

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cây Dây cóc (*Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson) từ các phân đoạn

Nguyễn Tường Vân*, Đặng Nguyễn Thanh Hiền, Huỳnh Duy Quang, Tô Phượng Trinh

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

* ntvn@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Dây cóc (*Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson), họ Tiết dê (Menispermaceae), còn gọi là Cây kí ninh, Đã có nhiều nghiên cứu đánh giá tác dụng sinh học của cao toàn phần Dây cóc: kháng viêm, chống oxi hóa, điều hòa miễn dịch, giải độc tế bào, kháng sốt rét, bảo vệ tim mạch, và chữa tiểu đường. Tuy nhiên, hầu như chưa có nghiên cứu xác định thành phần hóa học cụ thể có tác dụng kháng khuẩn của dịch chiết Dây cóc. Tác giả tiến hành tách phân đoạn bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần, lacer với nước acid và kiềm hóa để chiết alkaloid, thu được 7 phân đoạn lần lượt là PD-hex, PD-K, PD-Cf₂, PD-Cf₁, PD-EtOAc, PD-BuOH và PD-N. Bằng phương pháp đĩa thạch khuếch tán, thử hoạt tính kháng khuẩn của 7 phân đoạn này trên 3 chủng vi khuẩn gram âm và 3 chủng gram dương. Kết quả cho thấy Dây cóc có hoạt tính kháng lại vi khuẩn gram dương và không kháng lại gram âm. Các chất có hoạt tính này phân bố ở tất cả các phân đoạn, trừ phân đoạn PD-K, chứa alkaloid có tính kiềm mạnh và tan trong nước. Điều đặc biệt là các alkaloid có tính kiềm yếu trong PD-Cf₂ kháng khuẩn mạnh hơn các alkaloid có tính kiềm mạnh trong PD-K.

Nhận 05.12.2019
Được duyệt 21.05.2020
Công bố 29.06.2020

Từ khóa

Dây cóc, phân đoạn, Alkaloid, lacer phân bố, hoạt tính kháng khuẩn

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Đề kháng với kháng sinh là vấn đề toàn cầu, đặt biệt ở những nước đang phát triển. Nghiên cứu để tìm ra các kháng sinh và kháng nấm mới bằng tổng hợp hóa học không theo kịp với khả năng đề kháng đa dạng của vi khuẩn.

Để vô hiệu khả năng đề kháng thuốc kháng sinh của vi sinh vật phải tìm ra những cấu trúc hóa học mới, phức tạp hơn thường tồn tại phổ biến trong nhiều loại dược liệu [1].



Dây cóc (*Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson), họ Tiết dê (Menispermaceae), còn gọi là Cây kí ninh, Dây thần nông, Bảo cự hành,... mọc hoang dại nhiều ở Việt

Nam và Ấn Độ. Dây cóc thuộc loại cây dây leo, phần thân xù xì màu nâu nhạt, lá hình tim. Thân và rễ cây thường được sử dụng làm vị thuốc. Đã có nhiều nghiên cứu đánh giá tác dụng sinh học của cao toàn phần Dây cóc: kháng viêm, chống oxi hóa, điều hòa miễn dịch, giải độc tế bào, kháng sốt rét, bảo vệ tim mạch, và chữa tiểu đường. Về thành phần hóa học, Dây cóc chứa nhiều chất chuyển hóa thứ cấp như alkaloid, flavonoid, và flavon glycoside, triterpene, diterpene và diterpen glycosid [2]. Tuy nhiên, hầu như chưa có nghiên cứu xác định thành phần hóa học cụ thể có tác dụng dược lí, đặc biệt là tính kháng khuẩn. Đề tài “Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các phân đoạn dịch chiết Dây Cóc *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson” được thực hiện nhằm nghiên cứu sâu hơn về cây Dây cóc theo cách tách các phân đoạn có độ phân cực tăng dần; sau đó đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của mỗi phân đoạn; làm tiền đề cho việc xác định hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn.

2 Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu và trang thiết bị

- Đối tượng nghiên cứu: Thân phơi khô của Dây cóc được mua từ cửa hàng Luân Đức, quận 5, Tp. Hồ Chí Minh, sau đó xay thành bột mịn.

- Hóa chất, dung môi: Cồn 96°, *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, *n*-Butanol, dimethyl sulfoxide - DMSO.

- Trang thiết bị: nồi hấp tiệt trùng Hirayama, tủ cấy vô trùng Esco, Máy vortex, Tủ âm Heraeus, bể cách thủy Memmert.

- Chủng vi khuẩn: *Bacillus cereus* 46, *Staphylococcus aureus*-ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* - ATCC 13932, *Escherichia coli* - ATCC 25922, *Salmonella enterica* - ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes*

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiết xuất Dây cóc

Chiết 4 kg Dây cóc bằng phương pháp ngâm lạnh với 10 lít cồn 96% thu được dịch chiết cồn. Cô dịch chiết cồn trên bể cách thủy thu được 200 g cao cồn.

2.2.2 Tách phân đoạn dịch chiết

Hòa cao cồn vào 750 ml nước rồi acid hóa cao cồn bằng H₂SO₄ 20% đến pH 2. Sau đó lắc dịch acid với *n*-hexan đến khi lớp *n*-hexan không màu, thu được phân đoạn *n*-hexan (PD-hex) và dịch acid.

Ngoài ra, sau khi lắc với *n*-hexan còn thu được phần tủa không tan, hòa phần tủa này vào MeOH 20% thu được dịch (1). Lắc phân bố dịch (1) với các dung môi có độ phân cực tăng dần lần lượt là CHCl₃ thu được phân đoạn CHCl₃ (PD-Cf₁) và dịch (2). Tiếp tục lắc phân bố dịch (2) với EtOAc thu được phân đoạn EtOAc (PD-EtOAc) và dịch (3). Lắc phân bố dịch (3) với *n*-Butanol thu được phân đoạn *n*-Butanol (PD-BuOH) và phân đoạn nước (PD-N).

Kiểm hóa dịch acid bằng Na₂CO₃ 10% đến pH 10 được dung dịch kiềm (1). Lắc phân bố dịch kiềm với CHCl₃ thu được phân đoạn CHCl₃ (PD-Cf₂) và dung dịch kiềm (2) (PD-K).

Ở mỗi giai đoạn lắc phân bố, lặp lại nhiều lần đến khi lớp cặn lấy mất màu (khối lượng cặn ≤ 0,05 g). Các phân đoạn thu được cô quay chân không đến cặn và cân xác định khối lượng cặn.

2.2.3 Chuẩn bị môi trường thử nghiệm

Môi trường sau khi được pha và hấp khử trùng, cho vào mỗi đĩa petri có đáy phẳng và đặt lên mặt phẳng để thạch có bề dày đồng nhất, khoảng 4 mm. Thể tích môi trường khoảng 20 - 25 ml/đĩa (đĩa có đường kính 90 mm). Để nguội ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, nếu chưa sử dụng thì để trong tủ lạnh từ 4 - 8^oC. Khi sử dụng, nếu đĩa ướt, phơi đĩa trong laminar tối đa 30 phút cho đĩa khô hoàn toàn.

2.2.4 Hoạt hóa dịch khuẩn

Các chủng thử nghiệm được nuôi cấy lắc trong 5 ml môi trường Trypton Soy Broth (TSB) trong khoảng thời gian từ 18 - 20 giờ ở nhiệt độ 35 ± 2^oC. Sau đó được hiệu chỉnh đến giá trị Mc Farland 0,5 tương đương 1 - 2,108 bằng nước muối sinh lý NaCl 0,9%.

Trải đĩa: 100μl dịch canh khuẩn nồng độ 108CFU/ml được bơm vào đĩa thạch MHA sau đó trải khuẩn đều lên bề mặt đĩa nuôi.

Trong thí nghiệm này, đường kính giếng được sử dụng là 6 mm,

ứng với 50 μl mẫu dịch chiết.

2.2.5 Chuẩn bị dịch chiết

Cao dược liệu thô được pha loãng trong DMSO sao cho đạt nồng độ mỗi phân đoạn đạt 250 mg/ml. DMSO được sử dụng làm đối chứng âm, Tetracyclin (0,25 mg/ml) được sử dụng làm đối chứng dương.

2.2.6 Đọc kết quả

Đọc kết quả sau 16–18 giờ đối với vi khuẩn. Chất thử có tác động kháng khuẩn, kháng nấm sẽ cho vòng ức chế xung quanh lỗ. Đo và ghi nhận đường kính vòng ức chế bằng thước kẹp có độ chia nhỏ nhất bằng 0,01 mm.

Khả năng kháng mạnh hay yếu được đánh giá sơ bộ bằng giá trị đường kính vòng ức chế theo Bảng 1 [3].

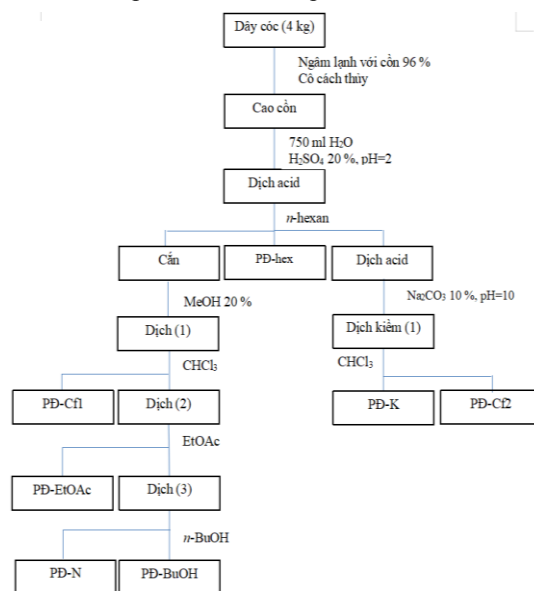
Bảng 1 Mức độ kháng vi sinh vật dựa vào đường kính vòng ức chế

Đường kính vòng ức chế (mm)	Mức độ kháng khuẩn
> 14	Mạnh
10 – 14	Vừa
7 – 9	Yếu
<6	Không kháng

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Tách phân đoạn cao chiết cồn

Tiến hành tách phân đoạn theo qui trình ở Hình 1.



Hình 1 Sơ đồ tách phân đoạn cao chiết Dây cóc

Khối lượng của các phân đoạn thu được lần lượt là PD-hex (17,98 g), PD-Cf₁(34,80 g), PD-EtOAc (5,35 g), PD-BuOH (9,66 g), PD-N (7,45 g), PD-Cf₂ (11,98 g), PD-K (350 g).

3.2 Thử hoạt tính kháng khuẩn

Sau khi tiến hành khảo sát khả năng kháng khuẩn của các cao chiết trên các chủng vi khuẩn gram âm và gram dương bằng phương pháp đục lỗ.

Kết quả cho thấy khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết ở cùng nồng độ 250 mg/ml có tác động đến hầu hết

các chủng vi khuẩn gram dương được sử dụng khảo sát là: *S.aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 46 và không tác dụng lên vi khuẩn gram âm như *Escherichia coli* ATCC 25922; *Salmonella enterica* ATCC 14028; *Enterobacter aerogenes*. Kết quả được ghi nhận trong Bảng 2.

Bảng 2 Đường kính vòng vô khuẩn của các phân đoạn

PD	Gram dương			Gram âm		
	B.c	S.a	L.m	E.c	S.e	E.a
PD-N	13 ± 1,41	11,5 ± 0,70	0	0	0	0
PD-EtOAc	14,5 ± 0,70	12 ± 1,41	13,5 ± 0,70	0	0	0
PD-Cf ₁	15,5 ± 0,70	12 ± 1,41	16 ± 1,41	0	0	0
PD-Cf ₂	18	14,5 ± 0,70	17 ± 2,82	0	0	0
PD-BuOH	11,5 ± 0,70	0	0	0	0	0
PD-hex	16,5 ± 0,70	0	11	0	0	0
PD-K	0	0	0	0	0	0
Tetracyclin	19,75 ± 4,11	28,25 ± 2,5	34,5 ± 1,73	24 ± 0,81	26,5 ± 0,57	22,75 ± 1,70
DMSO	0	0	0	0	0	0

B.c: *Bacillus cereus* 46; S.a: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; L.m: *Listeria monocytogenes* ATCC 13932; E.c: *Escherichia coli* ATCC 25922; S.e: *Salmonella enterica* ATCC 14028; E.a: *Enterobacter aerogenes*.

Cao chiết không có khả năng ức chế sự sinh trưởng của những chủng gram âm này, có thể do nguyên nhân khác biệt về cấu tạo vách tế bào vi khuẩn. Ở gram dương, vách tế bào được cấu tạo chủ yếu từ nhiều lớp peptidoglycan, tuy nhiên ở vi khuẩn gram âm vách tế bào được cấu thành từ một lớp peptidoglycan nhưng lại có thêm lớp lipopolysaccharide, lớp này đóng vai trò như lá chắn bảo vệ tế bào vi khuẩn khỏi các tác nhân gây hại.

Kết quả kháng khuẩn này giống với báo cáo của A.I.C Mohammed và cộng sự năm 2012 về việc Dây cóc, đặc biệt là dịch chiết CHCl₃, có khả năng kháng vi khuẩn gram dương như *Streptococcus pneumonia*. Tuy nhiên, theo báo cáo này, Dây cóc kháng cả trên vi khuẩn gram âm là *Escheria coli*. Điểm giống thứ 2 là cao chiết nước của cả hai nghiên cứu đều có khả năng kháng khuẩn [4].

So sánh đường kính vòng tròn kháng khuẩn với Bảng 1, có thể thấy các phân đoạn có khả năng kháng khuẩn từ vừa đến mạnh (đường kính >10 mm). Cụ thể, phân đoạn PD-EtOAc, PD-Cf₁, PD-Cf₂, PD-Hex có khả năng ức chế mạnh trên *Bacillus cereus* 46. PD-Cf₁, PD-Cf₂, còn ức chế mạnh trên cả *Listeria monocytogenes*. Những phân đoạn còn lại ức chế ở mức độ vừa trên các chủng gram dương.

Trong số các phân đoạn có tính kháng khuẩn mạnh thì phân đoạn PD-Cf₂ chứa các alkaloid có tính kiềm yếu. Bởi vì phân đoạn này được chiết bằng qui trình chiết alkaloid, kiềm hóa bằng Na₂CO₃ (tác nhân kiềm hóa của các alkaloid có tính kiềm yếu) rồi lắ với CHCl₃. Phân đoạn này có khả năng ức chế mạnh trên cả 3 loài vi khuẩn gram dương.

Các alkaloid có tính kiềm mạnh được tập trung trong phân đoạn PD-K. Phân đoạn này là những alkaloid sau khi kiềm hóa bằng Na₂CO₃, chuyển thành dạng bazơ tan được trong nước (chứa các alkaloid có tính kiềm mạnh, thường có cấu trúc protoberberin). Tuy nhiên, phân đoạn PD-K lại không có khả năng kháng lại các vi khuẩn gram âm và gram dương đã thử nghiệm.

4 Kết luận

Tóm lại, các chất có tác dụng kháng khuẩn có thể chiết được bằng các dung môi phân cực yếu đến trung bình như *n*-Hexan, EtOAc và CHCl₃. Dây cóc có khả năng kháng lại các chủng vi khuẩn gram dương. Cần nghiên cứu kỹ hơn về hoạt tính kháng khuẩn của Dây cóc trên vi khuẩn gram âm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - ĐH Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2019.01.59.

Tài liệu tham khảo

1. Cowan M. M. (1999), "*Plant Products as Antimicrobial Agents*", Clinical Microbiology Reviews. 12 (4), pp. 564-582.
2. Waqas Ahmad, Ibrahim Jantan* and Syed N. A. Bukhar (2016), "*Tinospora crispa (L.) Hook. f. & Thomson: A Review of Its Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Aspects*", Frontiers in Pharmacology, 7(59), pp. 1.
3. Muanza D. et al. (1994), "*Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire*", International Journal of Pharmacognosy. 32 (4), pp. 337-345.
4. Asif Iqbal Mohamed et.al. (2012), "*Antimicrobial activity of Tinospora crispa root extract*", IJRAP, 3(3), pp.417-419.

Evaluation antibacterial activity of fractions from stem extract of *Tinospora crispa* (L.)

Hook. f. & Thomson

Nguyen Tuong Van*, Dang Nguyen Thanh Hien, Huynh Duy Quang, To Phuong Trinh

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

* ntvn@ntt.edu.vn

Abstract The aim of this study is to evaluate antibacterial activity of fractions from *Tinospora crispa*. *Tinospora crispa* has been used in folkloric medicine for curing malaria, coughing, digestive diseases, large intestinal inflammation, some cancers and diabetes. The extraction is fractionated by solvents with increasing polarity. On the other hand, this extraction is partitioned with acidic water and base to concentrate alkaloids. There are totally 7 fractions accordingly named PĐ-hex, PĐ-K, PĐ-Cf₂, PĐ-Cf₁, PĐ-EtOAc, PĐ-BuOH và PĐ-N. With the help of disk-diffusion method, the 7 fractions are separately evaluated the ability inhibit the growth of some common bacterial species, including 3 gram-positive and 3 gram-negative ones. The result is that *Tinospora crispa* is able to restrain the spread of the 3 gram-positive species but not the 3 gram-negative species. Antibacterial substances are distributed in 6 over 7 fractions tested, excluding PĐ-K. PĐ-K sample mainly contains strong basic alkaloid that are also water soluble. Especially, weak basic alkaloids in PĐ-Cf₂ are able to restrict the growth of bacteria stronger than that of stronger basic alkaloids in PĐ-K.

Keywords *Tinospora crispa*, fractions, alkaloid, partition, antimicrobial activity