- Ben NA, Dhifi W, Bellili S, Ghazghazi H, Aouadhi C, Chérif A, Mnif W (2015). Chemical composition, antioxidant potential, and antibacterial activity of essential oil cones of Tunisian *Cupressus sempervirens*. *J Chem* 2015: 8.
- Chaowasku T, Keßler PJA (2013). Seven new species of *Milium* (Annonaceae) from Thailand. *Nordic J Bot* 31: 680-699.

- Etsassala NGER, Jelili AB, Tesfaye TW, Jeanine LM, Christopher NC, Ahmed AH, Emmanuel II (2019). Alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities of novel abietane diterpenes from *Salvia africana-lutea*. *Antioxidants* 8(10): 421.
- Favaz P, Thomas PA, Thomas Parambi DG, Anil KB, Baby A, Rajan N (2014). Histological evaluation, antioxidant and cytotoxic studies of *Milium wayanadica*. *IOSR J Pharm Biol Sci* 9(5): 50-60.
- Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M (2009). Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nature*, 8(6): 480-499.
- Gill AO, Holley RA (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 108: 1-9.
- Iffath HM, Caroline RJ (2018). *In vitro* anti-inflammatory and antiarthritic activity of *Pergularia daemia* leaves and roots. *Int J Drug Dev Res* 10: 10-13.
- Kang VK, BajpaiSun C (2015). Tyrosinase and α -glucosidase inhibitory effects of an abietane type diterpenoid taxodone from *Metasequoia glyptostroboides*. *Nat Acad Sci Lett* 38: 399-402.
- Keaney JJF, Massaro JM, Larson MG, et al. (2004). Heritability and correlates of intercellular adhesion molecule-1 in the Framingham Offspring study. *J Ame Coll Cardiol* 44(1): 168-173.
- Ngan LTM, Moon JK, Kim JH, Shibamoto T, Ahn YJ (2012). Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 28(4): 1575-1583.
- Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. *Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh*.
- Petti S, Scully C (2009). Polyphenols, oral health and disease: a review. *J Dent* 37: 413-423.
- Rad JS, Alfateri SMH, Rad MS (2014). *In vitro* assessment of antibacterial activity of *Salicornia herbacea* L. seed extracts against multidrug resistant gram-positive and gram-negative bacteria. *Int J Biosci* 4(6): 217-222.
- Rose JC, Hina MI (2016). Comparative evaluation of phytochemical constituents of various extracts of leaves and roots of *Pergulariadaemia*. *World J Pharm Pharm Sci* 5: 1728-1736.
- Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfateri SM, Sharifi-Rad M, Setzer WN (2014). Chemical composition, antifungal and antibacterial activities of essential oil from *Lallemantia royleana* (Benth. in Wall.) Benth. *J Food Safety* 35(1): 19-25.
- Thilagam E, Parimaladevi B, Kumarappan C, Manda SC (2013). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. *J Acupunct Merid Stud* 6: 24-30.
- Wongsa N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K (2011). Corrigendum to "Cananginones A-I, linear acetogenins from the stem bark of *Cananga latifolia*". *Phytochem* 72 (14-15): 1859-1864.

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EXTRACT FROM ROOT OF *Milium velutinum*

Tran Chi Linh¹, Dai Thi Xuan Trang¹, Pham Khanh Nguyen Huan¹,
Vo Thi Tu Anh¹, Luu Thai Danh², Tran Thanh Men^{1*}

¹ College of Natural Sciences

² College of Agriculture, Can Tho University

SUMMARY

The antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory properties (α -amylase; α -glucosidase) of extract from root of *Milium velutinum* was examined to assess the prospects of this plant as a source of natural products with therapeutic potential. The extract obtained with ethanol showed variety of components: alkaloids, flavonoids, glycosides, tannins, as they yielded promising results in all completed assays. The antioxidant activity of *Milium velutinum* root extract was evaluated using several methods, and the results showed good antiradical effects. Moreover, the antimicrobial evaluation showed a potent antibacterial activity against *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. Furthermore, the extract demonstrated anti-inflammatory activity in a dose dependent pattern, with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 73.78±3.45 μ g/mL. The α -amylase and α -glucosidase enzyme-inhibiting activities were assessed and compared with commercial standard acarbose. *Milium velutinum* root extract showed high inhibitory activities with the IC₅₀ value of 1274.62±27.99 μ g/mL for α -amylase and 121.44±3.09 μ g/mL for α -glucosidase. Results demonstrated that *Milium velutinum* root extract can represent an important natural source with high antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory potential and significant α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects.

Keywords: Anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, *Milium velutinum*, α -amylase, α -glucosidase.

* Author for correspondence: Tel: +84.899030077; Email: ttmen@ctu.edu.vn