

# HOẠT TÍNH KHÁNG SỰ HÌNH THÀNH BIOFILM TRÊN CHỦNG VI KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TỪ CAO PHÂN ĐOẠN ETHYL ACETATE TRÂM TRÒN (*SYZYGIIUM GLOMERATUM*)

Mai Thị Ngọc Lan Thanh<sup>1,2\*</sup>, Dương Chí Ái<sup>2</sup>, Lý Hoàng Giáp<sup>2</sup>, Hoàng Anh Hoàng<sup>1</sup>, Trương Vũ Thanh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Đại học Thủ Dầu Một

## TÓM TẮT

*Staphylococcus aureus* là chủng vi khuẩn nguy hiểm gây nhiễm trùng bệnh viện, ngày nay chủng này đã xuất hiện nhiều cơ chế kháng thuốc và gây tử vong trong các ca mắc bệnh. Ngày nay, liệu pháp sử dụng thuốc có nguồn gốc tự nhiên trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn kháng kháng sinh đang được quan tâm. Hơn nữa, trong một nghiên cứu khác nhóm tác giả đã công bố cao tổng ethanol từ Trâm Tròn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn *staphylococcus aureus* và khả năng kết hợp một phần với vancomycin. Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp chiết lỏng-lỏng để thu nhận các cao phân đoạn từ hai dung môi có độ phân cực tăng dần là hexan và ethylacetate. Nồng độ ức chế tối thiểu của phân đoạn được xác định bằng phương pháp vi pha loãng, đồng thời thử nghiệm khả năng kháng sự hình thành biofilm trên hai chủng *staphylococcus aureus* nhạy với kháng sinh methicillin (MSSA ATCC6538) và kháng methicillin (MRSA ATCC33591) bằng phương pháp nhuộm bắt màu với crystal violet. Kết quả từ cao tổng ethanol có hai phân đoạn được thu nhận, đồng thời hoạt tính kháng khuẩn cao nhất được xác định trên phân đoạn ethylacetate với giá trị MIC bằng 0,5 mg/mL đối với MSSA và 1 mg/mL đối với MRSA. Khả năng ức chế hình thành biofilm trên hai chủng MSSA và MRSA của cao phân đoạn Trâm Tròn với giá trị nồng độ là 0,25 mg/mL lần đầu tiên được báo cáo. Cao phân đoạn thực vật cho hoạt tính kháng khuẩn với đích tác động là sự hình thành biofilm. Điều này chứng minh sự hữu ích của thực vật trong liệu pháp chống lại vi khuẩn gây bệnh trên người.

*Từ khóa:* MSSA, MRSA, *Syzygium*, hoạt tính kháng khuẩn, biofilm.

## MỞ ĐẦU

Vấn đề kháng kháng sinh mang tính toàn cầu và đang ngày càng trầm trọng tại Việt Nam. Nhiễm trùng mãn tính gây ra bởi màng sinh học *Staphylococcus aureus* thường dẫn đến đáng kể tỷ lệ mắc bệnh và tử vong. Điều này tạo ra rất nhiều nỗ lực trong việc nghiên cứu để hiểu các cơ chế phân tử nhằm kiểm soát sự hình thành màng sinh học của *Staphylococcus aureus* và tạo nền cơ sở cho việc tính toán lại việc điều trị bằng kháng sinh cho các cấu trúc đa bào này (Lawrence *et al.*, 2019). Dựa trên các nghiên cứu về chiết xuất thực vật, Quave và đồng tác giả (2012) đã tìm ra phân đoạn cao chiết kháng sự hình thành biofilms là hình thức gây độc của nhiều dạng nhiễm khuẩn *Staphylococcus aureus*. Nghiên cứu này đã chứng minh rằng phân đoạn 220D-F2 (phân đoạn thu được từ cao chiết ethanol của rễ cây *Rubus ulmifolius*) có sự hiện diện của ellagic acid và những chất dẫn xuất của nó có khả năng giới hạn sự hình thành biofilm và có tiềm năng làm tăng khả năng nhạy với kháng sinh. Tất cả các dòng *Staphylococcus aureus* được kiểm tra đều có biểu hiện giảm sự hình thành biofilm dưới tác dụng của phân đoạn 220D-F2 ở nồng độ từ 50-200 mg/L và sự phát triển của vi khuẩn sẽ bị giới hạn ở nồng độ 530-1040 mg/L. Sự giới hạn này là kết quả khả quan trong tiềm năng điều trị bằng 220D-F2 để làm tăng khả năng nhạy với các kháng sinh như daptomycin, clindamycin và oxacillin. Kết quả kiểm tra trên tế bào thận và tế bào gan để chứng minh không gây độc ở nồng độ mà 220D-F2 ảnh hưởng trên vi khuẩn. Những kết quả này chứng minh rằng cao chiết 220D-F2 từ rễ của cây *Rubus ulmifolius* có thể sử dụng để ức chế sự hình thành biofilm và làm tăng khả năng nhạy với kháng sinh điều trị mà không gây độc trên những tế bào động vật bình thường. Vì thế, 220D-F2 là một đối tượng đáng chú ý cho việc phát triển thuốc có nguồn gốc thực vật để sử dụng trong điều trị và phòng ngừa những bệnh nhiễm khuẩn có liên quan đến hình thành biofilm của *Staphylococcus aureus* (Quave *et al.*, 2012).

Tiếp sau đó, Quelemes và đồng tác giả (2015), nghiên cứu về sự ảnh hưởng của cao chiết lá cây Neem trên sự hình thành biofilm. Kết quả chỉ ra về sự ảnh hưởng của cao chiết ethanolic từ lá cây Neem trên sự hình thành biofilm của chủng vi khuẩn MRSA và các tế bào phù du. Ảnh hưởng đồng ức chế những nồng độ của cao chiết ethanol từ cây Neem trên sự hình thành biofilm và các tế bào phù du của *S.aureus* được kiểm tra bằng thử nghiệm crystal violet dye và phân tích AFM (Atomic force microscopy). Định lượng Azadirachtin (AZA) thông qua một trong những hợp chất chính có mối liên quan đến ảnh hưởng sinh học. Sự hiện diện của AZA trong cao chiết ( $0,14 \pm 0,02$  mg/L). Kiểm tra đồng ức chế sự hình thành biofilm và các tế bào phù du từ 62,5 mg/L đối với chủng nhạy kháng sinh

*S. aureus* và 125 mg/L đối với 2 chủng MRSA (Quelemes *et al.*, 2015). Lara và đồng tác giả (2017), chiết xuất dichloromethane cho kết quả tốt hơn so với neolignans phân lập chống lại tất cả các màng sinh học được thử nghiệm, với nồng độ ức chế tối thiểu < 400 µg/mL đối với màng sinh học được tạo hình trước và nồng độ ức chế tối thiểu 15,6 µg/mL đối với sự hình thành màng sinh học. Nồng độ ức chế tối thiểu đối với các tế bào phù du là < 12,5 µg/mL. Những kết quả này cho thấy tác dụng tốt của chiết xuất dichloromethane trong điều trị dự phòng đối với MRSA (Brambilla *et al.*, 2017).

Chi Trâm có nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng kháng khuẩn, hơn nữa tại Việt Nam chi Trâm được xác định là có khoảng 50 loài hiện diện, căn cứ vào các nghiên cứu trong và ngoài nước về hoạt tính được tiềm năng của thực vật nói chung và của thực vật chi Trâm nói riêng, cùng với nghiên cứu “ Thu nhận và sàng lọc cao chiết thực vật bản địa tại Bình Dương có hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng Methicilin (MRSA)” của tác giả Mai Thị Ngọc Lan Thanh (4/2019) (Thanh, 2019), trong đó có Trâm Tròn. Cao tổng từ thực vật này cho hoạt tính kháng khuẩn MRSA và MSSA, hơn nữa từ phân đoạn Trâm Tròn nhóm tác giả đã xác định kháng khuẩn của phân đoạn ethylacetate và khả năng kết hợp một phần với kháng sinh vancomycin. Một hướng khác, kháng sinh cefoxitin là kháng sinh thuộc nhóm β-lactam và đã bị kháng bởi chủng MRSA. Trong nghiên cứu này, phân đoạn ethylacetate được tiếp tục khảo sát, liệu rằng khả năng kết hợp với kháng sinh β-lactam của phân đoạn ethylacetate có hay không/bước đầu sàng lọc cơ chế kháng khuẩn của phân đoạn. Hơn nữa, khả năng hình thành biofilm trên hai chủng MSSA và MRSA là một trong các nguyên nhân kháng thuốc trong điều trị. Chính vì vậy, phân đoạn ethylacetate được tiến hành khảo sát khả năng ức chế hình thành biofilm trên hai chủng vi khuẩn nhằm tìm kiếm các hoạt tính sinh học của phân đoạn được liệu. Vì vậy, càng có thêm kỳ vọng vào tiềm năng dược lý của các hoạt chất kháng khuẩn có gốc tự nhiên thể hiện hiệp đồng hoạt tính kháng sinh và ức chế các kiểu hình đa kháng thuốc ở vi khuẩn, mở ra một liệu pháp điều trị vi khuẩn đa kháng thuốc trong tương lai có nguồn gốc từ thực vật.

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**Nuôi cấy vi khuẩn**

Chủng vi khuẩn MSSA ATCC 6538 (Microbiologics, USA) được sử dụng như chủng đối chứng, MRSA (Microbiologics, USA) và MSSA được nuôi trên môi trường lỏng Trypton Soy (Himedia, Ấn Độ), và môi trường Trypton Soy agar (Himedia, Ấn Độ). Chủng vi khuẩn được nuôi trong tủ ấm (DaiHan, Hàn Quốc), ở nhiệt độ 37°C, trong vòng 18 giờ

**Nguyên liệu và xử lý nguyên liệu**

Sinh khối tươi thực vật (lá, cành non) được thu hái tại Thành phố Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương 11°00'33.02'' Phía Bắc, 106°39'00.37'' phía Đông, độ cao 11 m±3 m, và được phân loại, lưu mẫu tại bộ môn Sinh học ứng dụng, Đại học Thủ Dầu Một.

Phương pháp thu nhận cao ethanol thực vật: Mẫu thực vật được rửa bằng nước cất, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng, thực vật được nghiền bằng máy xay FY 130 (tốc độ máy 34000 vòng/phút, kích thước mắt lưới 0,074-0,25mm). Sau đó bột thực vật sẽ được dùng để chiết cao theo phương pháp ngâm dầm trong ethanol ở 50°C, lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 24 giờ bằng máy lắc Ika KS 4000i (Đức), Mẫu thu sau mỗi 24 giờ, và chiết kiệt trong vòng 1 tuần. Tỷ lệ chiết (ethanol: sinh khối thực vật khô) 2 lít: 50g. Dung dịch thu được sẽ được lọc qua giấy lọc Whatman đường kính 110 mm, kích thước lỗ lọc 20-25µm, dịch lọc thu được sẽ được cô cao bằng máy cô quay ở 50°C, trong 2-3 giờ, sau đó cao sệt sẽ được để trong tủ sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi.

**Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết /phân đoạn/ hoạt chất tinh sạch bằng phương pháp pha loãng (Broth microdilution method)**

**Bảng 1. Sơ đồ tiến hành thí nghiệm**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TSB	TSB+VK	DMSO 20%	DMSO 10%	2MIC CEFO	MIC CEFO	SCTT EA (2mg/ml, DMSO 20%)					
C	kết hợp SCTT Ea với cefoxitin (MIC, ½ MIC, ¼ MIC, 1/8 MIC)											
E	TSB	TSB+VK	DMSO 20%	DMSO 10%	cefoxitin (2048µg/ml)							
F	SCTT Ea						NN ea					
G	kết hợp SCTT Ea (1,2,3) với cefoxitin (7,8,9,10)											

SCTT Ea: Phân đoạn ethylacetate; giếng 1, 2, 3, 4 là đối chứng âm; giếng 5,6: là kháng sinh chuẩn cefoxitin.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu bằng phương pháp pha loãng dây nồng độ trong các ống, dựa theo định nghĩa về nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ thấp nhất ức chế sự phát triển của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa nuôi cấy 96 giếng, thể tích mỗi giếng là 200 µL, thành phần mỗi giếng bao gồm 100 µL dịch vi khuẩn (10<sup>6</sup> CFU/mL), chất chiết pha loãng từ 2-0,0625 mg/mL và môi trường lỏng Muller Hinton. Sử dụng hai giếng là mẫu đối chứng, một chỉ có môi trường MHB và chủng vi khuẩn không có hoạt chất thực vật

làm đối chứng dương, một chỉ có môi trường MHB mà không có vi khuẩn là đối chứng âm. Các giếng sẽ được ủ hiếu khí ở 37°C trong vòng 24 giờ. Sau thời gian ủ, nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ mà ức chế sự phát triển của vi khuẩn được nhận là nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) (Wayne, 2010).

**Xác định khả năng tương tác của các cao chiết/phân đoạn/hoạt chất tinh khiết trong hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp Checkerboard.**

Xác định khả năng tương tác của các chất chiết có hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp Checkerboard. FIC (nồng độ ức chế từng phần) được thiết lập nhằm xác định sự ảnh hưởng trong quá trình kết hợp hai loại thuốc. FIC được xác định bằng phương pháp pha loãng dung dịch checkerboard. Nồng độ bắt đầu của chất chiết trong thử nghiệm checkerboard là MIC. Giá trị FIC chỉ ra tất cả các sự kết hợp được tính toán theo công thức bên dưới:

$$FIC_{index} = FIC A + FIC B = \frac{MIC A \text{ trong sự kết hợp}}{MIC A} + \frac{MIC B \text{ trong sự kết hợp}}{MIC B}$$

Hợp lực - tăng độc lực (synergy) khi  $FIC_{index} \leq 0,5$ ; Hợp lực một phần (partial synergy) khi  $0,5 < FIC_{index} \leq 0,75$ ,

Cộng hợp (addition) khi  $0,75 < FIC_{index} \leq 1$ , Không có tương tác (antagonism) khi  $2 < FIC_{index}$  (Issam, Zimmermann, Reichling, & Wink, 2015; Kuok *et al.*, 2017; White, Burgess, Manduru, & Bosso, 1996)

**Thử nghiệm khả năng ức chế biofilm cao chiết/phân đoạn/tinh chất trên hai chủng MSSA ATCC 6538 và MRSA ATCC 33591**

Xác định khả năng ức chế sự hình thành biofilm của dung dịch khảo sát dựa trên khả năng bắt màu thuốc nhuộm trên hai chủng vi khuẩn MSSA và MRSA theo phương pháp của Mataraci và Dosler (2012) với một sửa đổi nhỏ. Mỗi ống eppendorf có thể tích cuối là 200 µl thành phần bao gồm 100 µl dung dịch cao chiết/phân đoạn/tinh chất hoặc cefoxitin, 10 µl dịch huyền phù MSSA và MRSA đã hoạt hóa qua đêm trong 24 giờ trước, ở 37°C trong tủ nuôi vi sinh, 90 µl môi trường TSB + 1% glucose. Sau đó tiếp tục ủ trong 24 giờ ở 35°C. Môi trường được loại bỏ và các ống được rửa ba lần bằng 250 µl nước cất để loại bỏ vi khuẩn và để khô. Sau khi khô, 200µl dung dịch metanol 99% được thêm vào từng ống trong 20 phút để cố định. Tiếp theo, dung môi được loại bỏ và đĩa được để khô trong 15 phút. Cuối cùng, các giếng được nhuộm màu tím pha lê 0,1% trong 15 phút. Sử dụng nước cất để rửa vết bẩn dư thừa và đĩa được để khô trong không khí. Rửa giải bằng cách thêm 200µl ethanol 95° trong 10 phút. Đọc kết quả.

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và được xử lý bằng phần mềm STATGRAPHICS Centurion XV.

**KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN**

**Hoạt tính kháng khuẩn của phân đoạn Trâm Tròn**

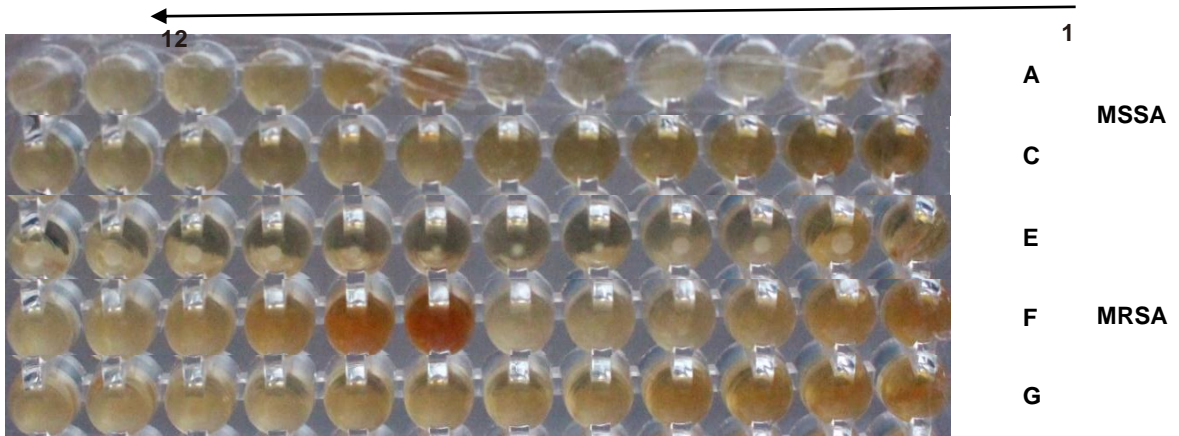
Sử dụng phương pháp vi pha loãng trên đĩa 96 giếng với các giếng đối chứng, kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn của phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
C	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	-	+	+	+	+	+						
G	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) không có sự hiện diện vi khuẩn, (+) có sự hiện diện của vi khuẩn.

Dựa trên Bảng 2 và sơ đồ bố trí thí nghiệm, xác định được giá trị nồng độ ức chế tối thiểu của cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn trên hai chủng MSSA và MRSA lần lượt ở giếng 8 trong dãy A và giếng 1 trong dãy F. Từ đây, giá trị MIC của cao phân đoạn xác định bằng 0,5 mg/mL đối với chủng MSSA và 1 mg/mL đối với chủng MRSA.



Hình 1. Kết quả khảo sát phân đoạn ethylacetate Trâm tròn trên hai chủng MSSA và MRSA

Điều này có thể so sánh với các nhóm thực vật thuộc chi Trâm như nghiên cứu năm 2017, Imran và đồng tác giả đã nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá *Syzygium cumini* kháng lại các chủng vi khuẩn gây bệnh kháng đa thuốc. Kết quả cao chiết tìm thấy vòng kháng khuẩn lớn nhất là phân đoạn ete và ethanol từ 8 - 24 mm. Cao chiết *Syzygium cumini* thể hiện hoạt tính kháng chủng *S.aureus* kháng thuốc tốt. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết lá được xác định với giá trị từ 1,56 đến 25 mg/ml trên các chủng vi khuẩn khảo sát. Có sự kết hợp với ampicillin ức chế các chủng vi khuẩn kháng thuốc. Phân đoạn ethylacetate từ cao chiết *Syzygium cumini* kháng lại các chủng *S.aureus* kháng thuốc có giá trị MIC thấp nhất là 12,5 mg/ml (Imran *et al.*, 2017). So sánh với nghiên cứu của tác giả Imran và đồng tác giả, có thể thấy cao chiết phân đoạn ethylacetate từ cao ethanol Trâm Tròn trong nghiên cứu cho hoạt tính tốt hơn trên cả hai chủng MSSA và MRSA thông qua chỉ số kết hợp FICI, dựa vào kết quả trong Bảng 2, ở các giếng kết hợp giữa cao phân đoạn với kháng sinh cefoxitin trong dãy C đối với chủng MSSA, và Dãy G đối với chủng MRSA. Kết quả được tính toán dựa trên công thức hợp lực của Kuok và đồng tác giả (2017) thông qua chỉ số FICI và được trình bày trong Bảng 2. Chỉ số FICI của Phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn với cefoxitin trên hai chủng MSSA và MRSA.

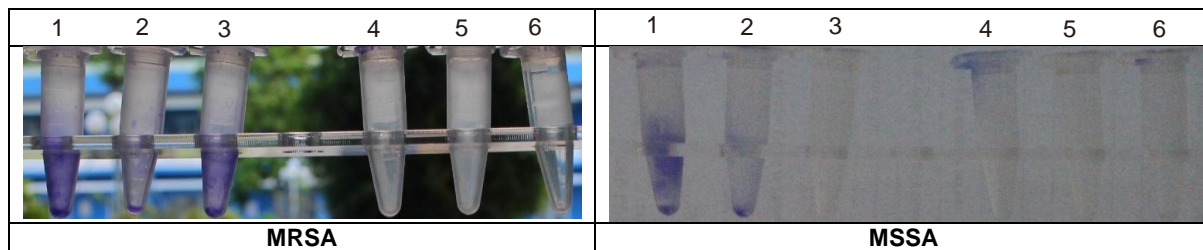
Dựa vào Bảng 3, chứng minh khả năng hợp lực giữa phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn với kháng sinh cefoxitin trên hai chủng MSSA và MRSA. Dựa vào Bảng 3. Nồng độ cao phân đoạn trong sự kết hợp bằng 0,125 mg/mL bằng ¼ giá trị MIC của cao phân đoạn một mình và kháng sinh có giá trị MIC bằng 0,001 mg/mL bằng ¼ giá trị MIC kháng sinh một mình đối với chủng MSSA. Điều này cho thấy khả năng hợp lực của cao phân đoạn với kháng sinh. Hơn nữa, trong sự hợp lực kháng MRSA cao phân đoạn có giá trị MIC bằng 0,5 mg/mL giảm 2 lần so với MIC kháng MRSA một mình, còn kháng sinh cefoxitin có giá trị MIC trong sự kết hợp bằng 0,008 mg/mL giảm 128 lần MIC kháng sinh một mình kháng MRSA. Điều này mở ra tiềm năng cho liệu pháp hợp lực, sử dụng các nguồn hợp chất thực vật là giảm các giá trị MIC của kháng sinh nhằm giảm tác dụng phụ và tái lập lại hoạt động của các kháng sinh thế hệ cũ đã bị kháng bởi vi khuẩn kháng thuốc.

Bảng 3. Chỉ số FICI của Phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn với cefoxitin trên hai chủng MSSA và MRSA

Chủng vi khuẩn	MSSA	MRSA
giếng kết hợp	SCTTEa -cefo 2	SCTTEa-cefo 8
MIC SCTT Ea (mg/mL) trong sự kết hợp	0,125	0,5
MIC SCTTEa một mình (mg/mL)	0,5	1
MIC cefo (mg/mL) trong sự kết hợp	0,001	0,008
MIC cefo một mình (mg/mL)	0,004	1,024
FIC SCTTEa	0,25	0,5
FIC Cefo	0,25	0,0078
FICI	0,5	0,5078

**Hoạt tính ức chế sự hình thành biofilm của phân đoạn Trâm Tròn trên hai chủng vi khuẩn MSSA ATCC6538 và MRSA ATCC33591**

*Staphylococcus aureus* là chủng có khả năng hình thành biofilm (Memariani *et al.*, 2019). Thí nghiệm thực hiện nhằm xác định khả năng ức chế sự hình thành biofilm bằng phương pháp nhuộm màu với crystal violet.



**Hình 2. Ức chế hình thành biofilm trên hai chủng MSSA và MRSA từ cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn**

Ống 1, 2, 3 là đối chứng: DMSO 20%, DMSO 10%, kháng sinh cefoxitin; ống 4, 5, 6 là phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn ở nồng độ từ 1mg/mL; 0,5 mg/mL và 0,25 mg/mL.

Kết quả được trình bày Hình. 2, phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn cho hoạt tính ức chế sự hình thành biofilm trên hai chủng MSSA và MRSA, so với đối chứng, nồng độ cao phân đoạn ethylacetate của Trâm Tròn là 0,25 mg/mL bằng ½ MIC ức chế của cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn đối với chủng MSSA và bằng ¼ MIC ức chế đối với MRSA. Đối chứng chủng MSSA được xử lý với cefoxitin ở nồng độ 0,008 mg/mL trong ống eppendorf không bắt màu xanh, ống bắt màu xanh khi xử lý với cefoxitin nồng độ 0,008 mg/mL trong ống là chủng MRSA, vì chủng kháng với kháng sinh nên bắt màu đậm hơn. Hai mẫu còn lại là DMSO 20% và DMSO 10%, bắt màu xanh vì vi khuẩn phát triển bình thường và bắt màu đậm hơn so với ống chỉ có vi khuẩn với môi trường, điều này rất dễ hiểu vì các chủng vi khuẩn *S.aureus* khi gặp môi trường không thuận lợi như thuốc, chất diệt khuẩn, stress thì quá trình hình thành biofilm sẽ được kích hoạt, cho nên biofilm được xác định là vai trò chính trong sự kháng kháng sinh (de la Fuente-Núñez *et al.*, 2013; Stewart, Costerton, 2001). Đây là kết quả báo cáo đầu tiên về cao phân đoạn Trâm Tròn cho hoạt tính ức chế biofilm. Hơn nữa, so với các nghiên cứu khác chứng minh hoạt tính ức chế biofilm của cao phân đoạn ethylacetate của Trâm Tròn cho hoạt tính mạnh với nồng độ lần lượt là 0,25 mg/ml, đơn cử như nghiên cứu của tác giả Arunachalam Kannappan và đồng tác giả (2017) đã xác định cao chiết dichloromethane rễ *Vetiveria zizanioides* cho hoạt tính ức chế MRSA ATCC 33591 bằng 1,024 mg/mL và nồng độ ức chế hình thành biofilm bằng 0,1-0,4 mg/mL (Kannappan *et al.*, 2017).

**KẾT LUẬN**

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên báo cáo về cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn cho hoạt tính ức chế biofilm trên hai chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* nhạy và kháng methicillin, với giá trị nồng độ là 0,25 mg/mL. Hơn nữa, cao phân đoạn này còn thể hiện khả năng hợp lực với kháng sinh cefoxitin cho hoạt tính ức chế MRSA, giảm giá trị MIC của cefoxitin xuống 128 lần. Điều này chứng tỏ tiềm năng của cao phân đoạn Trâm Tròn trong liệu pháp kháng khuẩn mới.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Brambilla LZS, Endo EH, Cortez DAG, Dias Filho BP (2017). Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27(1): 112-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.008>

de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock RE (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol* 16(5): 580-589.

Imran M, Imran M, Khan S (2017). Antibacterial activity of *Syzygium cumini* leaf extracts against multidrug resistant pathogenic bacteria. *J App Pharm Sci* 7(03): 168-174.

Issam AA, Zimmermann S, Reichling J, Wink M (2015). Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomed* 22(2): 245-255.

Kannappan A, Gowrishankar S, Srinivasan R, Pandian SK, Ravi AV (2017). Antibiofilm activity of *Vetiveria zizanioides* root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathogen* 110, 313-324.

Kuok CF, Hoi SO, Ho CF, Chan CH, Fong IH, Ngok CK,... Fong P (2017). Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. *Exper Biol Med* 242(7): 731-743.

- Larsson M, Kronvall G, Chuc NT, Karlsson I, Lager F, Hanh HD,... Falkenberg T (2000). Antibiotic medication and bacterial resistance to antibiotics: a survey of children in a Vietnamese community. *Trop Med Int Health* 5(10): 711-721. doi: 10.1046/j.1365-3156.2000.00630.x
- Lowrence RC, Subramaniapillai SG, Ulaganathan V, Nagarajan S (2019). Tackling drug resistance with efflux pump inhibitors: from bacteria to cancerous cells. doi: 10.1080/1040841x.2019.1607248
- Mataraci E, Dosler S (2012). *In vitro* activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agent Chemoth* 56(12): 6366-6371.
- Memariani H, Memariani M, Ghasemian A (2019). An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* 35(9): 143.
- Quave CL, Estevez-Carmona M, Compadre CM, Hobby G, Hendrickson H, Beenken KE, Smeltzer MS (2012). Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS One* 7(1): e28737. doi: 10.1371/journal.pone.0028737
- Quelemes PV, Perfeito ML, Guimaraes MA, dos Santos RC, Lima DF, Nascimento C,... Leite JR (2015). Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. *J Ethnopharmacol* 175: 287-294. doi: 10.1016/j.jep.2015.09.026
- Stewart PS, Costerton JW (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276): 135-138.
- Thanh MTNL (2019). Thu nhận và sàng lọc cao chiết ethanol từ thực vật mọc tại Bình Dương có hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA). *Sở Khoa Học Và Công Nghệ Tỉnh Bình Dương*.
- Wayne P (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100-S20, 100-121.
- White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA (1996). Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agent Chemoth* 40(8): 1914-1918.

## THE ANTI-BIOFILM EFFECT OF THE ETHYLACETATE OF *SYZYGIIUM GLOMERATUM* ON THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Mai Thị Ngọc Lan Thanh<sup>1,2\*</sup>, Dương Chí Ái<sup>2</sup>, Lý Hoàng Giáp<sup>2</sup>, Hoàng Anh Hoàng<sup>1</sup>, Trương Vũ Thanh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ho Chi Minh City University of Technology

<sup>2</sup> Thu Dau Mot University

### SUMMARY

*Staphylococcus aureus* infections are a major health problem and a challenge in hospital-acquired infections. Nowadays, this strain is appearing a lot of mechanisms which resist antibiotic and causing a high mortality rate, Using drugs of natural origin in the treatment of antibiotic-resistant infections are studying. The ethanol extract from *Syzygium glomeratum* has been published the potency of anti-*Staphylococcus aureus* and partial synergy with vancomycin. In this study, the fractions of ethanol extract of *Syzygium glomeratum* are accumulated through the liquid-liquid extract method in which the solvents are used to follow the increase of polarization (hexane, ethylacetate). The minimum inhibitory concentration (MIC) of the fraction is determined by using the microdilution method. On the other hand, study of resistance to biofilm formation on methicillin antibiotic (MSSA ATCC6538) and methicillin antibiotic (MRSA ATCC33591) of 2 staphylococcus aureus strains by crystal violet staining were also carried out. As the results, two fractions from the ethanol extract of *Syzygium glomeratum* were collected, the highest antibacterial activity was detected at the ethyl acetate fraction with MIC of 0.5 mg/mL for MSSA and 1 mg/mL for MRSA. Further, our result is first report of the anti-biofilm effect of ethyl acetate fraction of *Syzygium glomeratum* with the inhibitive concentration of 0.25 mg/mL. The plant extracts having antibacterial activity, and the target on MRSA is biofilm information. This proves the usefulness of plants against bacterial infection to humans.

**Keywords:** MSSA, MRSA, *Syzygium*, antibacterial activity, biofilm.

\* Author for correspondence: Tel: +84-947361139; Email: thanhmtnl@tdmu.edu.vn