

XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN, KHÁNG ĐỘC TÍNH VÀ KHÁNG BIOFILM TRÊN CHỦNG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CỦA CAO PHÂN ĐOẠN ETHYL ACETATE CÂY CÒ KE (*GREWIA ASIATICA* L)

Mai Thị Ngọc Lan Thanh^{1,2*}, Huỳnh Tấn Hưng², Nguyễn Sang²,
Nguyễn Thảo Vy², Hoàng Anh Hoàng¹, Trương Vũ Thanh¹

¹ Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

² Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) là một trong những vi khuẩn gây bệnh nhiễm trùng ở người và động vật. β -hemolysin là một độc tố chính của chủng *S. aureus*. Độc tố này được xem là đích tác động tiềm năng cho việc nghiên cứu phát triển các loại thuốc kháng khuẩn *S. aureus*. Gần đây, nhóm nghiên cứu đã công bố những kết quả liên quan đến hoạt tính kháng khuẩn từ cao chiết từ các loại thực vật có hoạt tính kháng khuẩn tốt như *Syzygium glomeratum*, *Grewia asiatica*, *Barleria lupulina* Lindl, *Carallia brachiata* kháng lại MRSA. Trong nghiên cứu này, hai phân đoạn từ cao chiết tổng ethanol từ cây Cò ke được thu nhận bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng. Phương pháp vi pha loãng được thực hiện để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của phân đoạn kháng MRSA. Đồng thời, khả năng kháng độc tính và kháng biofilm của phân đoạn Cò Ke được xác định bằng phương pháp nuôi chủng vi khuẩn trên môi trường thạch máu và thử nghiệm bắt màu crystal violet của biofilm. Kết quả cho thấy, giá trị MIC của cao phân đoạn Ethyl acetate cây Cò ke kháng MRSA là 2,01 mg/mL. Thêm vào đó, kết quả kháng biofilm trên hai chủng MSSA và MRSA ở nồng độ phân đoạn ethylacetate lần lượt bằng 2,01 mg/mL và 0,2513 mg/mL. Với kết quả này, lần đầu tiên hoạt tính ức chế biofilm và hoạt động ức chế độc tính tan huyết β -hemolysin trên hai chủng MSSA và MRSA của cao phân đoạn Cò ke được báo cáo. Điều này chỉ ra tiềm năng thuốc của cao chiết phân đoạn Cò Ke (*Grewia asiatica* L.)

Từ khóa: MSSA, MRSA, *Grewia asiatica* L., hoạt tính kháng khuẩn, kháng biofilm.

MỞ ĐẦU

Staphylococcus aureus (tụ cầu vàng, viết tắt *S. aureus*) là vi khuẩn gram dương được tìm thấy ở đường hô hấp, da người. *S. aureus* có thể gây ra một loạt các bệnh nguy hiểm ví dụ như: nhiễm trùng da nhỏ, viêm mô tế bào, viêm nang lông, hội chứng da bị bỏng và áp xe, viêm phổi, viêm màng não, viêm tủy xương, viêm nội tâm mạc, nhiễm trùng huyết (Schlecht *et al.*, 2015). Tại Việt Nam, theo số liệu thống kê từ 1999 - 2001, trong số 16 vi khuẩn gây bệnh thường gặp thì tỷ lệ nhiễm *S. aureus* chiếm 18,5 - 21,7% (Lê, 2002). Nghiên cứu tại Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh cho thấy trong tổng số 293 chủng *S. aureus* được nghiên cứu, nhóm tác giả đã xác định được 49,7% chủng MRSA (Trang, Lan, Ninh, & Nghĩa, 2014). mặt khác, việc sử dụng kháng sinh tràn lan dẫn đến hình thành chủng *S. aureus* kháng kháng sinh, và tình trạng này đang là một trong những vấn đề được các nhà khoa học quan tâm. Đứng trước tình hình các chủng vi khuẩn nhất là *S. aureus* đang dần biến đổi trở nên nguy hiểm hơn thì việc tìm ra các loại kháng sinh mới để điều trị là điều vô cùng cần thiết. Đặc biệt là các loại kháng sinh có nguồn gốc từ thực vật đang được chú trọng quan tâm trên toàn thế giới, do các loại thuốc hay kháng sinh được chiết suất từ thực vật thường ít hoặc không gây ra tác dụng phụ khi điều trị bệnh. Việt Nam có một thảm thực vật vô cùng đa dạng và phong phú. Từ xưa đến nay người dân trên khắp các vùng ở Việt Nam đã tận dụng nguồn thực vật phong phú để để phòng, điều trị bệnh, trong đó có vô số thực vật có cho hoạt chất kháng khuẩn cao. Với vô số loài được sử dụng làm thuốc, theo ghi nhận năm 2012 có khoảng 4.700 loài được sử dụng làm thuốc được ghi nhận trong “*Từ điển cây thuốc Việt Nam*” (Võ, 2012) và nhiều loài chưa được thống kê. Các nhà khoa học trong và ngoài nước cũng đang quan tâm nghiên cứu tình trạng kháng thuốc của các chủng vi khuẩn, trong đó có *S. aureus*, và cơ chế kháng thuốc của nó. Các nghiên cứu liên quan của tác giả Maia và đồng tác giả (2020) đã tiến hành nghiên cứu khả năng của cao chiết từ loài thực vật *Butia odorata* Barb. Rodr kháng lại các tế bào vi khuẩn trong biofilm và dạng tự do (planktonic). Kết quả cho thấy giá trị MIC thấp nhất từ 2,8 mg/mL (Maia *et al.*, 2020). Năm 2020, Sujogya Kumar Panda và đồng tác giả đã khảo sát hoạt tính kháng khuẩn *S.aureus* kháng đa thuốc bao gồm biofilm từ cao chiết các loài dược liệu truyền thống từ Ấn Độ. Kết quả chỉ ra một loài từ chi Trâm là *Syzygium praecox* (Roxb.) Rathakr. & N.C. Nair cho hoạt tính kháng chủng *S. aureus* ATCC 6538 với giá trị MIC là 1,019 mg/mL (2020). Căn cứ vào các nghiên cứu trong và ngoài nước về hoạt tính dược tiềm năng của thực vật 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 M.T.N.L, 2019), kết quả cho thấy hoạt tính kháng *S.aureus* kháng methicillin tốt từ cao tổng ethanol Cò Ke, do đó dự đoán được tiềm năng dược lý của các hoạt chất kháng khuẩn có gốc tự nhiên và rất lớn. Đó là lý do chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “Xác định hoạt tính kháng khuẩn, kháng độc tính và kháng biofilm trên chủng *Staphylococcus aureus* của cao phân đoạn Ethyl acetate cây Cò Ke (*Grewia asiatica* L)”. Kết quả nghiên cứu mở ra một liệu pháp điều trị vi khuẩn đa kháng thuốc, và ức chế các kiểu hình đa kháng thuốc ở vi khuẩn bằng các loại thuốc có nguồn gốc từ thực vật trong tương lai

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn MSSA ATCC 6538 và MRSA ATCC 33591 (Microbiologics, USA) 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 - 24 giờ.

Nguyên liệu và xử lý nguyên liệu

Phương pháp thu nhận cao ethanol thực vật: Sinh khối tươi thực vật (lá, hoa, 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 ± 3 m, và được phân loại, lưu mẫu tại bộ môn Sinh học ứng dụng, Đại học Thủ Dầu Một. Sau khi thu hái về được rửa bằng nước cất sạch bụi bẩn, để khô tự nhiên trong điều kiện phòng thí nghiệm, thực vật được nghiền bằng máy xay FY 130, tốc độ máy 34.000 vòng/phút, kích thước mắt lưới 0,074 - 0,25 mm. 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), sau thời gian 24 giờ sẽ thu một lần, và chiết kiệt trong vòng 1 tuần. Tỷ lệ chiết (ethanol: sinh khối thực vật khô) 2 lít: 50g, chiết lặp lại 3 lần. Dung dịch thu được sẽ được lọc qua giấy lọc Whatman đường kính 110 mm, với kích thước lỗ lọc 20 - 25 µm, dịch lọc thu được sẽ được cô cao bằng máy cô quay ở 50°C, trong vòng 2 - 3 giờ, sau đó cao sệt sẽ được để trong tủ sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi.

Phương pháp thu cao phân đoạn, khảo sát hoạt tính kháng khuẩn MSSA của phân đoạn

Cao ethanol được trích lỏng-lỏng thành các pha nhỏ hơn rồi phân chia thành các phân đoạn nhỏ để dễ dàng phân lập các tinh chất. Các pha được chia theo độ phân cực tăng dần. Hòa 1,5453 g cao ethanol thô vào 20 mL ethanol sau đó hòa dung dịch vào pha nước với tỷ lệ thể tích 20%. Sử dụng máy đánh siêu âm để hòa tan hoàn toàn dịch chiết trong vòng 3 phút. Sau đó dung dịch được khử béo, loại điệp lục bằng 100 mL n-hexane, tiến hành chiết lặp lại cho đến khi pha dung môi trong. Dịch chiết n-hexane được cô quay để loại bỏ dung môi. Dịch chiết còn lại tiếp tục chiết tiếp với 100 mL Ethyl acetate (EA) và cũng làm khan bằng Na₂SO₄. Theo quy trình trên sẽ thu được hai cao phân đoạn là cao hexane và EA.

Phương pháp vi pha loãng để xác định giá trị MIC của phân đoạn Cò Ke

Nồng độ ức chế tối thiểu được định nghĩa là nồng độ thấp nhất ức chế sự phát triển của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu bằng phương pháp pha loãng dãy nồng độ trong các ống. Sử dụng đĩa nuôi cấy 96 giếng, mỗi giếng sẽ gồm các thành phần: 100µl dịch vi khuẩn có nồng độ 10⁶ CFU/mL, chất chiết được pha loãng thành một dãy từ (4,02-0,1256)mg/mL trong nước cất tiệt trùng, môi trường lỏng Muller Hinton thêm vào để có thể tích cuối là 200µl. 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 ức chế hình thành biofilm của phân đoạn trên hai chủng vi khuẩn MSSA ATCC 6538 và MRSA ATCC 33591

Thí nghiệm này được thực hiện theo phương pháp của Mataraci và Dosler 2012 (Mataraci & Dosler, 2012) với một sửa đổi nhỏ. Mỗi nghiệm thức bao gồm 100µL dung dịch cao phân đoạn, 10µL dịch huyền phù MSSA và MRSA đã hoạt hóa qua đêm trong 24 giờ trước, 90 µL môi trường TSB + 1% glucose, và được nuôi ủ ở 35 °C trong tủ nuôi vi sinh, thể tích cuối cùng của mỗi ống nuôi là 200 µL. Sau đó, Môi trường được lọc 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 giếng trong 20 phút để cố định. Sau đó, dung môi được loại bỏ và đĩa được để khô trong 15 phút. Tiếp theo, 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 200 µl ethanol 95° trong 10 phút. Cuối cùng, dựa trên khả năng bắt màu thuốc nhuộm để xác định hoạt tính ức chế hình thành biofilm của dung dịch khảo sát trên hai chủng vi khuẩn MSSA và MRSA.

Thử nghiệm khả năng ức chế độc tính β -hemolysin từ phân đoạn trên hai chủng MSSA ATCC 6538 và MRSA ATCC 33591

Môi trường thạch máu (Blood Agar) là môi trường giàu dinh dưỡng thường được sử dụng để phát hiện những vi sinh vật khó tăng trưởng và để phân biệt dựa vào sự đặc tính tan huyết (Buxton, 2005). Khảo sát hoạt tính tan huyết là một phương pháp đơn giản nhất để quyết định vi sinh vật có sản xuất độc tố hemolysin bằng cách nuôi vi sinh vật trên môi trường thạch máu có chứa các hồng cầu (5% máu bị loại fibrin). Nếu sau vài ngày có sự đổi màu môi trường thì chứng tỏ chúng vi sinh vật có khả năng gây tan huyết. Dựa theo phương pháp của Yadahalli Shrihari Rohinishree (Rohinishree & Negi, 2016) có thay đổi ở một số chi tiết như sau: trên đĩa 96 giếng, mỗi giếng sẽ chứa 90 μ l môi trường Trypton Soy lỏng và 100 μ L dung dịch khảo sát có thể là cao chiết/phân đoạn/tinh chất ở các nồng độ khác nhau trên đĩa 96 giếng, sau đó chuyển mỗi giếng 10 μ l dịch vi khuẩn đã được nuôi qua đêm ở 18 - 24 h ở 37°C, có mật độ 10⁹ CFU/ml. Sau đó, đĩa 96 giếng này sẽ nuôi qua đêm ở 18 - 24 h ở 37°C. Tiếp theo, chọn những giếng có sự ức chế vi khuẩn, hút 5 μ L dịch trong giếng đặt trong môi trường thạch máu và ủ ở 37°C, 24 giờ, 5 % CO₂, trong tủ nuôi tế bào. Sự ly giải tế bào hồng cầu máu (hình thành vòng) chỉ ra hoạt tính tan huyết của chúng vi khuẩn kiểm tra. Hiệu suất ly giải tế bào hồng cầu bởi chủng MSSA và MRSA được xác định thông qua đường kính vòng phân giải. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu suất ly giải càng giảm chứng tỏ hoạt tính ức chế sinh độc tính hemolysin từ hai chủng vi khuẩn MSSA và MRSA khảo sát.

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

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

Thu cao phân đoạn


Thu cao phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng nhằm mục đích chia cao ethanol ban đầu hoặc dịch chiết ban đầu thành các phân đoạn nhỏ với độ phân cực khác nhau. Ở nghiên cứu này dung môi sử dụng để chiết phân đoạn cao ethanol Cò Ke thô là hexan và Ethyl acetate. Hiệu suất của quá trình chiết cao ethanol Cò ke được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Hiệu suất chiết phân đoạn từ cao Ethanol Cò ke thô

Phân đoạn	Khối lượng phân đoạn (g)	Hiệu suất (%)
Hexan	0,0192 (0,1717)	11,18
Ethyl acetate	0,0798 (0,1717)	46,48
Tổng hiệu suất chiết phân đoạn: H = 11,18 + 46,48 = 57,66 (%)		

Từ cao ethanol Cò ke sau sử dụng phương pháp chiết lỏng-lỏng với hai loại dung môi n-hexane và Ethyl acetate chiết suất. Sau chiết suất thu được hai loại cao hexan và Ethyl acetate với hiệu suất chiết lần lượt là 11,18% và 46,48%. Tổng hiệu suất chiết xuất của cả quá trình chiết là 57,66%. Từ kết quả được trình bày ở trên, có thể thấy được hiệu suất chiết cũng như khối lượng chất chiết xuất từ cao ethanol trong phân đoạn ethyl acetate là vượt trội hơn phân đoạn hexan. Vì vậy, có thể trong phân đoạn Ethyl acetate sẽ có nhiều hoạt chất hơn phân đoạn hexan và có thể mang lại nhiều hoạt tính sinh học hơn đặc biệt là hoạt tính kháng khuẩn. Cao phân đoạn Cò ke sau khi chiết suất được tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn đối với chủng *S. aureus* nhằm xác định được khả năng kháng khuẩn của Cò ke, đồng thời chứng minh các chất chiết được từ cao ethanol nằm trong mỗi phân đoạn có cho hoạt tính kháng khuẩn. Thực hiện khảo sát định tính khả năng kháng khuẩn các cao phân đoạn Cò ke bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch Kirby-Bauer. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của 2 loại cao Cò ke là n-hexane và Ethyl acetate được biểu thị trong Bảng 3.4. Với kết quả sau khi tiến hành khảo sát, phân đoạn Ethyl acetate có cho hoạt tính kháng khuẩn với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 13 mm, phân đoạn hexan không cho hoạt tính kháng khuẩn.

Bảng 2. Kết quả khảo sát bằng phương pháp khuếch tán đĩa khuếch tán đĩa

Cao phân đoạn	Kích thước vòng kháng khuẩn (mm)	
Hexan	-	 <p>1: DMSO: 20%, 2: phân đoạn hexan, 3: phân đoạn ethylacetate trên chủng MRSA (kích thước giếng 4 mm)</p>
Ethyl acetate	13,17 \pm 0,29	

Hoạt tính kháng khuẩn *S. aureus* và *MRSA*

Sau khi xác định hoạt tính kháng khuẩn của phân đoạn bằng phương pháp định tính các cao phân đoạn Cò ke, xác định được khả năng kháng khuẩn của phân đoạn EA. Phân đoạn EA được lựa chọn để tiến hành khảo sát giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên chủng chủng *S. aureus* và *MRSA* bằng phương pháp vi pha loãng trên đĩa 96 giếng. Kết quả phân đoạn EA có cho hoạt tính kháng khuẩn với nồng độ ức chế tối thiểu trên cả hai chủng MSSA và *MRSA* là 2,01 mg/mL, còn phân đoạn hexan không cho hoạt tính kháng khuẩn. Như vậy, trên thế giới cũng có nhiều nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của phân đoạn ethyl acetate thuộc nhiều loại cây khác nhau. Kết quả nghiên cứu phân đoạn cây *Combretum erythrophyllum* của nhóm tác giả Fanyana M. Mtunzi năm 2017. Có thể thấy được nồng độ ức chế tối thiểu của phân đoạn Ethyl acetate cây *Combretum erythrophyllum* đối với chủng *S.aureus* là 0,320 mg/mL (Mtunzi *et al.*, 2017). Một nghiên cứu khác của nhóm tác giả SE Nugraha thì phân đoạn Ethyl acetate chiết suất từ vỏ quả chanh dây (*Passiflora edulis Sims*) năm 2019 cho thấy nồng độ tối thiểu cho khả năng kháng khuẩn đối với chủng *S. aureus* là 12,5 mg/mL (Nugraha, Achmad, & Sitompul, 2019). So sánh kết quả trong thí nghiệm đã thực hiện với các nghiên cứu khác thì có thể thấy được rằng phân đoạn Ethyl acetate Cò ke có cho hoạt tính kháng khuẩn nhưng nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của phân đoạn này không quá thấp. Sau khi khảo sát MIC, phân đoạn Ethyl acetate Cò ke có cho hoạt tính ở nồng độ 2,01 mg/mL và nồng độ này cho thấy khả năng kháng khuẩn tương đối tốt. Như vậy, phân đoạn Ethyl acetate có tiềm năng được sử dụng như chất bổ trợ để phối hợp với nhiều loại kháng sinh khác để điều trị các chứng liên quan đến *Staphylococcus aureus*.

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	Ck EA (8,04 mg/ml, DMSO 20%)					
E	TSB	TSB+VK	DMSO 20%	DMSO 10%	cefexitin (µg/mL)							
F	Ck Ea											

Bảng 3. Kết quả hoạt tính ức chế vi khuẩn của cao phân đoạn ethylacetate Cò Ke trên 96 giếng

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

(-): không có sự phát triển vi khuẩn; (+) có sự phát triển của vi khuẩn



Hình 1. Khảo sát hoạt tính ức chế vi khuẩn của cao phân đoạn Ethyl acetate Cò Ke trên 96 giếng

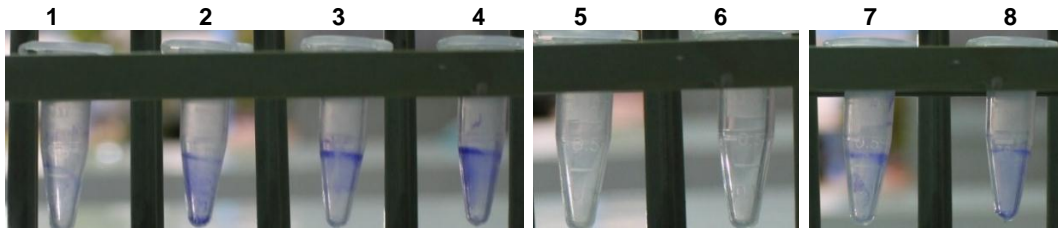
Theo các nghiên cứu trước, Zia-UI-Haq và đồng tác giả (2012) xác định cao chiết lá của Cò Ke (*Grewia asiatica* L.) có khả năng kháng khuẩn *S. aureus* và do đó được sử dụng trong điều trị phát ban và vết thương mủ (Zia-UI-Haq *et al.*, 2011; Zia-UI-Haq *et al.*, 2012). Điều này có thể chứng minh tính tương đồng của nghiên cứu này với các nghiên cứu khác trên thế giới, hơn nữa điểm mới trong nghiên cứu ở cao chiết Cò Ke là thu nhận tới phân đoạn và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trên chủng *S. aureus* kháng methicillin (*MRSA*). Đồng thời sử dụng phương pháp vi pha loãng nhằm xác định giá trị MIC của cao phân đoạn trên hai chủng vi khuẩn khảo sát, thêm nữa là có xác định đích tác động trong những thử nghiệm sau như khảo sát khả năng ức chế hình thành biofilm và ức chế tiết độc tính β-hemolysin.

Xác định khả năng ức chế hình thành biofilm của phân đoạn trên hai chủng vi khuẩn MSSA và *MRSA*

Cao phân đoạn Cò Ke sau khi khảo sát hoạt tính kháng MSSA và *MRSA* với giá trị MIC bằng 2,01 mg/mL. Tiếp tục được tiến hành trên eppendorf để khảo sát khả năng ức chế hình thành biofilm, kết quả biofilm được hình thành khi có sự bắt màu thuốc nhuộm crystal violet. Kết quả được trình bày ở Hình 2 và Hình 3., giá trị MIC của cao phân đoạn Ethyl acetate ức chế sự hình thành biofilm trên chủng MSSA là 2.01 mg/mL và nồng độ của cao phân đoạn ức chế sự hình thành biofilm trên *MRSA* bằng 0,2513 mg/mL.

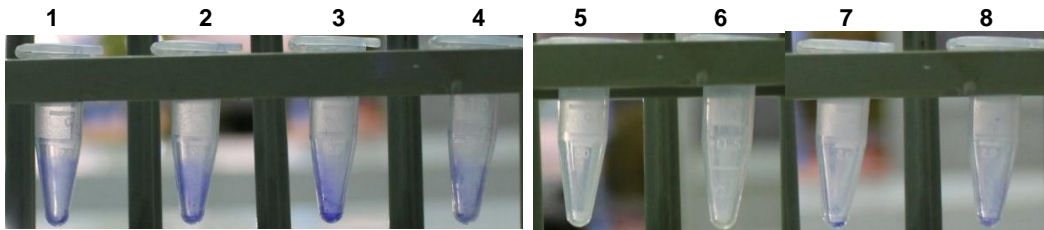
Khả năng ức chế độc tính β-hemolysin từ cao chiết phân đoạn trên hai chủng MSSA và *MRSA*

Hai chủng MSSA ATCC 6538 và *MRSA* ATCC 33591, thông qua vòng tan huyết của hai chủng vi khuẩn trên môi trường thạch máu, kết quả được trình bày ở Hình 4.



Hình 2. Ức chế hình thành biofilm từ phân đoạn Ethyl acetate của Cò Ke trên chủng MSSA ATCC 6538

1: DMSO 20%, 2: DMSO 10%, 3: Cefoxitin 2 µg/mL, 4: cefoxitin 1 µg/mL, 5;6;7;8: phân đoạn ethyl acetate Cò Ke (có nồng độ (mg/mL) lần lượt bằng 4,02; 2,01; 1,005; 0,5025).



Hình 3. Ức chế hình thành biofilm từ phân đoạn Ethyl acetate của Cò Ke trên chủng MRSA ATCC 33591

1: DMSO 20%, 2: DMSO 10%, 3: Cefoxitin 2 µg/mL, 4: cefoxitin 1 µg/mL, 5;6;7;8: phân đoạn ethyl acetate Cò Ke (có nồng độ (mg/mL) lần lượt bằng 4,02; 2,01; 0,2513; 0,1256). Kết quả có sự hình thành biofilm khi có bắt màu xanh, không sự hình thành biofilm khi ko có sự bắt màu



MSSA



MRSA

E2-E3-E4: Đối chứng (E2: TSB và vi khuẩn, E3: TSB+vi khuẩn+Dung dịch pha cao phân đoạn DMSO 20%, E4: TSB+vi khuẩn+Dung dịch pha cao phân đoạn DMSO 10%).
F1-F2-F3: phân đoạn Ea Cò Ke (F1: nồng độ 4,02 mg/mL, F2: 2,01 mg/mL, F3: 1,005 mg/mL.)

Kích thước vòng tan huyết (mm)					
E2	E3	E4	F1	F2	F3
12 ± 0,00	11,5 ± 0,00	12 ± 0,35	8,5 ± 0,35	10 ± 0,00	11 ± 0,35

Hình 4. Cao tổng ethanol và phân đoạn Cò Ke cho hoạt tính ức chế độc tính tan huyết trên hai chủng MSSA và MRSA

Dựa vào Hình 4. Kết quả chỉ ra rằng Cao phân đoạn ethylacetate Cò Ke cho hoạt tính ức chế tiết β -hemolysin trên chủng vi khuẩn khảo sát dựa trên kích thước vòng tan huyết bằng 8,5 mm đến 11 mm lần lượt ở nồng độ 4,02 mg/mL-1,005 mg/mL nhỏ hơn so với kích thước vòng tan huyết đối chứng là 12 mm (chỉ có vi khuẩn nuôi trong môi trường TSB). Chính vì vậy, bước đầu xác định cao phân đoạn ethylacetate Cò Ke cho khả năng ức chế hoạt tính tan huyết trên chủng MSSA và MRSA.

KẾT LUẬN

Phân đoạn Ethyl acetate Cò Ke cho hoạt tính kháng khuẩn MSSA và MRSA với giá trị MIC bằng 2,01 mg/mL. Phân đoạn này cũng cho hoạt tính ức chế biofilm trên chủng MRSA với nồng độ 0,2513 mg/mL. Lần đầu tiên hoạt tính ức chế độc tính tan huyết β -hemolysin trên hai chủng MSSA và MRSA của cao phân đoạn Cò ke lần đầu tiên được báo cáo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Buxton R (2005). Blood agar plates and hemolysis protocols. *American Society for Microbiology*.

Lê ĐH (2002). Một số công trình nghiên cứu về mức độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh năm 2001-2002. 128: 122.

Maia DSV, Haubert L, Kroning IS, dos Santos Soares K, Oliveira TL, da Silva WP (2020). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks and effect of *Butia odorata* Barb. Rodr. Extract on planktonic and biofilm cells. *LWT* 117: 108685.

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.

- Mtunzi FM, Ejidike IP, Ledwaba I, Ahmed A, Pakade VE, Klink MJ, Modise SJ (2017). Solvent–solvent fractionations of *Combretum erythrophyllum* (Burch.) leave extract: Studies of their antibacterial, antifungal, antioxidant and cytotoxicity potentials. *Asian Pacific J Trop Med* 10(7): 670-679.
- Nugraha SE, Achmad S, Sitompul E (2019). Antibacterial Activity of Ethyl Acetate Fraction of Passion Fruit Peel (*Passiflora Edulis* Sims) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Indo J Pharma Clin Res* 2(1): 07-12.
- Panda SK, Das R, Lavigne R, Luyten W (2020). Indian medicinal plant extracts to control multidrug-resistant *S. aureus*, including in biofilms. *South Afr J Bot* 128: 283-291.
- Rohinishree YS, Negi PS (2016). Effect of licorice extract on cell viability, biofilm formation and exotoxin production by *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci Technol* 53(2): 1092-1100.
- Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hänsch GM, Filler SG, . . . Shirtliff ME (2015). Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiol* 161(Pt 1): 168.
- 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*.
- Trang PNH, Lan VLN, Ninh UNĐ, Nghĩa CH. (2014). Khảo sát tỉ lệ kháng kháng sinh và gen quy định độc tố exfoliative toxins của các chủng *Staphylococcus aureus* phân lập tại Viện Pasteur TP. HCM. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* 19(3T): 15-23.
- Võ VC (2012). Từ điển cây thuốc Việt Nam. *Nhà xuất bản Y học*.
- Wayne P (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. *CLSI* document M100-S20: 100-121.
- Zia-Ul-Haq M, Ahmad M, Jehan N, Ahmad S, Qayum M, Marwat KI (2011). Antimicrobial screening of selected flora of Pakistan. *Arch Biol Sci* 63(3): 691-695.
- Zia-Ul-Haq M, Shahid SA, Muhammed S, Qayum M, Khan I, Ahmad S. (2012). Antimalarial, antiemetic and antidiabetic potential of *Grewia asiatica* L. leaves. *J Med Plant Res* 6(16): 3087-3092.

ANTIBACTERIAL, ANTI B-HEMOLYSIN, AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF THE ETHYLACETATE FRACTION OF *GREWIA ASIATICA* L. AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Thanh Thi Ngoc Lan Mai^{1,2*}, Hung Tan Huynh², Sang Nguyen², Vy Thao Nguyen², Hoang Anh Hoang¹, Thanh Vu Truong¹

¹ Ho Chi Minh City University of Technology

² Thu Dau Mot University

SUMMARY

The bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is one of the major causes of infections in humans and animals. The β -hemolysin is a main toxin of *S. aureus* which is an ideal target for the development of agents for treatment of *S. aureus*. Recently, we reported a high antibacterial activity of extracts from *Syzygium glomeratum*, *Grewia asiatica*, *Barleria lupulina* Lindl, *Carallia brachiata* plants against MRSA *in vitro*. This study was designed to collect two fractions from ethanol extract of *Grewia asiatica* L by the liquid-liquid extraction method. The broth microdilution method was carried out to determine minimum inhibitory concentration (MIC) fractions against MRSA. Besides, the evaluation of antivirulence and antibiofilm of the active fraction was determined using cultured in the blood agar and crystal violet biofilm assay. The results show that MIC value of ethyl acetate fraction from *Grewia asiatica* L. was 2.01 mg/mL. In addition, the antibiofilm activity of ethyl acetate fraction was 2.01 mg/mL and 0.2513 mg/mL for MSSA and for MRSA, respectively. The antibiofilm and anti β -hemolysin activities of the fraction from extract of *Grewia asiatica* L were firstly reported. This indicates the medicinal potential of the *Grewia asiatica* L. fraction extract.

Keywords: MSSA, MRSA, *Grewia asiatica* L, anti-bacterial, anti-biofilm activity.

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