

Nghiên cứu hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* và *Klebsiella pneumoniae* của cao chiết lá dâm bụt (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)

- Lương Thị Mỹ Ngân
- Nguyễn Thị Thùy Linh
- Nguyễn Ngọc Quý
- Phạm Thị Ngọc Huyền
- Trương Thị Huỳnh Hoa
- Trần Trung Hiếu
- Phạm Thành Hồ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 30 tháng 05 năm 2016, nhận đăng ngày 02 tháng 12 năm 2016)

TÓM TẮT

Cây dâm bụt *Hibiscus rosa-sinensis* đã được sử dụng cho việc kháng viêm và kháng nhiễm khuẩn trong dân gian từ rất lâu đời. Nghiên cứu này nhằm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết lá dâm bụt lên *Staphylococcus aureus* và *Klebsiella pneumoniae*, hai trong số các tác nhân quan trọng hàng đầu gây nhiễm khuẩn bệnh viện. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao phân đoạn EtOAc và cao phân đoạn hexane có hoạt tính kháng như nhau lên *S. aureus*, nhưng kháng rất yếu lên *K. pneumoniae*. Bằng phương pháp sắc ký cột, 24 cao tiểu phân đoạn

hexane và 25 cao tiểu phân đoạn EtOAc đã được thu nhận. Tất cả các cao tiểu phân đoạn không có hoặc có hoạt tính rất yếu lên *K. pneumoniae*. Các cao tiểu phân đoạn có hoạt tính mạnh đối với *S. aureus* đã được ghi nhận, như: H4, H14–H16, và E1, E7, E17–E19. Đặc biệt là E7 có hoạt tính mạnh nhất lên *S. aureus* với nồng độ MIC và MBC lần lượt là 0,1 và 0,2 mg/mL. Dữ liệu GC-MS cho thấy thành phần chính của tiểu phân đoạn E7 là neophytadiene, trans-phytol và 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol.

Từ khóa: lá Dâm bụt, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, kháng khuẩn, cao chiết

MỞ ĐẦU

Sự kháng lại các loại thuốc kháng sinh của nhiều dòng vi khuẩn gây bệnh hiện đang gây nên mối quan ngại sâu sắc cho việc chăm sóc sức khỏe y tế cộng đồng trên toàn thế giới. Thực vật được xem như là một trong những nguồn thay thế lý tưởng vì mức độ an toàn, không hoặc ít phản ứng phụ, và có nhiều đích tác động khác nhau lên tế bào vi khuẩn nên ít có nguy cơ gây ra sự kháng thuốc [1]. *Staphylococcus aureus* là vi khuẩn gây bệnh thường gặp nhất có khả năng gây ra nhiều loại bệnh khác nhau, vì chúng thường trú ở da và

đường hô hấp trên ở cả người và động vật [2]. *Klebsiella pneumoniae* thường gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới như viêm phổi, viêm phế quản phổi thứ phát ở các bệnh nhân sau khi bị cúm, sởi, ho gà hoặc ở các bệnh nhân đang hồi sức hô hấp. *S. aureus* và *K. pneumoniae* là hai trong số các tác nhân quan trọng hàng đầu gây nhiễm khuẩn bệnh viện và ngày càng xuất hiện nhiều chủng kháng lại nhiều loại thuốc kháng sinh làm cho tình trạng nhiễm khuẩn ngày càng trầm trọng hơn [2, 3]. Trong một nghiên cứu

trước đây của chúng tôi, nhiều loại tinh dầu thực vật đã được chứng minh có khả năng kháng lại *K. pneumoniae*, trong đó tinh dầu nụ hoa Đinh hương và tinh dầu tiêu có hoạt tính ức chế mạnh lên sự tăng trưởng của này với giá trị MIC lần lượt là 1,5 và 2,5 mg/mL. Việc nghiên cứu tìm ra các hợp chất tự nhiên cũng như các chế phẩm thực vật có chứa các hoạt chất chống lại sự tăng trưởng của các chủng vi khuẩn này mang một ý nghĩa khoa học và thực tiễn quan trọng trong việc kiểm soát các chủng vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện [4].

Cây dâm bụt (cây bụp) (*Hibiscus rosasinensis L.*) thuộc họ Bông (Malvaceae) là cây tiểu mộc được trồng rộng rãi làm hàng rào ở nhiều nơi trong thành phố và các tỉnh thuộc khu vực phía nam [5]. Theo y học cổ truyền, dược liệu này được gọi là xuyên can bì, có vị ngọt, tính bình, không độc, có tác dụng thanh nhiệt, lợi tiểu, giải độc, tiêu sưng. Cả lá, vỏ thân, rễ và hoa dâm bụt đều được sử dụng chữa bệnh. Hoa dâm bụt có thể chữa mụn nhọt, nhứt đầu, chóng mặt, khó ngủ, hồi hộp; lá có thể chữa bệnh quai bị, kiết lỵ, mẩn ngứa, tiêu độc; vỏ thân được sử dụng để chữa khí hư, chàm mặt, kiết lỵ; và rễ giúp điều hòa kinh nguyệt [6, 7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các cao chiết từ lá cây dâm bụt, một đối tượng được dân gian sử dụng trong chữa bệnh viêm nhiễm và được trồng tương đối phổ biến ở thành phố Hồ Chí Minh để khảo sát hoạt tính kháng *S. aureus* và *K. pneumoniae*. Thành phần hóa học của cao tiểu phân đoạn có hoạt tính cũng được ghi nhận trong bài báo này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Lá dâm bụt được thu hái tại quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh vào tháng 4/2015.

Chủng bệnh phẩm vi khuẩn *Staphylococcus aureus* được cung cấp từ bệnh viện Đại học Y Dược TP. HCM và chủng chuẩn *Klebsiella*

pneumoniae ATCC 700603 được cung cấp từ Đơn vị Nghiên cứu Lâm Sàng Đại học Oxford tại Việt Nam và được giữ giống tại Phòng thí nghiệm Chuyên hóa Sinh học, Bộ môn Công nghệ Sinh học Thực vật và Chuyển hóa Sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Phương pháp

Phương pháp thu nhận cao tổng

Bột lá dâm bụt khô (3,8 kg) được ngâm trong 12,5 lít ethanol tuyệt đối (EtOH). Sau 3 ngày, lọc và thu dịch chiết. Phần bột lá còn lại được tiếp tục ngâm trong EtOH (2 lần, 3 ngày/lần). Tất cả các dịch chiết được cô quay chân không ở 44 °C để loại bỏ hết EtOH và thu cao tổng EtOH.

Phương pháp tách các cao phân đoạn

Cao tổng EtOH (100 g) được ngâm dầm trong 4 lít hexane. Sau 2 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi. Phần cao còn lại được tiếp tục ngâm trong hexane (2 lần, 2 giờ/lần). Tất cả các phần hòa tan trong hexane được cô quay chân không ở 44 °C để loại bỏ hết hexane và thu cao phân đoạn hexane (Hình 2). Tương tự, phần cao còn lại được tiếp tục ngâm trong 4 lít ethyl acetate (EtOAc), thực hiện 3 lần, 2 giờ/lần để thu cao phân đoạn EtOAc.

Phương pháp tách các cao tiểu phân đoạn

Từ cao phân đoạn hexane và cao phân đoạn EtOAc, sắc ký cột silica gel (đường kính cột: 5 cm, chiều dài cột: 55 cm) được sử dụng để thu nhận các cao tiểu phân đoạn. R_f của các tiểu phân đoạn được xác định bằng sắc ký bản mỏng (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄). Các tiểu phân đoạn có R_f giống nhau được gộp chung với nhau và được sử dụng để thử hoạt tính kháng khuẩn.

Phương pháp Sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS)

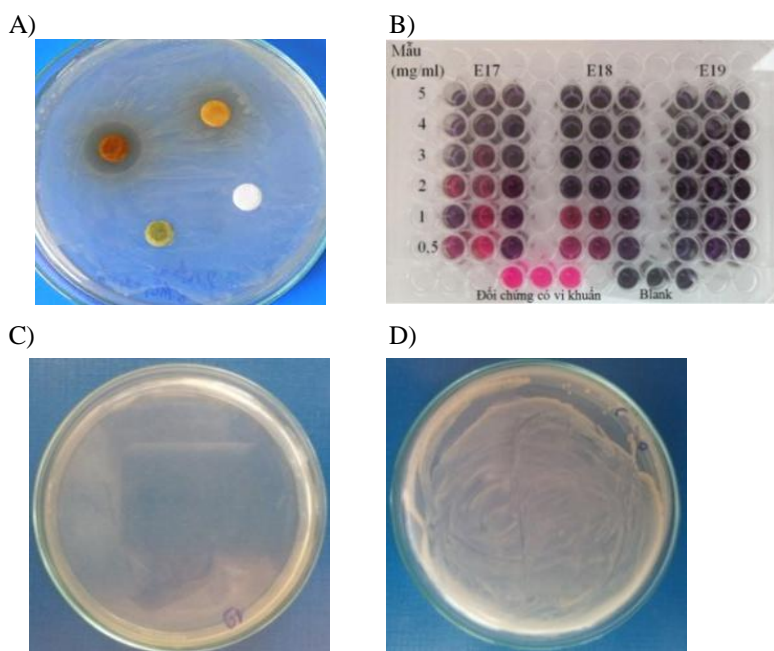
Cao tiểu phân đoạn E7 (2 mg) có hoạt tính kháng khuẩn, được hòa tan trong 1 mL ethyl acetate. Sau đó, được phân tích bằng sắc ký khí (Trace GC-Ultra, Thermo Scientific) ghép khối

phổ (Single quadrupole, Thermo Scientific) với cột DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Agilent Technologies) và sử dụng helium làm khí mang ở áp suất 13.209 psi ở nhiệt độ buồng tiêm 280 °C và thể tích mẫu tiêm là 1 μ L. Chương trình nhiệt được thực hiện ở nhiệt độ đầu là 70 °C (trong 1 phút), sau đó tăng 15 °C/phút cho đến 300 °C và giữ trong 15 phút. Các hợp chất chính trong cao tiểu phân đoạn E7 được xác định bằng cách so sánh khối phổ với ngân hàng dữ liệu của NIST (National Institute of Standard and Technology (NIST), USA/Wiley, 2011).

Các phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch (paper disc diffusion) được sử dụng để xác định đường kính vòng kháng khuẩn [8]. Các cao chiết được hòa tan trong ethanol ở nồng độ 200 mg/mL. Mỗi dịch cao chiết được thấm

vào từng đĩa giấy (đường kính 8 mm, dày 1 mm) sao cho khối lượng cao chiết ở mỗi đĩa giấy là 10 mg/đĩa giấy. Các đĩa giấy này được đặt trong tủ cấy vô trùng với quạt thổi trong 15 phút nhằm làm bay hơi ethanol để cho cao chiết được phân tán đều trên đĩa giấy. Sau đó, đặt từng đĩa giấy thử nghiệm trên đĩa môi trường thạch LB đã được cấy trải 100 μ l dịch vi khuẩn ở nồng độ 10^8 CFU/mL (độ đục McFarland 0,5) mật độ vi khuẩn ban đầu được xác định lại bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Các đĩa vi khuẩn thử nghiệm sau đó được ủ ở 37 °C. Sau 24 giờ, đường kính vòng kháng khuẩn xuất hiện xung quanh đĩa giấy được ghi nhận (Hình 1A). Các đĩa giấy đối chứng âm chỉ chứa 50 μ l ethanol/đĩa giấy. Các đĩa giấy đối chứng dương có chứa 30 μ g tetracycline/đĩa giấy. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần ở các thời điểm khác nhau.



Hình 1. Phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch và vòng kháng khuẩn (A). Nồng độ ức chế tối thiểu MIC của các chế phẩm thực vật được xác định bằng phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng với sự đổi màu của resazurin (B). Giá trị MIC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm không làm đổi màu xanh của resazurin. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC được xác định bằng phương pháp trải đĩa. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ ở các giếng thử nghiệm (B) cho thấy không có khuẩn lạc vi khuẩn nào có thể mọc trên đĩa môi trường thạch LB (C), và đĩa đối chứng có mọc khuẩn lạc vi khuẩn (D)

Phương pháp pha loãng các cao chiết thực vật (broth dilution) trên đĩa 96 giếng và chất chỉ thị màu resazurin được sử dụng để xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC (Minimum Inhibitory Concentration) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC (Minimum Bactericidal Concentration) [9, 10]. Chế phẩm thực vật (gồm cao tổng và các cao phân đoạn) được pha loãng dưới dạng stock trong DMSO với nồng độ tương ứng là 200 mg/mL và 100 mg/mL. Để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, các dung dịch stock này được pha loãng thành các nồng độ khảo sát từ 0–10 mg/mL đối với cao tổng và 0–5 mg/mL đối với cao phân đoạn. Dịch vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm và được pha loãng sao cho mật độ đạt 10^5 – 10^6 CFU/mL. Mỗi giếng gồm 50 μ l dịch vi khuẩn và 50 μ l chế phẩm thực vật ở các nồng độ pha loãng khác nhau (Hình 1B). Các giếng đối chứng chứa dịch vi khuẩn, môi trường và DMSO. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các đĩa thử nghiệm và đối chứng sau đó được ủ ở 37 °C. Sau 24 giờ, 20 μ L thuốc thử resazurin 0,01 % được cho vào mỗi giếng. Quan sát sự thay đổi màu, ghi nhận giá trị MIC. Các giếng có sự đổi màu của dung dịch 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 các chế phẩm thực vật có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (không làm đổi màu resazurin) (Hình 1B). Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC được xác định bằng phương pháp trải đĩa: 100 μ L dịch thử nghiệm trên các giếng không có sự đổi màu của resazurin được trải lên các đĩa môi trường thạch LB và được ủ ở 37 °C,

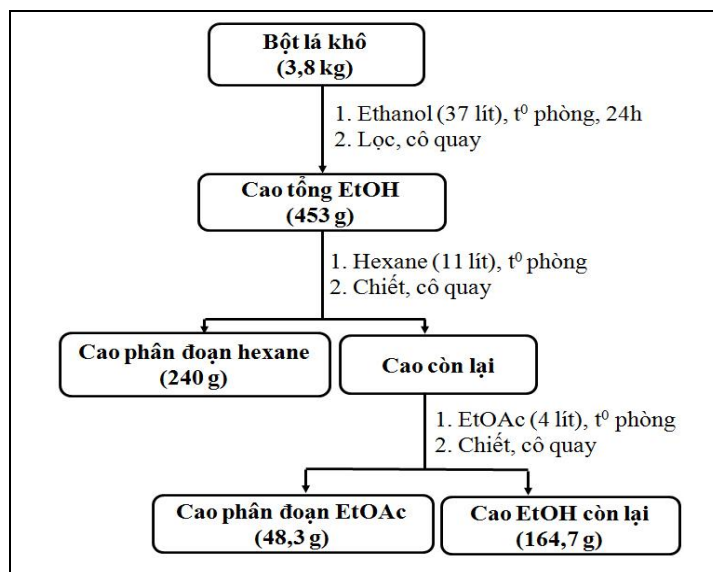
sau 24 giờ quan sát sự sống sót của vi khuẩn. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của các chế phẩm thực vật có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn trong giếng (Hình 1C), không có khuẩn lạc nào xuất hiện trên đĩa môi trường thạch LB, đĩa môi trường đối chứng có khuẩn lạc vi khuẩn xuất hiện (Hình 1D). Mỗi thí nghiệm được thực hiện ít nhất 3 lần vào các thời điểm khác nhau để xác định kết quả.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết thu nhận cao tổng và cao tiểu phân đoạn

Quy trình thu nhận cao tổng EtOH và các cao phân đoạn hexane và EtOAc được tóm tắt ở Hình 2. Hiệu suất chiết cao tổng EtOH là 11,9 % so với trọng lượng khô của lá dâm bụt. Tỷ lệ phần trăm cao phân đoạn hexane và cao phân đoạn EtOAc trong cao tổng EtOH lần lượt là 53,0 % và 10,7 %.

Cao phân đoạn hexane (20 g) hoặc EtOAc (16 g) được tiếp tục phân tách bằng sắc ký cột silica gel, với pha động là hexane (100–0 %) và ethyl acetate (0–100 %), sau cùng là methanol (MeOH) 100 %. Hàm lượng và tỉ lệ % của các tiểu phân đoạn qua sắc ký cột được ghi ở Bảng 1 và Bảng 2. Kết quả cho thấy rằng, các cao tiểu phân đoạn H24 (7,7 g), E24 (4,5 g) và E25 (3,8 g) chiếm hàm lượng lớn và chứa các hợp chất có độ phân cực mạnh hơn cao tiểu phân đoạn khác, vì H24, E24 và E25 thuộc hệ ly giải hexane:ethyl acetate (H:EtOAc) là 0:100 hoặc MeOH 100 %. Các cao tiểu phân đoạn còn lại chiếm hàm lượng thấp và chứa các hợp chất không phân cực hoặc có độ phân cực nhỏ.



Hình 2. Quy trình thu nhận các cao chiết thực vật bằng phương pháp ngâm dầm trong dung môi. Cao tổng EtOH, cao phân đoạn hexane, cao phân đoạn EtOAc, và cao EtOH còn lại

Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết lá dâm bụt

Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết lên *S. aureus* và *K. pneumoniae* được xác định bằng phương pháp đĩa giấy và phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng. Kết quả cho thấy rằng đường kính vòng kháng khuẩn do cao tổng và các cao phân đoạn tạo ra thay đổi từ 9–15 mm đối với *S. aureus*, 9–11 mm đối với *K. pneumoniae* (Bảng 3).

Qua kết quả ở Bảng 4, các cao chiết lá dâm bụt có tính kháng mạnh đối với *S. aureus* hơn là đối với *K. pneumoniae*. Hoạt tính kháng *S. aureus* của các cao phân đoạn hexane và EtOAc tương tự nhau với MIC là 2,5 mg/mL và MBC là 7,5 mg/mL, và mạnh hơn so với cao tổng ETOH. Vì vậy, cả hai cao phân đoạn này được tiếp tục phân tách bằng sắc ký cột để thu nhận các tiểu phân đoạn và kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn.

Bảng 1. Hàm lượng và tỉ lệ thu nhận các cao tiểu phân đoạn từ cao phân đoạn hexane

| Cao tiểu phân đoạn | Pha động (H:EtOAc) | Hàm lượng (g) | Tỉ lệ (%) |
|--------------------|---------------------|---------------|-----------|
| H1 | 95:5 | 0,03 | 0,14 |
| H2 | 90:10 | 0,01 | 0,05 |
| H3 | 85:15 | 5,10 | 25,5 |
| H4* | 85:15 | 0,22 | 1,08 |
| H5 – H8 | 80:20 | 0,86 | 4,26 |
| H9 – H13 | 70:30 | 2,19 | 10,93 |
| H14* | 70:30 | 0,47 | 2,34 |
| H15* | 70:30 | 0,26 | 1,29 |
| H16* | 70:30 | 0,40 | 2,00 |
| H17 – H23 | 70:30 | 2,76 | 13,76 |
| H24 | 0:100 và MeOH 100 % | 7,70 | 38,50 |
| Tổng | | 19,97 | 99,89 |

*phân đoạn có hoạt tính kháng khuẩn

Kết quả kháng khuẩn của các cao tiêu phân đoạn bằng phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng với thuốc thử resazurin và bằng phương pháp trải đĩa được ghi nhận ở Bảng 5. Nghiên cứu cho thấy, trong số 24 tiêu phân đoạn được thu nhận từ cao phân đoạn hexane, các cao tiêu phân đoạn H4 và H14–H16 có hoạt tính kháng *S. aureus*, và chỉ có H4 kháng *K. pneumoniae*. Trong đó, cao tiêu phân đoạn H4 cho giá trị MIC = 1,25 và MBC = 2,5 mg/mL đối với *S. aureus*; MIC = 5 và MBC = 10 mg/mL đối với *K. pneumoniae*; và mạnh hơn so với các cao tiêu phân đoạn H14–H16. Trong số 25 tiêu phân đoạn được thu nhận từ cao phân đoạn EtOAc, các tiêu phân đoạn E1, E7 và E17–E19 có hoạt tính kháng lại *S. aureus*, và chỉ có E7 kháng lại *K. pneumoniae*. Trong đó, E7 có hoạt tính kháng mạnh nhất đối với *S. aureus* (MIC = 0,1 và MBC = 0,2 mg/mL) và với *K. pneumoniae* (MIC = 7,5 và MBC = 10 mg/mL). Tiếp theo là E1 cho giá trị MIC = 0,25 và MBC = 0,5 mg/mL đối với *S. aureus*, nhưng có hoạt tính kháng yếu đối với *K. pneumoniae*. Các tiêu phân đoạn H4, E1 và E7 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn so với tất cả các tiêu phân đoạn còn lại, nhưng chúng chiếm tỉ lệ rất nhỏ, H4 chiếm 1,08 % trong cao phân đoạn hexane (Bảng 1), và E1 chiếm 0,14 %, E7 chiếm 1,11 % trong

cao phân đoạn EtOAc (Bảng 2).

Hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh của các cao chiết lá và hoa dâm bụt cũng đã được nghiên cứu bởi một số tác giả trên thế giới. Arullappan và cs (2009) đã nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết MeOH, EtOAc và petroleum ether từ thân, lá, và hoa dâm bụt bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch. Các cao chiết này không có khả năng kháng *E. coli*, *P. aeruginosa*, và *K. pneumoniae*, nhưng cao chiết petroleum ether có khả năng kháng mạnh nhất đối với chủng vi khuẩn MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) [11]. Theo Uddin và cs (2010), cao chiết MeOH từ lá có hoạt tính kháng *S. aureus* và không có khả năng kháng *K. pneumoniae* [12]. Nghiên cứu của Seyyedneja (2010) cho thấy rằng cao chiết EtOH lá dâm bụt 20 mg/đĩa giấy (\varnothing 6 mm) có thể kháng *K. pneumoniae* và tạo vòng kháng khuẩn 8 mm, trong khi đó chỉ với 2,5 mg/đĩa giấy (\varnothing 6 mm) có thể kháng *S. aureus* và tạo vòng kháng khuẩn 7 mm [13]. Điều này cho thấy rằng, cao lá dâm bụt có chứa các hoạt chất kháng cả *S. aureus* và *K. pneumoniae*. Tuy nhiên, hoạt chất kháng *K. pneumoniae* có lẽ chiếm tỉ lệ rất thấp hoặc *K. pneumoniae* ít nhạy với các hoạt chất này.

Bảng 2. Hàm lượng và tỉ lệ thu nhận các cao tiêu phân đoạn từ cao phân đoạn EtOAc

| Cao tiêu phân đoạn | Pha động (H: EtOAc) | Hàm lượng (g) | Tỉ lệ (%) |
|--------------------|----------------------|---------------|-----------|
| E1* | 95:5 và 90:10 | 0,39 | 0,14 |
| E2 | 80:20 | 0,05 | 0,05 |
| E3 – E6 | 70:30 | 0,81 | 28,50 |
| E7* | 70:30 | 0,11 | 1,11 |
| E8 – E15 | 70:30 | 2,14 | 15,79 |
| E16 | 70:30 và 60:40 | 0,36 | 2,0 |
| E17* | 60:40 và 50:50 | 0,34 | 5,00 |
| E18* | 50:50 và 40:60 | 0,17 | 1,05 |
| E19* | 40:60 | 0,17 | 2,23 |
| E20 | 40:60 và 20:80 | 0,65 | 0,84 |
| E21 | 20:80 và 100:0 | 0,27 | 2,25 |
| E22 | 0: 100 | 0,85 | 0,55 |
| E23 | 0: 100 và 100 % MeOH | 0,24 | 1,84 |
| E24 | 100 % MeOH | 4,52 | 38,50 |
| E25 | 100 % MeOH | 3,84 | 24,0 |
| Tổng | | 14,91 | 93,19 |

* phân đoạn có hoạt tính kháng khuẩn

Bảng 3. Vòng kháng khuẩn của cao tổng EtOH và các cao phân đoạn lên *S. aureus* và *K. pneumoniae*

| Mẫu (10 mg/đĩa giấy) | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>K. pneumoniae</i> |
| Cao tổng EtOH | 9,2 ± 0,3 | 8,8 ± 0,2 |
| Cao phân đoạn hexane | 15,4 ± 0,8 | 10,8 ± 0,4 |
| Cao phân đoạn EtOAc | 14,8 ± 0,4 | 10,7 ± 0,3 |
| Cao EtOH còn lại | - | - |
| Tetracycline (0,03 mg/đĩa giấy) | 29,7 ± 1,45 | - |

- không hoạt tính

Thành phần của tiểu phân đoạn E7 được xác định bằng GC-MS

Thành phần của tiểu phân đoạn E7 có hoạt tính kháng mạnh với *S. aureus* được phân tích bằng GC-MS (Hình 3). Kết quả cho thấy thành phần chính của tiểu phân đoạn này là neophytadiene (C₃₀H₃₈), (2E)-3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (*trans*-phytol, C₂₀H₄₀O) và 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (C₂₀H₄₀O, một dạng stereoisomer của *trans*-phytol). Neophytadiene đã được chứng minh bởi nhiều tác giả là chất có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, có ở nhiều loại vi tảo như *Dunaliella salina* [14], *Navicula delognei* [15], và *Chaetoceros muelleri* [16], và nhiều loài thực vật như *Bursera simaruba* [17], *Turnera ulmifolia* [18], *Urtica dioica* [19], và *Hugonia mystax* [20]. *Trans*-phytol, một hợp chất diterpene alcohol, được chứng minh là có hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn và kháng nấm mạnh. Theo nghiên

cứu của Pejin và cs (2014), *trans*-phytol có khả năng kháng *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, và *Enterobacter cloacae* với MIC 0,003–0,038 mg/mL và MBC 0,013–0,052 mg/mL; kháng nấm *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. và *Trichoderma* spp. với MIC 0,008–0,016 mg/mL và MFC (Minimum Fungicidal Concentration) 0,090–0,520 mg/mL [21]. 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol có thuộc tính kháng ung thư, kháng oxy hóa và kháng khuẩn [22]. Hoạt tính kháng khuẩn của neophytadien, *trans*-phytol và 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol có trong E7 có lẽ quyết định tính kháng khuẩn mạnh của tiểu phân đoạn này lên *S. aureus*.

Bảng 4. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC và diệt khuẩn tối thiểu MBC của các cao chiết lên *S. aureus* và *K. pneumoniae* bằng phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng với thuốc thử resazurin và bằng phương pháp trải đĩa

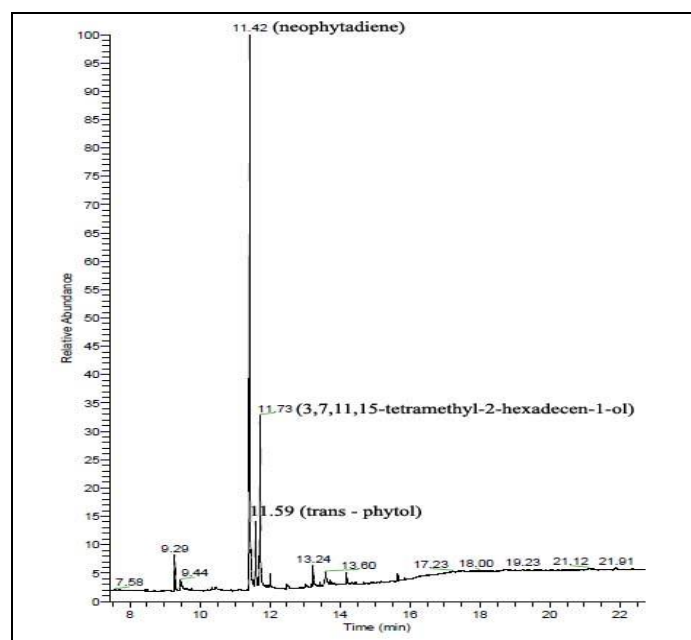
| Mẫu | <i>S. aureus</i> | | <i>K. pneumoniae</i> | |
|----------------------|------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | MIC (mg/mL) | MBC (mg/mL) | MIC (mg/mL) | MBC (mg/mL) |
| Cao tổng EtOH | 5,0 | >10,0 | 10 | 15,0 |
| Cao phân đoạn hexane | 2,5 | 7,5 | 10 | 15,0 |
| Cao phân đoạn EtOAc | 2,5 | 7,5 | 10 | 12,5 |
| Cao EtOH còn lại | - | - | - | - |

- không hoạt tính

Bảng 5. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC và diệt khuẩn tối thiểu MBC của các tiểu phân đoạn hexane (H) và EtOAc (E) lên *S. aureus* và *K. pneumoniae* bằng phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng với thuốc thử resazurin và bằng phương pháp trải đĩa

| Mẫu* | <i>S. aureus</i> | | <i>K. pneumoniae</i> | |
|------|------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | MIC (mg/mL) | MBC (mg/mL) | MIC (mg/mL) | MBC (mg/mL) |
| H4 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 |
| H14 | 2,5 | 5 | - | >10 |
| H15 | 2,5 | 5 | - | >10 |
| H16 | 2,5 | 7,5 | - | >10 |
| E1 | 0,25 | 0,5 | > 7,5 | >10 |
| E7 | 0,1 | 0,2 | 7, 5 | 10 |
| E17 | 4 | 5 | > 7,5 | >10 |
| E18 | 2 | 3 | > 7,5 | >10 |
| E19 | 0,5 | 3 | > 7,5 | >10 |

*Các tiểu phân đoạn còn lại không có hoạt tính hoặc có hoạt tính rất thấp



Hình 3. Thành phần của tiểu phân đoạn E7 được xác định bằng GC-MS

KẾT LUẬN

Lá dâm bụt *Hisbicus rosa-sinensis* có chứa các hoạt chất có tính kháng mạnh lên *Staphylococcus aureus*. Vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* ít nhạy với các cao phân đoạn hexane và EtOAc và các cao tiểu phân đoạn từ cao tổng EtOH của lá dâm bụt. Trong số các tiểu phân đoạn được tách chiết từ cao phân đoạn

EtOAc, E7 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất. Các thành phần chính của E7 là neophytadiene, trans-phytol và 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol.

Lời cảm ơn : Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số C2015-18-25.

Study on the antibacterial activities of *Hibiscus rosa-sinensis* leaf extracts against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*

- Luong Thi My Ngan
 - Nguyen Thi Thuy Linh
 - Nguyen Ngoc Quy
 - Pham Thi Ngoc Huyen
 - Truong Thi Huynh Hoa
 - Tran Trung Hieu
 - Pham Thanh Ho
- University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Hibiscus rosa-sinensis has been used in folk medicine to treat inflammation and bacterial infections for a long time. This study aims to evaluate the antibacterial activity of *H. rosa-sinensis* leaf extracts against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. Both are the major causes of hospital acquired infections. The results showed that the hexane and ethyl acetate fractions were similarly active to *S. aureus* but very weak active to *K. pneumoniae*. Both of these fractions were subjected to chromatograph using silica gel column eluted with hexane and ethyl

acetate, and yielded 24 hexane subfractions (H1–H24) and 25 ethyl acetate subfractions (E1–E25). All subfractions had no or little activities to *K. pneumoniae*. Subfractions as H4, H14–H16, and E1, E7, E17–E19 had strong activities against *S. aureus*. Especially, E7 subfraction exhibited the strongest activity with MIC and MBC values of 0.1 and 0.2 mg/mL, respectively. GC-MS data showed that the main constituents of the E7 subfraction were neophytadiene, trans-phytol and 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol.

Key words: *Hibiscus rosa-sinensis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, antibacterial activity, extracts

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. I. Raskin, D.M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D.A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakoby, J.M. O'Neal, T. Cornwell, I. Pastor, B. Fridlender, Plants and human health in the twenty-first century, *Trends Biotechnol*, 20, 12, 522–531 (2002).
- [2]. N.S.M. Tuyết, V.T.C. Hải, T.A. Dũng, L.T.T. Nga, Khảo sát vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện tại bệnh viện nhân dân Gia Định, Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh, 13, 6, 295–300 (2009).
- [3]. Đ.M. Phương, N.Q. Anh, Căn nguyên vi sinh vật gây nhiễm trùng bệnh viện thường gặp, theo *Tạp chí Y học lâm sàng*, <http://thaythuocvietnam.vn/Can-nguyen-vi-sinh-vat-gay-nhiem-trung-benh-vien-thuong-gap-di1246--n5333> (2012).

- [4]. T.T. Hiếu, N.T. Hằng, L.T.T. Loan, H. Việt, L.T.M. Ngân, Hoạt tính của các loại tinh dầu thực vật kháng phế trực khuẩn *Klebsiella pneumoniae*, Toàn văn kỷ yếu Hội nghị Khoa học lần IX, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM, 158–167 (2014).
- [5]. P.H. Hộ, Cây cỏ Việt Nam, Quyển I, tập 2, Nxb. MeKong, 661 (1991).
- [6]. P.X. Trung, Chữa bệnh bằng cây dâm bụt, *Nông Nghiệp Việt Nam* (theo *Nam dược thân hiệu*), http://www.ykhoa.net/yhoccotruyen/baiviet/29_010.htm (2000).
- [7]. L.T.M. Ngan, J.K. Moon, J.H. Kim, T. Shibamoto, Y.J. Ahn, 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 (2012).
- [8]. Y.J. Ahn, J.H. Kwon, S.H. Chae, J.H. Park, J.Y. Yoo, Growth-inhibitory responses of human intestinal bacteria to extracts of oriental medicinal plants, *Microb Ecol Health Dis*, 7, 5, 257–261 (1994).
- [9]. L.T.M. Ngan, J.K. Moon, T. Shibamoto, Y.J. Ahn, Growth-inhibiting, bactericidal, and urease inhibitory effects of *Paeonia lactiflora* root constituents and related compounds on antibiotic-susceptible and -resistant strains of *Helicobacter pylori*, *J. Agric Food Chem*, 60, 9062–9073 (2012).
- [10]. Y.W. Mak, L.O. Chuah, R. Ahmad, R. Bhat, Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus* (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and *Cassia* (*Senna bicapsularis* L.) flower extracts, *J. King Saud Univ Sci*, 25, 4, 275–282 (2013).
- [11]. S. Arullappan, Z. Zakaria, D.F. Basri, Preliminary screening of antibacterial activity using crude extracts of *Hibiscus rosa sinensis*, *Trop Life Sci Res*, 20, 2, 109–118 (2009).
- [12]. B. Uddin, T. Hossan, S. Paul, T. Ahmed, T. Nahar, S. Ahmed, Antibacterial activity of the ethanol extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* leaves and flowers against clinical isolates of bacteria, *Bangladesh J Life Sci*, 22, 65–73 (2010).
- [13]. S.M. Seyyednejad, H. Koochak, E. Darabpour, H. Motamedi, A survey on *Hibiscus rosa-sinensis*, *Alcea rosea* L. and *Malva neglecta* Wallr as antibacterial agents, *APJTM*, 3, 5, 351–355 (2010).
- [14]. J.A. Mendiola, S. Santoyo, A. Cifuentes, G. Reglero, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, Antimicrobial activity of sub- and supercritical CO₂ extracts of the green alga *Dunaliella salina*, *J. Food Prot*, 71, 10, 2138–2143 (2008).
- [15]. J.A. Findlay, A.D. Patil, Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei*, *J. Nat Prod*, 47, 815–818 (1984).
- [16]. J.A. Mendiola, C.F. Torres, P.J. Martín-Alvarez, S. Santoyo, A. Toré, B.O. Arredondo, F.J. Señoráns, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content, *Eur Food Res Technol*, 224, 505–510 (2007).
- [17]. M.E. Carretero, J.L. López-Pérez, M.J. Abad, P. Bermejo, S. Tillet, A. Israel, B. Noguera-P, Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves, *J Ethnopharmacol*, 116, 1, 11–15 (2008).
- [18]. K. Kalimuthu, R. Prabakaran, R. Preetha, Phytochemical screening and GC-MS studies on the ethanolic extract of *Turnera ulmifolia* L., *Int J Pharm Phytopharmacol Res*, 4, 179–181 (2014).

- [19]. T.M.B. Balkhi, F.A. Bhat, Bioactive potential of leaf extracts from *Urtica dioica* L. against fish and human pathogenic bacteria, *Afri. J. Microbiol. Res.*, 6, 6893–6899 (2012).
- [20]. G. Rajeswari, M. Murugan, V.R. Mohan, GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. (Linaceae), *Res. J. Pharm. Biomed. Sci.*, 29, 818–824 (2012).
- [21]. B. Pejin, A. Savic, M. Sokovic, J. Glamoclija, A. Ciric, M. Nikolic, K. Radotic, M. Mojovic, Further *in vitro* evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol, *Nat. Prod. Res.*, 28, 6, 372–376 (2014).
- [22]. M.J.D. Mol, P.M Radhamany, GC-MS profiling in the fruits of *Tamilnadia uliginosa* (Retz.) Tirveng and Sastre (Rubiaceae), *WJPPS*, 5, 1, 890–896 (2016).