

LY TRÍCH TINH DẦU TRÀM TRÀ (*Melaleuca alternifolia*) VÀ ỨNG DỤNG TRONG KHÁNG *Staphylococcus aureus* KHÁNG KHÁNG SINH

Lê Thanh Khang^{1*}, Nguyễn Thị Thu Hương², Lê Thị Thủy Tiên³

¹ Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có dầu

² Bộ môn Dược lý - Sinh hóa, Trung tâm Sâu và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu

³ Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Kỹ thuật hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Staphylococcus aureus kháng methicillin (MRSA) được mô tả có một khả năng đáp ứng nhanh chóng với từng nhóm kháng sinh mới với sự phát triển một cơ chế đề kháng, từ penicillin và methicillin, đến vancomycin và teicoplanin, và cho đến gần nhất là linezolid và daptomycin. Nghiên cứu này công bố kết quả khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng kháng sinh của tinh dầu tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) thu hái ở Long An. Trong nghiên cứu này, tinh dầu tràm có khả năng kháng mạng MRSA được chọn lọc bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Tinh dầu lá tràm trà được ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước đạt hiệu suất 6,42%. Tinh dầu tràm trà thể hiện hoạt tính ức chế *S. aureus* kháng kháng sinh với đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất tại nồng độ tinh dầu tràm trà là 100 $\mu\text{L/mL}$, đạt kích thước 27,3 mm so với đối chứng là 19,0 mm. Kết quả này góp phần tạo hướng ứng dụng mới cho tinh dầu Tràm trà, qua đó giúp tăng giá trị cây Tràm trà ở Việt Nam.

Từ khóa: Kháng khuẩn, *Melaleuca alternifolia*, *Staphylococcus aureus* kháng kháng sinh, tinh dầu tràm trà.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, hầu hết các dòng *Staphylococcus aureus* kháng với nhiều loại kháng sinh khác nhau. Một vài dòng kháng với tất cả các loại kháng sinh ngoại trừ vancomycin và những dòng *S. aureus* kháng kháng sinh ngày càng tăng. Ngoài ra, *S. aureus* còn kháng với chất khử trùng và chất tẩy uế. Việc thay thế kháng sinh cũ bằng vancomycin đã dẫn đến sự gia tăng các dòng kháng vancomycin VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) (Kenneth, 2005). Theo báo cáo của Đoàn Mai Phương (2017), vi khuẩn Gram âm kháng thuốc đã xuất hiện trên cả nước. Chủ yếu các dòng *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* và *P. aeruginosa*. Trong đó, *A. baumannii* và *P. aeruginosa* có tỷ lệ đề kháng cao nhất, có những nơi đề kháng tới trên 90%. Đồng thời, các nhóm vi khuẩn *A. baumannii* và *P. aeruginosa* đã mang hầu hết các loại gen mã hóa kháng thuốc. Bao gồm các gen mã hóa sinh ESBL như TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER hay gen mã hóa sinh carbapenemase như blaKPC, OXA, NDM-1, VIM, IMP, GIM (Đoàn Mai Phương, 2017). Trước tình hình các dòng kháng kháng sinh của *Staphylococcus aureus* (MRSA) ngày một tăng lên đặt ra nhiều vấn đề trong chế tạo chất kháng khuẩn có hiệu lực mạnh hơn nhằm thay thế các thuốc kháng sinh cũ. Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc kháng sinh với tác dụng mạnh có mang lại một số tác dụng phụ không mong muốn. Bên cạnh các thuốc kháng sinh thương mại, trong tự nhiên đã có nhiều loài thực vật cũng có tác dụng kháng khuẩn cao được sử dụng rộng rãi. Cây tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) thuộc họ Sim (*Myrtaceae*), có nguồn gốc từ Australia (Maiden, Betche, 1924). Tinh dầu của cây tràm trà chứa các thành phần chính gồm terpinen-4-ol ($\geq 30\%$), γ -terpinene (10 - 28%), α -terpinene (5 - 13%), 1,8-cineole ($\leq 15\%$) từ lâu đã được nghiên cứu và sử dụng ở nhiều nơi trên thế giới cho mục đích trị liệu và làm đẹp (Brophy et al., 1989). Ngoài ra, tinh dầu tràm trà dùng để điều trị vết cắt, bỏng, trầy xước hay mụn trứng cá, thuốc sát trùng, chất khử mùi, dầu gội và xà phòng trong sản xuất mỹ phẩm (Hammer, 2006). Bên cạnh đó, tinh dầu tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên các dòng *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (MIC 0,04%) và đặc biệt trên các vi khuẩn gây hại răng miệng như *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* (Beylier, 1979; Longstaff, 1987). Từ những nghiên cứu trên, việc sản xuất thuốc diệt khuẩn kháng kháng sinh *Staphylococcus aureus* (MRSA) là cần thiết. Bên cạnh đó, việc khai thác khả năng kháng khuẩn từ nguồn hợp chất tự nhiên góp phần hạn chế lạm dụng thuốc kháng sinh. Vì vậy, nghiên cứu ly trích tinh dầu tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) và ứng dụng trong kháng *Staphylococcus aureus* kháng kháng sinh (methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*/ MRSA) được thực hiện.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Nguyên liệu được dùng trong nghiên cứu là lá và thân non tràm trà được thu mua trực tiếp tại vườn tràm trà huyện Mộc Hóa, tỉnh Long An vào tháng 03/2019 (Khang et al., 2019). Khối lượng nguyên liệu: 20 kg. Tình trạng nguyên liệu: còn tươi, không dập nát hay thối hỏng. Dòng vi khuẩn sử dụng trong thử nghiệm: *Staphylococcus aureus* kháng kháng sinh (MRSA) được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật hóa học, Trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

Xác định độ ẩm nguyên liệu

Xác định mất khối lượng do làm khô được tiến hành theo Dược điển Việt Nam V (phụ lục 9.6 trang 203), đối với mẫu nguyên liệu khô khối lượng mất do làm khô không quá 13%.

Ly trích tinh dầu trầm trà bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Trong nghiên cứu này, phương pháp chiết lỏng - lỏng được áp dụng để chiết tinh dầu ra khỏi hỗn hợp gồm tinh dầu và nước sau khi chưng cất lôi cuốn hơi nước. Dung môi được chọn để chiết tinh dầu là diethyl ether do có ưu điểm là hòa tan tốt các cấu tử trong tinh dầu, rất ít tan trong nước nên dễ dàng tách lớp, nhiệt độ sôi thấp (xấp xỉ 36°C) nên dễ dàng thu hồi dung môi. Cân 50 g nguyên liệu tươi đã xay nhuyễn với kích thước bột nguyên liệu qua rây có đường kính lỗ 0,6 mm và cắt nhỏ nguyên liệu từ 3 – 5 cm đối với nguyên liệu không xay, cho vào bình cầu chưng cất dung tích 1.000 mL, thêm vào bình cầu 500 mL dung dịch NaCl, ngâm nguyên liệu khoảng 30 phút. Lắp bình cầu vào hệ thống chưng cất lôi cuốn hơi nước, chưng cất để thu tinh dầu từ hỗn hợp trên, bình cầu được đun nóng bằng bếp điện với nhiệt độ cố định là 100°C. Khi hỗn hợp sôi, hơi nước tạo thành sẽ lôi cuốn hơi tinh dầu bay lên và đi vào hệ thống ngưng tụ. Sau khi ngưng tụ sẽ thu được một hỗn hợp lỏng gồm nước và tinh dầu. Thu lấy hỗn hợp và cho vào bình chiết, chiết năm lần, mỗi lần chiết với 10 mL diethyl ether. Sau đó, gom toàn bộ dịch chiết và làm khan dịch chiết bằng muối Na_2SO_4 khan. Dịch chiết sau khi làm khan được cô quay và thu hồi dung môi ở 55°C dưới áp suất kém, thu được sản phẩm tinh dầu. Sản phẩm tinh dầu được bảo quản ở nhiệt độ dưới 4°C trong tủ lạnh cho đến khi tiến hành khảo sát hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* kháng kháng sinh. Hiệu suất chưng cất tinh dầu H được tính theo công thức:

$$H(\%) = \frac{m}{50 \times \left(1 - \frac{w}{100}\right)} \times 100$$

Trong đó: m là khối lượng tinh dầu thu được, tính bằng gam (g). w là độ ẩm của nguyên liệu, tính bằng phần trăm (%).

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ly trích tinh dầu

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chưng cất: Trong nghiên cứu này, thời gian chưng cất tinh dầu được khảo sát lần lượt từ 60 phút đến 240 phút, mỗi lượt khảo sát tăng thêm 60 phút. Ghi nhận thể tích và tính toán hiệu suất ly trích tinh dầu theo từng khoảng thời gian khảo sát, từ đó xác định thời gian tối ưu mà tại đó hiệu suất ly trích tinh dầu cao nhất.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch NaCl: Với thời gian ly trích tối ưu đã lựa chọn, tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch muối NaCl đến hiệu suất ly trích tinh dầu bằng cách tiến hành ngâm nguyên liệu trong dung dịch NaCl lần lượt ở mỗi nồng độ từ 0 đến 20%, mỗi lượt khảo sát tăng nồng độ thêm 5%. Sau đó, chưng cất để thu tinh dầu và ghi nhận hiệu suất ly trích tinh dầu tương ứng ở mỗi nồng độ. Các yếu tố ban đầu như khối lượng nguyên liệu, thể tích dung dịch muối, nhiệt độ và thời gian chưng cất được cố định.

Khảo sát ảnh hưởng của thể tích dung dịch NaCl: Với thời gian ly trích và nồng độ dung dịch muối tối ưu đã chọn, tiếp tục cố định nhiệt độ và khảo sát quá trình ly trích tinh dầu lần lượt với những thể tích dung dịch NaCl từ 200 mL đến 500 mL, mỗi lượt khảo sát tăng thêm 100 mL. Ghi nhận hiệu suất ly trích tinh dầu ở mỗi thể tích khác nhau, từ đó lựa chọn thể tích tối ưu nhất mà tại đó hiệu suất ly trích tinh dầu cao nhất.

Khảo sát hoạt tính kháng methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) của tinh dầu trầm trà

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn được nhân mật số trong môi trường LB (tryptone 10 g, cao nấm men 5 g, NaCl 5 g, nước cất vừa đủ 1 lít) trong 24 giờ. Dịch nuôi được pha loãng với dung dịch NaCl 0,9% cho đến khi có độ đục tương đương với độ đục chuẩn 0,5 McFarland. Nếu dịch vi khuẩn không có cùng độ đục với độ đục chuẩn 0,5 McFarland, có thể điều chỉnh độ đục bằng cách cho thêm dung dịch NaCl 0,9% hoặc cho thêm vi khuẩn. Dịch vi khuẩn có độ đục tương đương độ đục McFarland được pha loãng 100 lần để được dịch vi khuẩn có nồng độ 10^6 CFU và được sử dụng cho thí nghiệm khuếch tán trên thạch. Độ đục chuẩn McFarland được sử dụng để điều chỉnh độ đục của huyền dịch nuôi cấy vi khuẩn cho thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn. Độ đục chuẩn 0,5 McFarland được chuẩn bị và kiểm định chất lượng trước khi làm thử nghiệm. Độ đục chuẩn được hàn kín để chống bay hơi và bảo quản trong bóng tối thì có thể sử dụng trong vòng 6 tháng. Độ đục chuẩn 0,5 McFarland hiện nay có sẵn trên thị trường hoặc có thể tự chuẩn bị bằng cách pha trộn theo công thức sau: Dung dịch $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1% 0,5 mL, dung dịch H_2SO_4 1% 99,5 mL. Chia vào các ống nghiệm và đậy kín để tránh bay hơi, lắc đều trước khi sử dụng để làm tan các hạt BaSO_4 kết tủa trong ống nghiệm. Kiểm tra độ chính xác của độ đục chuẩn 0,5 McFarland, độ đục được kiểm tra bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 625 nm sao cho giá trị hấp thụ quang phổ (Abs) đạt giá trị từ 0,08-0,1. Huyền dịch vi khuẩn có cùng độ đục với độ đục chuẩn 0,5 phải có số lượng vi khuẩn là 10^8 tế bào vi khuẩn/mL.

Chuẩn bị tinh dầu: Tinh dầu trầm trà được pha loãng với Tween 80 để được các nồng độ 3,125 $\mu\text{L/mL}$, 6,25 $\mu\text{L/mL}$, 12,5 $\mu\text{L/mL}$, 25 $\mu\text{L/mL}$, 50 $\mu\text{L/mL}$ và 100 $\mu\text{L/mL}$.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn: Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu trầm trà được xác định dựa trên sự hình thành vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch nhỏ tinh dầu. Dịch vi khuẩn được trải đều trên bề mặt đĩa thạch LB với thể tích dịch khuẩn là 100 μL . Tiến hành đục lỗ tạo giếng thạch và nhỏ vào giếng thạch 50 μL tinh dầu trầm trà ở các nồng độ. Đường kính vòng vô khuẩn được đo bằng thước đo đơn vị millimeter (mm) sau 24 giờ ủ mẫu ở nhiệt độ 32°C.

Thông kê phân tích số liệu

Kết quả được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0. Kết quả thí nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình cộng/trừ độ lệch chuẩn. So sánh giá trị trung bình giữa các mẫu thử sử dụng phép thử t-Student. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiệu suất ly trích của tinh dầu trầm trà

Lá và thân non trầm trà sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm và xử lý sơ bộ đã được tiến hành chiết tách tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Tinh dầu được bảo quản trong chai thủy tinh tối màu ở nhiệt độ 4°C để tiến hành thí nghiệm hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* kháng kháng sinh. Hiệu suất ly trích tinh dầu chỉ đạt 1,15%. Qua kết quả trên cho thấy, phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước dùng nguyên liệu xay sẽ cho hàm lượng tinh dầu cao hơn so với nguyên liệu không xay. Khi xay nhỏ nguyên liệu, các tế bào chứa tinh dầu bị vỡ, tinh dầu thoát ra môi trường ngoài và hơi nước chỉ có nhiệm vụ lôi cuốn tinh dầu tự do ra bình hứng. Điều này giải thích tại sao khi không xay nguyên liệu thì hàm lượng tinh dầu thu được ít.

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ly trích tinh dầu

Ảnh hưởng của thời gian ly trích: Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian ly trích đến hiệu suất ly trích tinh dầu từ 50 g lá trầm trà tươi, cố định các yếu tố như nhiệt độ, nồng độ và thể tích dung dịch NaCl. Kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian ly trích lên hiệu suất ly trích tinh dầu tinh dầu trầm trà bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Thời gian ly trích (phút)	60	120	180	240
Hiệu suất ly trích tinh dầu (%)	3,76 $\pm$ 0,13 ^b	6,42 $\pm$ 0,45^a	6,87 $\pm$ 0,40 ^a	6,69 $\pm$ 0,34 ^a

Các mẫu tự theo sau các giá trị trong cùng một hàng khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95%.

Bảng 1 cho thấy hàm lượng tinh dầu thu được phụ thuộc vào thời gian chưng cất, hàm lượng tinh dầu tăng khi thời gian chưng cất tăng và với thời gian trích ly là 120 phút, hàm lượng gần như đạt cao nhất. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu tương tự, thời gian chưng cất tối ưu được các nhóm nghiên cứu chọn đều không vượt quá 240 phút. Mặt khác, khi ly trích với thời gian lâu hơn thì lượng tinh dầu tuy thu được nhiều hơn nhưng không đáng kể. Vì vậy, để tiết kiệm thời gian, thời gian ly trích tinh dầu tối ưu được chọn là 120 phút và được cố định để tiếp tục khảo sát các yếu tố khác.

Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch muối NaCl: Với thời gian ly trích tối ưu đã được xác định như trên, việc khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ dung dịch NaCl đến hàm lượng tinh dầu thu được từ 50 g lá trầm trà tươi được thực hiện. Chưng cất để thu tinh dầu lần lượt ở những nồng độ dung dịch NaCl khác nhau, cố định thể tích dung dịch là 500 mL. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch NaCl đến hiệu suất ly trích tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Nồng độ dung dịch NaCl (%)	0	5	10	15	20
Hiệu suất ly trích tinh dầu (%)	2,52 $\pm$ 0,11 ^d	3,13 $\pm$ 0,14 ^d	4,35 $\pm$ 0,34 ^c	6,41 $\pm$ 0,22^a	5,35 $\pm$ 0,32 ^b

Các mẫu tự theo sau các giá trị trong cùng một hàng khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95%.

Từ Bảng 2, có thể thấy hàm lượng tinh dầu thu được phụ thuộc vào nồng độ dung dịch NaCl thêm vào, hàm lượng tinh dầu tăng khi nồng độ muối tăng và đạt cao nhất ở nồng độ muối là 15%. Việc thêm muối NaCl vào quá trình chưng cất nhằm mục đích tăng hiệu suất ly trích do NaCl hòa tan trong nước sẽ tạo thành dung dịch điện ly dẫn đến làm tăng nhiệt độ sôi (hay làm tăng áp suất hơi) của nước, giảm sự bay hơi của nước trong hỗn hợp; do đó, tinh dầu ly trích được nhiều hơn (Furter, Cook, 1967). Tuy nhiên, khi chưng cất với nồng độ lớn hơn, lượng tinh dầu thu được giảm, điều này có thể giải thích là do khi sử dụng muối ở nồng độ cao thì các lớp biểu bì ngoài chứa tinh dầu bị co lại, ngăn cản sự khuếch tán tinh dầu ra ngoài. Mặt khác, do làm tăng nhiệt độ sôi của nước nên việc thêm muối NaCl vào quá trình chưng cất không thể áp dụng cho những tinh dầu có nhiệt độ sôi thấp hoặc kém bền với nhiệt.

Ảnh hưởng của thể tích dung dịch NaCl: Khảo sát sự ảnh hưởng của thể tích nước cất thêm vào đến hàm lượng tinh dầu ly trích từ 50 g lá trà tươi bằng cách tiến hành chưng cất tinh dầu lần lượt với những thể tích nước khác nhau, cố định nồng độ dung dịch NaCl là 15%. Mục đích nhằm xác định thể tích nước tối ưu cho quá trình chưng cất, tránh sử dụng lượng nước quá dư, không có lợi cho việc ly trích tinh dầu do trong tinh dầu chứa nhiều hợp chất dễ tan trong nước. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thể tích dung dịch NaCl đến hàm lượng tinh dầu ly trích bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Thể tích dung dịch NaCl (mL)	200	300	400	500
Hiệu suất ly trích tinh dầu (%)	$1,19 \pm 0,25^c$	$1,63 \pm 0,04^c$	$3,17 \pm 0,05^b$	$6,11 \pm 0,24^a$

Các mẫu tự theo sau các giá trị trong cùng một hàng khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95%.

Kết quả cho thấy hàm lượng tinh dầu tăng khi thể tích nước cất cho vào bình cầu tăng, hàm lượng đạt cao nhất khi lượng nước thêm vào là 500 mL. Ngoài ra, do điều kiện tiến hành thí nghiệm không cho phép tổng thể tích dung dịch và nguyên liệu cho vào bình cầu vượt quá 2/3 thể tích bình nên không thể khảo sát ở những thể tích lớn hơn. Vì vậy, chọn 500 mL là thể tích tối ưu trong phạm vi nghiên cứu này.

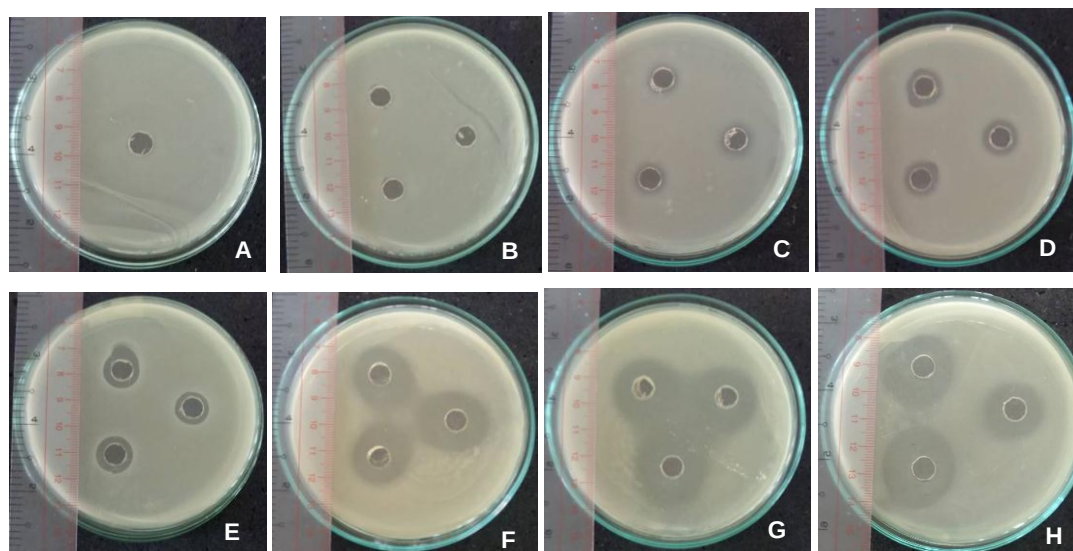
Phân tích và tổng hợp những kết quả trên, điều kiện tối ưu để ly trích tinh dầu trà bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước ở quy mô phòng thí nghiệm được đề xuất như trong Bảng 4.

Bảng 4. Điều kiện tối ưu cho quá trình ly trích tinh dầu lá trà bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

Khối lượng nguyên liệu (g)	Thời gian ly trích (phút)	Thể tích nước (mL)	Nồng độ dung dịch NaCl (%)	Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng cao nhất (%)
50	120	500	15	100	$6,11 \pm 0,24$

Hoạt tính kháng vi khuẩn MRSA của tinh dầu trà

Khả năng kháng vi khuẩn MRSA của tinh dầu trà được thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn MRSA xuất hiện xung quanh giếng chứa tinh dầu. Thí nghiệm đối chứng được tiến hành trên kháng sinh cantamycin. Ảnh hưởng của dung môi Tween 80 lên sự phát triển của vi khuẩn MRSA được khảo sát tương tự như thí nghiệm với tinh dầu. Kết quả cho thấy, xung quanh giếng nhỏ tinh dầu xuất hiện vòng tròn vô khuẩn MRSA với kích thước thay đổi tùy nồng độ tinh dầu (Hình 1B - H), trong khi đó, không có sự xuất hiện của vòng vô khuẩn MRSA xung quanh khoảng giếng nhỏ Tween 80. Như vậy, sử dụng dung môi Tween 80 không ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm (Hình 1A).



Hình 1. Ảnh hưởng của tinh dầu và kháng sinh lên sự phát triển của vi khuẩn MRSA

A: Vòng vô khuẩn không được tạo ra bởi Tween 80. B: Vòng vô khuẩn tạo ra bởi tinh dầu trà ở nồng độ B: 3,125 µL/mL.

C: 6,5 µL/mL. D: 12,5 µL/mL. E: 25 µL/mL. F: 50 µL/mL. G: 100 µL/mL. H: 100 µL/mL.

Kích thước vòng vô khuẩn được ghi nhận tại vùng không có sự phát triển của vi khuẩn xung quanh giếng chứa tinh dầu. Đường kính vùng ức chế bao gồm đường kính giếng thạch. Ranh giới vùng ức chế được xác định bằng một vùng không có bất kỳ khuẩn lạc nào được phát hiện bằng mắt thường, bỏ qua các khuẩn lạc li ti ở mép mà

chỉ có thể phát hiện dưới kính hiển vi. “Kháng trung gian” là kiểu kháng trong đó với những nồng độ ức chế tối thiểu của một kháng sinh thường đạt được trong máu và tổ chức cho đáp ứng thấp hơn so với kiểu nhạy cảm (S). “Kháng” là thuật ngữ chỉ kiểu kháng khuẩn mà ở liều kháng sinh thông thường không có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn hoặc được kháng định qua nồng độ ức chế và đường kính vùng ức chế nằm trong giới hạn của cơ chế kháng, hoặc thực tế kháng sinh không có hiệu quả trong điều trị lâm sàng. “Không nhạy cảm” là một cách diễn giải kết quả dùng cho một số chủng vi khuẩn không bị ức chế bởi kháng sinh (Đỗ Thị Thuý Nga, 2011). Hiệu quả kháng vi khuẩn MRSA của tinh dầu Tràm trà được ghi nhận thông qua đường kính vòng vô khuẩn ở các nồng độ tinh dầu khác nhau được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Khả năng kháng MRSA của tinh dầu tràm trà và cantamycin

	Đường kính vòng vô khuẩn (mm) ở các nồng độ cao tinh dầu khác nhau μL						MIC ($\mu\text{L/mL}$)
	3,125	6,25	12,5	25	50	100	
Tinh dầu Tràm trà	-	10,833 ^d $\pm$ 0,289	11,667 ^{cd} $\pm$ 0,289	13,5 ^c $\pm$ 0,5	23,667 ^b $\pm$ 2,082	27,333 ^a $\pm$ 1,528	3,125 < MIC $\leq$ 6,25
Cantamycin	-	11,333 ^d $\pm$ 0,577	14,333 ^c $\pm$ 0,289	15,667 ^c $\pm$ 1,258	17,333 ^b $\pm$ 1,041	19,0 ^a $\pm$ 0,866	3,125 < MIC $\leq$ 6,25

Các mẫu tự theo sau các giá trị trong cùng một hàng khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95%. (-) là không kháng khuẩn.

Kết quả khảo sát cho thấy, đường kính vòng vô khuẩn MRSA tăng tỷ lệ với nồng độ tinh dầu. Đồng thời, sự thay đổi kích thước vòng vô khuẩn MRSA khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Sự ức chế vi khuẩn thường đạt giới hạn nhất định và có khác biệt khi tăng nồng độ tinh dầu. Đường kính vòng vô khuẩn MRSA thấp nhất đối với tinh dầu, đạt $10,833 \pm 0,289$ mm ở nồng độ 6,5 $\mu\text{L/mL}$ và cao nhất đối với tinh dầu, đạt $27,333 \pm 1,528$ ở nồng độ 100 $\mu\text{L/mL}$. Kháng sinh cantamycin thể hiện hoạt tính kháng MRSA ở các nồng độ khảo sát. Cantamycin kháng MRSA mạnh nhất tại nồng độ 100 $\mu\text{L/mL}$, đường kính vòng vô khuẩn MRSA đạt $19,0 \pm 0,866$ mm. Do tính chất kỵ nước của tinh dầu nên tinh dầu có thể tấn công và phá vỡ màng tế bào, tinh dầu cũng có thể ảnh hưởng đến hệ thống enzyme dẫn đến ức chế hô hấp và gây chết tế bào. Các cấu tử có hàm lượng cao nhất trong tinh dầu tràm trà đều là những hợp chất eucalyptol và terpineol, do đó tinh dầu tràm trà có nhiệt độ sôi, tỷ trọng và chiết suất khá cao. Chính các hợp chất eucalyptol và terpineol đã mang lại những hoạt tính sinh học quý cho tinh dầu tràm trà như hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng oxy hóa và độc tính tế bào (Khang et al., 2019).

KẾT LUẬN

Ly trích tinh dầu từ lá tràm trà bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có kết hợp hiệu ứng muối để hỗ trợ sự khuếch tán của tinh dầu với hiệu suất chiết ở điều kiện tối ưu là 6,42%. Điều kiện tối ưu cho quá trình ly trích tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước ở quy mô phòng thí nghiệm như: thời gian ly trích: 120 phút, nồng độ và muối NaCl: 15% và thể tích dung dịch muối NaCl: 500 mL. Nghiên cứu cho thấy, tinh dầu tràm trà thể hiện hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* kháng kháng sinh khá tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beylier MF (1979). Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. *Perfumer and Flavourist*. 4: 23-25.
- Boucher HW, Corey GR (2008). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 46(5): S344-9.
- Bremer PJ, Fletcher GC, Osborne C (2004). *Staphylococcus aureus*. *New Zealand Institute for Crop and Food Research*.
- Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR (1989). Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *J Agric Food Chem* 37: 1330-1335.
- Chambers HF (2005). Community-associated MRSA--resistance and virulence converge. *N Engl J Med* 352(14): 1485-7.
- Đoàn Mai Phương (2017). Cập nhật tình hình kháng kháng sinh tại Việt Nam. Hội nghị khoa học Toàn quốc của Hội Hôi sức cấp cứu và chống độc Việt Nam.
- Đỗ Thị Thuý Nga (2011). Quy trình thao tác chuẩn về thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh - Tiêu chuẩn đọc kết quả kháng sinh đồ và MIC. *GARP-Việt Nam*.
- Furter WF, Cook RA (1967). Salt effect in distillation: a Literature Review. *Int J Heat Mass Trans* 10: 23-36.
- Hammer KA (2006). A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol* 44: 616-62.

Kenneth T (2005). *Todar's Online Textbook of Bacteriology* University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology (*Staphylococcus*). *Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology*.

Khang LT, Huong NTT, Tien LTT (2019). Antifungal activity of tea tree essential oils (*Melaleuca alternifolia*) against phytopathogenic fungi. *Int J Adv Res* 7(9): 1239-1248.

Maiden BC (1924). *Melaleuca alternifolia*. *J Proc Roy Soc New S Wales* 58: 195.

EXTRACTION AND APPLICATION OF TEA TREE ESSENTIAL OIL (*Melaleuca alternifolia*) IN ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus*

Thanh Khang Le^{1*}, Thi Thu Huong Nguyen², Thi Thuy Tien Le³

¹ Department of Biotechnology, Research Institute for Oil and Oil Plants

² Department of Pharmacology and Biochemistry, Research Center of Ginseng and Medicinal Materials, National Institute of Medicinal Materials

³ Department of Biotechnology, Chemical Engineering Faculty, Ho Chi Minh University of Technology

SUMMARY

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been described as having a rapid response to each new class of antibiotics with the development of a resistance mechanism, from penicillin and methicillin to vancomycin and teicoplanin, and, to the nearest, linezolid and daptomycin. This study was aimed to evaluate antibacterial activity of tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In this study, tea tree essential oil having the most effective resistance to MRSA were selected by the wells diffusion method. Highest yield of oil (6.42%) of tea tree leaves was successfully extracted by steam distillation. The tea tree essential oil were tested against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. The highest antibacterial potentiality was exhibited by the tea tree essential oil, means of zones of bacterial growth inhibition are 27.3 mm at a concentration of 100 µL/mL. These results contributed to find a new application of tea tree essential oil which would increase its economic value in Viet Nam.

Keywords: Antibacterial, *Melaleuca alternifolia*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, tea tree essential oil.

* Author for correspondence: Tel: + 84-376760102; Email: lthanhkhang@gmail.com