

Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá và hoa dâm bụt *Hibiscus rosa-sinensis* L. lên *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*

Lương Thị Mỹ Ngân, Lê Thị Kim Lan, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Ngọc Quý, Lê Thị Thanh Loan, Trương Thị Huỳnh Hoa, Trần Trung Hiếu

Tóm tắt – Sự kháng lại kháng sinh của các dòng vi khuẩn gây bệnh đang là mối lo ngại của toàn cầu. 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 lên tế bào vi khuẩn. Nghiên cứu này nhằm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết ethanol, và các cao phân đoạn hexane và ethyl acetate của lá và hoa dâm bụt *Hibiscus sinensis-rosa* L. lên *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Klebsiella pneumoniae*, ba tác nhân chính gây nhiễm trùng đường tiết niệu và gây sỏi thận struvite. Đường kính vòng kháng khuẩn, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của các loại cao chiết lá và hoa dâm bụt từ các dung môi khác nhau đã được ghi nhận. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, các cao chiết từ hoa dâm bụt có hoạt tính cao hơn đáng kể so với các cao chiết từ lá, đặc biệt là cao phân đoạn ethyl acetate. Với 10 mg/đĩa giấy, cao phân đoạn ethyl acetate tách chiết từ hoa cho đường kính vòng kháng khuẩn đối với *Ps. aeruginosa*, *Pr. mirabilis*, và *K. pneumoniae* lần lượt là 17, 15 và 13 mm. Các giá trị MIC (MBC) của cao ethyl acetate tách chiết từ hoa đối với cả hai chủng vi khuẩn *Ps. aeruginosa* và *P. mirabilis* là 2,5-5,0 (7,5) mg/mL, và đối với *K. pneumoniae* 7,5 (10) mg/mL. Phân đoạn này cần được tiếp tục phân tách để xác định thành phần hợp chất quyết định tính kháng khuẩn. Các cao chiết từ lá và hoa dâm bụt, *H. rosa-sinensis* có thể được sử dụng để chữa trị các viêm nhiễm đường tiết niệu do các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc gây ra.

Từ khóa – *Hibiscus rosa - sinensis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, hoạt tính kháng khuẩn, cao chiết thực vật

Ngày nhận bản thảo: 02-01-2017, ngày chấp nhận đăng: 24-7-2018, ngày đăng: 10-08-2018

Tác giả: Lương Thị Mỹ Ngân, Lê Thị Kim Lan, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Ngọc Quý, Lê Thị Thanh Loan, Trương Thị Huỳnh Hoa, Trần Trung Hiếu - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM (ltmngan@hcmus.edu.vn)

1 MỞ ĐẦU

Trong các thập niên gần đây, các nguồn dược liệu từ thực vật và các chế phẩm thực vật, đặc biệt là các nguồn thực vật được sử dụng trong dân gian ngày càng được các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước quan tâm nhiều nhằm tìm kiếm các minh chứng khoa học cho tác dụng dược lý của chúng. 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, 2]. Nhiễm trùng đường tiết niệu là một trong số các bệnh nhiễm trùng phổ biến trong các bệnh viện, các trung tâm chăm sóc sức khỏe và kể cả trong cộng đồng [3]. Các chủng vi khuẩn *Pr. mirabilis*, *Ps. aeruginosa* và *K. pneumoniae* thường tạo ra các lớp màng sinh học (biofilm), dẫn đến hình thành hydroxyapatite, sỏi thận struvite, và lớp vảy cứng gây tắc nghẽn ống dẫn tiểu [4, 5]. Sự thất bại trong điều trị chủ yếu do là sự kháng lại thuốc kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây bệnh đã làm gia tăng thời gian và chi phí điều trị, và làm tăng tỉ lệ tử vong [6].

Cây dâm bụt (cây bụt) (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) thuộc họ Bông Bụt (Malvaceae) với nhiều màu sắc khác nhau, được trồng phổ biến như là cây cảnh ở các nước nhiệt đới. Trong y học dân gian, hoa và lá dâm bụt được sử dụng như là chất kích thích sự mọc tóc, chữa lành vết loét và ung nhọt [7]. 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 và tiêu sưng. Cả lá, vỏ thân, rễ và hoa dâm bụt đều được

dùng chữa bệnh. Hoa dâm bụt có thể chữa mụn nhọt, nhức 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. Do vậy, cây dâm bụt có thể được sử dụng như là nguồn dược liệu thay thế cho các tác nhân kháng vi khuẩn gây bệnh cho người và động vật. [8]

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các cao chiết dung môi khác nhau từ lá và hoa 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 ba chủng vi khuẩn *Pr. mirabilis*, *Ps. aeruginosa* và *K. pneumoniae*, là ba tác nhân chính gây nhiễm trùng đường tiết niệu phổ biến ở nhiều bệnh viện trong cả nước và là tác nhân gây nên sỏi thận struvite.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Lá và hoa dâm bụt *Hibiscus rosa-sinensis* (Hình 1) được thu hái tại quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh vào tháng 4-10/2015. Lá bao gồm cả cuống có phiến lá dài từ 3-10 cm và hoa có đường kính 6-12 cm được phơi khô và xay nhuyễn. Độ ẩm của mẫu được xác định bằng phương pháp sấy khô theo TCVN 1867:2001.

Chủng vi khuẩn *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* được cung cấp từ Khoa Vi Sinh, Bệnh viện Chợ rẫy, TP. HCM, được xác định lại bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF-MS (Đơn vị Nghiên cứu Lâm Sàng Đại học Oxford tại Việt Nam), và chủng chuẩn *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 được cung cấp từ Đơn vị Nghiên cứu Lâm Sàng Đại học Oxford tại Việt Nam. Cả ba chủng vi khuẩn được giữ giống tại Phòng thí nghiệm Chuyên hóa Sinh học, Bộ môn Công nghệ Sinh học Thực vật và Chuyên hóa Sinh học, Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia- TP. HCM.

Dung môi *n*-hexane, ethyl acetate, ethanol được cung cấp bởi công ty Chemsol (Việt Nam).



Hình 1. Lá và hoa dâm bụt *Hibiscus rosa-sinensis*

Phương pháp thu nhận cao tổng

Bột lá khô (2 kg) với độ ẩm 8,6% và bột hoa dâm bụt khô (2 kg) với độ ẩm 9,8% được ngâm trong ethanol tuyệt đối (EtOH) với tỉ lệ 1:3 (w/v). 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. Hiệu suất thu nhận cao tổng được tính là tỉ lệ % cao thu được so với khối lượng khô của mẫu.

Phương pháp tách các cao phân đoạn

Cao tổng EtOH (200 g) được ngâm đậm trong hexane với tỉ lệ 1: 10 (w/v). Sau 2 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi hexane. 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 ethyl acetate (EtOAc), thực hiện 3 lần, 2 giờ/lần để thu cao phân đoạn EtOAc. Hiệu suất thu nhận cao phân đoạn là tỉ lệ % cao thu được so với khối lượng cao tổng.

Quy trình thu nhận cao tổng EtOH và các cao phân đoạn hexane và EtOAc được tóm tắt trong Hình 2.

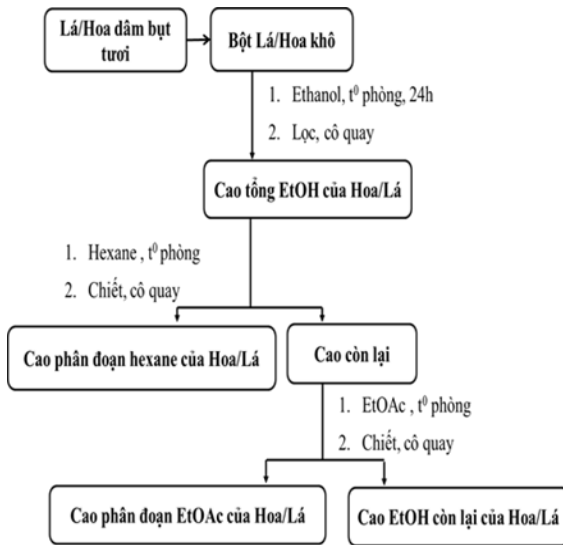
Cao tổng và các cao phân đoạn sử dụng cho thử nghiệm kháng khuẩn được dàn mỏng trên đĩa giấy và được đặt bên trong tủ cấy vô trùng có quạt thổi nhằm đảm bảo dung môi không còn trong mẫu.

Các phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính ức chế các chủng vi khuẩn thử nghiệm được xác định bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch (paper disc diffusion) (Hình 3A) và phương pháp pha loãng hoạt chất (broth dilution) (Hình 3B).

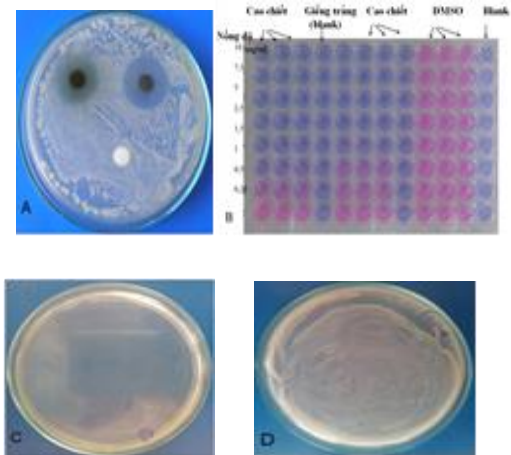
Với phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch [9, 10], các cao chiết được hòa tan trong ethanol ở nồng độ 200 mg/mL. Mỗi dịch cao chiết được thấm vào từng đĩa giấy (đường kính 6 mm, dày 1mm) sao cho khối lượng cao chiết ở mỗi đĩa giấy là 10 mg/đĩa giấy. Các đĩa giấy này được đặt trong tủ cấy vô trùng trong 15 phút nhằm làm bay hơi ethanol và để cho cao chiết được phân tán đều trên đĩa giấy. Sau đó, đặt từng đĩa giấy thử nghiệm trên đĩa môi trường thạch MH (Mueller Hinton) đã được cấy trái 100 µL dịch vi khuẩn ở nồng độ 10⁸ 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 3A). 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 2. Quy trình thu nhận các cao chiết lá và hoa dâm bụt bằng phương pháp ngâm dầm trong dung môi. Cao tổng EtOH, cao phân đoạn hexane, cao phân đoạn EtOAc, và cao EtOH còn lại

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) [10, 11]. Để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, các cao chiết này được pha loãng trong dung dịch DMSO thành các nồng độ khảo sát từ 0–10 mg/mL sao cho nồng độ DMSO không vượt quá 5%. 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 cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau trong dung dịch DMSO (Hình 3B). Các giếng đối chứng chứa dịch vi khuẩn, môi trường và DMSO. Mỗi thí nghiệm 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.



Hình 3. Phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch và vòng kháng khuẩn (A). Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các cao chiết 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 trái 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 MH (C), và đĩa đối chứng có mọc khuẩn lạc vi khuẩn (D).

Chất chỉ thị resazurin có màu xanh trong dung dịch. 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 cao chiết thực vật có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (không làm đổi màu resazurin) (Hình 3B). Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định bằng phương pháp trái 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 MH 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 cao chiết thực vật có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn trong giếng (Hình 3C), không có khuẩn lạc nào xuất hiện trên đĩa môi trường thạch MH, đĩa môi trường đối chứng có khuẩn lạc vi khuẩn xuất hiện (Hình 3D). Mỗi thí nghiệm được thực hiện ít nhất 3 lần vào các thời điểm khác nhau để khẳng định kết quả.

3 KẾT QUẢ- THẢO LUẬN

Tách chiết thu nhận cao tổng

Thành phần và hoạt tính của các cao chiết thực vật được chi phối đáng kể bởi quy trình tách chiết cũng như các loại dung môi và trình tự sử dụng các dung môi trong quá trình tách chiết [12, 13]. Cao thô (crude extract) hay còn gọi là cao tổng được thu nhận trước khi tiến hành tách cao phân đoạn là

cách tiếp cận của nhiều nghiên cứu khảo sát hoạt tính sinh học của thực vật [14]. Cao tổng thu được từ ngâm dầm mẫu trong hỗn hợp nước và ethanol với tỉ lệ 7:3 được đánh giá là chứa đa dạng các hợp chất của thực vật hơn là methanol, hexane và ethyl acetate [15]. Về tính an toàn cho môi trường và sức khỏe, ethanol được đánh giá cao hơn hexane, methanol, và ethyl acetate [15]. Ngoài ra, mẫu được ngâm với thành phần dung môi chứa nước sẽ tiêu tốn rất nhiều thời gian cho quá trình cô cạn mẫu do bởi nhiệt độ bay hơi của nước cao và cao chiết sẽ dễ bị nhiễm vi sinh vật, nhất là nấm mốc khi nước không được đuổi hoàn toàn khỏi mẫu. Vì các lý do này, chúng tôi sử dụng cồn tuyệt đối để thu nhận cao tổng. Kết quả thu nhận cao tổng và cao phân đoạn được ghi nhận ở Bảng 1 cho thấy rằng: hiệu suất chiết cao tổng EtOH của lá và hoa dầm bột lần lượt là 12,1% và 14,1% so với trọng lượng khô. Tỉ lệ phần trăm cao phân đoạn hexane và cao phân đoạn EtOAc chiếm trong cao tổng EtOH của lá lần lượt là 51,3% và 9,8%. Tỉ lệ phần trăm cao phân đoạn hexane và cao phân đoạn EtOAc chiếm trong cao tổng EtOH của hoa lần lượt là 12,1% và 2,5%. Dữ liệu cho thấy rằng tỉ lệ phần trăm của cao chiết hexane ở lá và hoa cao hơn tỉ lệ phần trăm của cao chiết EtOAc. Điều đó chứng tỏ rằng các hợp chất ít phân cực chiếm tỉ lệ cao trong hai loại cao tổng, nhất là cao lá.

Bảng 1. Hiệu suất các cao chiết từ mẫu bột khô lá và bột khô hoa dầm bột

Mẫu bột khô (2 kg)		Khối lượng cao (g)	Hiệu suất (%)
Cao lá	EtOH (cao tổng)	242,0	12,1
	Hexane	124,1	51,3
	EtOAc	23,7	9,8
	Cao EtOH còn lại	90,7	37,5
Cao hoa	EtOH (cao tổng)	282,0	14,1
	Hexane	34,1	12,1
	EtOAc	7,1	2,5
	Cao EtOH còn lại	238,7	84,6

Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết lá và hoa dầm bột

Hoạt tính kháng khuẩn của các cao tổng và các cao phân đoạn lên *Pr. mirabilis*, *Ps. aeruginosa*, và *K. pneumoniae* được xác định bằng phương pháp đĩa giấy (Bảng 2, Hình 4) và phương pháp pha loãng các cao chiết thực vật (Bảng 3 và 4). Kết quả chứng tỏ ở cả hai phương pháp các cao chiết lá và hoa dầm bột đều có hoạt tính kháng cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm, trong khi đó kháng sinh tetracycline chỉ kháng được 1 trong 3 chủng.

Kết quả của thử nghiệm bằng phương pháp đĩa giấy được ghi nhận trong Bảng 2 cho thấy rằng đường kính vòng kháng khuẩn do các loại cao chiết từ lá thay đổi từ 9–14,5 mm đối với *Ps. aeruginosa*, 9–12 mm đối với *Pr. mirabilis*, và 9–12,5 đối với *K. pneumoniae*. Đường kính vòng kháng khuẩn do các loại cao hoa thay đổi từ 9–17 mm đối với *Ps. aeruginosa*, 10–15 mm đối với *Pr. mirabilis*, và 10–13 đối với *K. pneumoniae*. Cao phân đoạn EtOAc biểu hiện mức độ kháng đối với cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm cao hơn hẳn so với các cao chiết còn lại. Tetracycline (0,03 mg/đĩa giấy) chỉ có khả năng kháng *Ps. aeruginosa*, không có khả năng kháng với 2 chủng *Pr. mirabilis* và *K. pneumoniae* thử nghiệm (Hình 4). Thậm chí 2 chủng vi khuẩn này có khả năng kháng lại tetracycline ở hàm lượng cao hơn (0,1 mg/đĩa giấy).

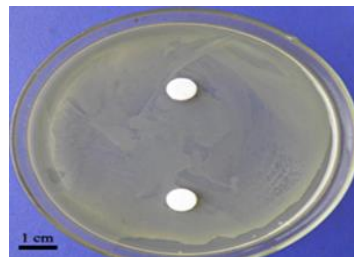
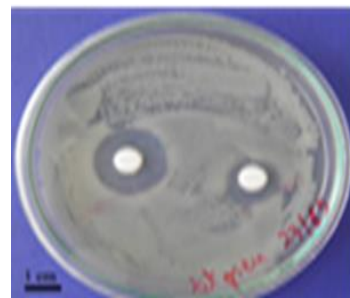
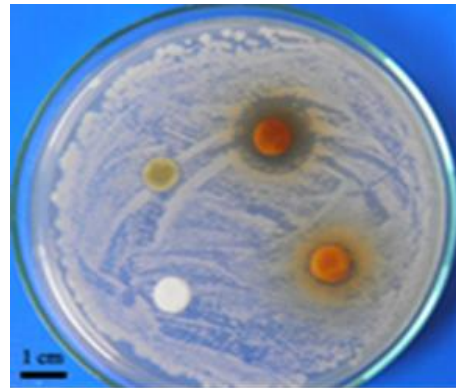
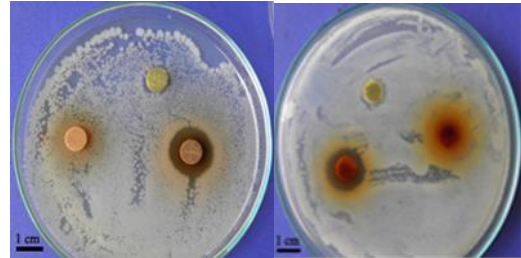
Nồng độ MIC và MBC của các cao ethanol và các cao phân đoạn đối với 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá bằng phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng với thuốc thử resazurin và bằng phương pháp trải đĩa. Kết quả được ghi nhận trong Bảng 3 và Bảng 4 cho thấy rằng các cao phân đoạn hexane từ lá và hoa, và cao EtOAc từ lá có hoạt tính tương tự nhau đối với cả 3 chủng thử nghiệm. Giá trị MIC của các cao này đối với 2 chủng *Pr. mirabilis* và *Ps. aeruginosa* là 7,5 và MBC từ 10–12,5 mg/mL. Tuy nhiên, chủng *K. pneumoniae* ít nhạy hơn với các cao chiết này so với 2 chủng vi khuẩn còn lại, với giá trị MIC (MBC) là 10(15) mg/mL. Trong khi đó cao phân đoạn EtOAc từ hoa cho thấy có hoạt tính mạnh nhất đối với cả 3 chủng thử nghiệm, giá trị MIC (MBC) là 2,5–5,0 (7,5) mg/mL đối với 2 chủng *Ps. aeruginosa* và *Pr. mirabilis*, và giá trị MIC (MBC) là 7,5 (10) mg/mL đối với chủng *K. pneumoniae* (Bảng 3 và 4).

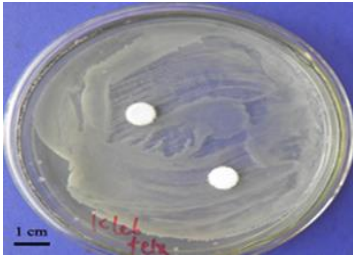
Nhiễm trùng đường tiết niệu là bệnh nhiễm trùng bệnh viện phổ biến, đứng thứ hai, chỉ sau viêm phổi và là một trong các vấn đề đáng lo ngại cho ngành Y tế do bởi sự kháng thuốc và sự đa nhiễm [16]. Các chế phẩm và các hợp chất thứ cấp ly trích từ thực vật như là một nguồn dược liệu phong phú, đầy triển vọng. Theo Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization), có khoảng 80% người ở các nước đang phát triển đã và đang sử dụng nguồn thuốc dân gian từ thực vật [17]. Vì thế bằng chứng khoa học về hiệu lực và tính an toàn của các chế phẩm thực vật, nhất là những thực vật được sử dụng trong dân gian cần được nghiên cứu và phát triển. Hoạt tính kháng khuẩn của các chế phẩm từ nhiều bộ phận khác nhau của thực vật đối với các vi khuẩn nhiễm trùng đường tiết niệu được báo cáo trong nhiều nghiên cứu. Sharma và cộng

sự (2009) nghiên cứu khảo sát hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn kháng đa kháng sinh gây nhiễm trùng đường tiết niệu (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* và *Enterococcus faecalis*) của các cao chiết ethanol, acetone và nước từ 17 loại cây thuốc dân gian Ấn Độ cho thấy rằng: cao chiết ethanol của củ gừng *Zingiber officinale* và cao chiết ethanol từ hạt lựu *Punica granatum* biểu hiện tính kháng mạnh các chủng *E. coli*, trong khi đó, cao chiết ethanol của quả kha từ *Terminalia chebula* và lá hương nhu tía *Ocimum sanctum* chứng tỏ kháng đối với *K. pneumoniae*; Cao chiết ethanol của vỏ thân quế *Cinnamomum cassia* biểu hiện hoạt tính kháng *Ps. aeruginosa* cực mạnh, và cao ethanol của quả cây neem *Azadirachta indica* và lá *Ocimum sanctum* biểu hiện tính kháng với *E. faecalis* [18]. Kết quả nghiên cứu của Mishra và cộng sự (2015) [16] cho thấy rằng: cao methanol của lá chò nhai *Anogeissus acuminata*, lá lựu *P. granatum* và lá *Soymida febrifuga* biểu hiện hoạt tính mạnh đối với các chủng vi khuẩn kháng đa kháng sinh gây nhiễm trùng đường tiết niệu (*E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Pr. mirabilis*, *Pr. vulgaris*, và *Ps. aeruginosa*). Nghiên cứu của Kalyan và cộng sự (2009) [19] cho thấy cao chiết ethanol của búp giấm *Hibiscus sabdariffa* Linn, loại thực vật được người dân Ấn Độ sử dụng chữa bệnh sỏi thận, có tác dụng ức chế hình thành sỏi thận ở mô hình chuột [19].

Nhiều nghiên cứu [20 - 22] đã chỉ rõ *H. rosa-sinensis* có các hoạt tính sinh học và được đề nghị sử dụng như nguồn dược liệu dân gian. Cao chiết lá và hoa của *H. rosa sinensis* đã được chứng minh giàu các hợp chất có hoạt tính kháng oxid hóa, kháng khuẩn như phenolic, steroid, triterpene, tannin, flavonoid tổng số và flavonoid sinh học. Arullappan và cs (2009) [23]. 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*, *Ps. 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*). Theo Uddin và cs (2010) [24], cao chiết MeOH từ lá có hoạt tính kháng *S. aureus* và không có khả năng kháng *K. pneumoniae*. Nghiên cứu của Seyyedneja (2010) [25] 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. Ruban và Gajalakshmi (2012) [26] đã báo cáo cao chiết ethanol từ hoa dâm bụt có hoạt tính kháng với *Ps. aeruginosa* và *Salmonella* sp., tạo vòng kháng khoảng 16 mm, trong khi cao methanol không có hoạt tính đối với hai chủng vi khuẩn này.





Hình 4. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết EtOAc từ hoa dâm bụt (A, B, C với dấu mũi tên) và tetracycline lên *Ps. aeruginosa* (D), *Pr. mirabilis* (E) và *K. pneumoniae* (F)

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các cao chiết lá và hoa dâm bụt lên *Pr. mirabilis*, *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae*

Mẫu vật		MIC (mg/mL)		
		<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Pr. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Cao lá	EtOH	10	10	10
	Hexane	7,5	7,5	10
	EtOAc	7,5	7,5	10
Cao hoa	EtOH	7,5	7,5	10
	Hexane	7,5	7,5	10
	EtOAc	5,0	2,5	7,5

Bảng 4. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của các cao chiết lá và hoa dâm bụt lên *Pr. mirabilis*, *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae*

Mẫu vật		MBC (mg/mL)		
		<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Pr. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Cao lá	EtOH	15	12,5	15
	Hexane	12,5	10	15
	EtOAc	12,5	10	12,5
Cao hoa	EtOH	12,5	12,5	15
	Hexane	12,5	10	15
	EtOAc	7,5	7,5	10

Kết quả trong báo cáo này cho thấy cả hai loại cao chiết lá và hoa dâm bụt có hoạt tính tương tự như trong các nghiên cứu trên và ở cả hai phương pháp đĩa giấy và phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng đối với cả ba chủng *Pr. mirabilis*, *Ps. aeruginosa* và *K. pneumoniae* là các tác nhân chính gây nhiễm trùng đường tiết niệu và gây sỏi thận struvite. Mặc dù tác nhân gây nhiễm đường tiết niệu chủ yếu là do *E. coli*, nhưng vi khuẩn này lại là tác nhân ít quan trọng trong nhiễm khuẩn đường tiết niệu có liên quan đến sỏi thận; thay vào đó là sự nhiễm đáng kể của các chủng *Proteus*, *Pseudomonas* và *Klebsiella* sp. Chúng đóng một vai trò nhất định trong nhóm vi khuẩn sinh ra enzyme urease. Enzyme này làm gia tăng lượng ammoniac trong nước tiểu dẫn đến gia tăng tổn thương lớp glycosaminoglycan, và do đó làm gia tăng tính bám dính của vi khuẩn và làm tăng sự

hình thành của tinh thể struvite [4 - 6]. Trong một nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi, hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết lá dâm bụt lên *S. aureus* và *K. pneumoniae*, hai trong số các tác nhân quan trọng hàng đầu gây nhiễm khuẩn bệnh viện, cho thấy cả hai cao phân đoạn hexan và EtOAc đều có hoạt tính kháng như nhau lên *S. aureus*, nhưng kháng rất yếu lên *K. pneumoniae* [10]. Trong nghiên cứu này, khi so sánh các cao chiết từ lá và hoa thì cao chiết EtOAc từ hoa có hoạt tính mạnh hơn so với cao chiết khác về hoạt tính kháng vi khuẩn gây sỏi thận đường tiết niệu.

Nước sắc từ hoa và lá dâm bụt *H. rosa-sinensis* đã được sử dụng từ lâu trong dân gian để chữa các bệnh động kinh, bệnh phong, viêm phế quản và bệnh tiểu đường [27]. Nghiên cứu này góp phần bổ sung vào dữ liệu kháng khuẩn của loài thực vật này. Nhằm ứng dụng vai trò của các chế phẩm hoặc chế tạo các thuốc bổ sung (complementary medicine) từ lá và hoa *H. rosa-sinensis* trong việc phòng và trị bệnh nhiễm các loại vi khuẩn gây nhiễm trùng đường tiết niệu và ức chế sự hình thành sỏi thận struvite, các nghiên cứu bằng mô hình *in vivo* cần được thực hiện.

4 KẾT LUẬN

Các cao chiết ethanol, cao phân đoạn hexane và EtOAc của lá và hoa dâm bụt *Hisbicus rosa-sinensis* có tính kháng với *Proteus mirabilis* và *Pseudomonas aeruginosa*. Chúng vi khuẩn thử nghiệm *Klebsiella pneumoniae* ít nhạy với các cao chiết từ lá và hoa dâm bụt hơn so với *Pr. mirabilis* và *Ps. aeruginosa*. Trong đó cao EtOAc từ hoa có hoạt tính mạnh nhất kháng cả ba chủng vi khuẩn này. Việc xác định các thành phần có hoạt tính kháng khuẩn trong các loại cao dung môi từ lá và hoa dâm bụt cần được tiếp tục nghiên cứu. Các nghiên cứu sâu hơn về sinh hóa học và dược học cần được khảo sát để có thể sử dụng các cao chiết này như là thuốc kháng khuẩn.

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

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*, vol. 20, no. 12, pp. 522-531, 2002.
- [2]. 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*, vol. 7, no. 5, pp. 257–26, 1994.
- [3]. L. Nicolle, Complicated urinary tract infection in adults, *Can. J. Infect Dis. Med. Microbiol.*, vol. 16, pp. 349–360, 2005.
- [4]. S. Saint, C.E. Chenoweth, Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 17, 411–432 (2003).
- [5]. Vũ Lê Chuyên, Vũ Nguyễn Khải Ca, Trần Ngọc Sinh, Phạm Hùng Vân, Trần Quang Bình, Võ Tam, Hà Phan Hải An, Lê Đình Khánh, Nguyễn Phúc Cẩm Hoàng, Trà Anh Duy, “Hướng dẫn điều trị viêm khuẩn đường tiết niệu ở Việt Nam”, *Hội Tiết niệu-Thận học Việt Nam*, 2013, pp. 41–49.
- [6]. A. Pallett, K. Hand, “Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria”. *J. Antimicrobial Chemother.*, iii25–iii33, 2010, pp. 65 (suppl 3).
- [7]. V.M. Jadhav, R.M. Thorat, V.J. Kadam, N.S. Sathe, Traditional medicinal uses of *Hibiscus rosa-sinensis*. *J. Pharm.Res.*, vol. 2, no. 8, pp. 1220–1222, 2009.
- [8]. P.X. Trung, “Chữa bệnh bằng cây dâm bụt”, *Nông Nghiệp Việt Nam* (theo Nam dược thần hiệu), http://www.ykhoa.net/yhoccotruyen/baiviet/29_010.htm, 2000.
- [9]. T.T. Hieu, L.T.M. Ngan, N.N. Toan, N.M.P. Long, B.V. Le, “*In vitro* antifungal activity of essential oils against *Fusarium* spp.”, *J. Sci. Tech.*, vol. 53, no. 6B, pp. 51–64, 2015.
- [10]. Lương Thị Mỹ Ngân, Nguyễn Thị Thuỳ Linh, Nguyễn Ngọc Quý, Phạm Thị Ngọc Huyền, Trương Thị Huỳnh Hoa, Trần Trung Hiếu, Phạm Thành Hồ, “Nghiên cứu hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* và *Klebsiella pneumoniae* của cao chiết lá dâm bụt (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)”, *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, vol. 19, no. 5, pp. 84–94, 2016.
- [11]. 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.*, vol. 60, pp. 9062–9073, 2012.
- [12]. T.M. Rababah, F. Banat, A. Rababah, K. Ereifej, W. Yang, “Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate”, *J. Food Sci.*, vol. 75, no. 7, pp. C626–C632, 2010.
- [13]. N. Pellegrini, B. Colombi, S. Salvatore, O. V. Brenna, G. Galaverna, D. Del Rio, M. Bianchi, R. Bennett, F. Brighenti, “Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents”, *J. Sci. Food Agric.*, vol. 87, pp. 103–111, 2007.
- [14]. F.E. Koehn, “High impact technologies for natural products screening”, In *Natural Compounds as Drugs* Volume 1, Birkhäuser Basel, pp. 175–210, 2008.
- [15]. A.C. Martin, A.D. Pawlus, E.M. Jewett, D.L. Wyse, C.K. Angerhofer, A.D. Hegeman, “Evaluating solvent extraction systems using metabolomics approaches”. *RSC Advances*, vol. 4, no. 50, pp. 26325–26334, 2014.
- [16]. M.P. Mishra, S. Rath, S.S. Swain, G. Ghosh, D. Das, R.N. Padhy, “*In vitro* antibacterial activity of crude extracts of 9 selected medicinal plants against UTI causing MDR bacteria”. *Journal of King Saud University-Science*, vol. 29, pp. 84–95, 2015.
- [17]. J.N. Ellof, “Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?” *J. Ethnopharmacol.* Vol. 60, pp.1–6, 1998.
- [18]. A. Sharma, S. Chandraker, V.K. Patel, P. Ramteke, Antibacterial activity of medicinal plants against pathogens causing complicated urinary tract infections. *Indian J of Pharm Sci.*, vol. 71, no. 2, pp. 136–139 (2009)
- [19]. S. Kalyan, Betanabhatla, A.J.M. Christina, B.M. Syama, “Antilithiatic activity of *Hibiscus sabdariffa* Linn on ethylene glycol induced lithiasis in rats”. *Nat. Prod. Rad.*, vol. 81, pp. 43–47, 2009.
- [20]. 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.*, vol. 25, no. 4, pp. 275–282, 2013.
- [21]. F.O. Obi, I.A. Usenu, J.O. Osayande, “Prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat by *H. rosa sinensis* anthocyanin extract administered in ethanol”, *Toxicol.*, vol. 131, pp. 93–98, 1998.
- [22]. F.R.A. Ghaffar, I. A. E. Elaimy, “*In vitro* antioxidant and scavenging activities of *Hibiscus rosa sinensis* crude extract”. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 2, no. 2, pp. 51, 2012.
- [23]. S. Arullappan, Z. Zakaria, D.F. Basri, “Preliminary screening of antibacterial activity using crude extracts of *Hibiscus rosa sinensis*”, *Trop. Life. Sci. Res.*, vol. 20, no. 2, pp. 109–118, 2009.
- [24]. 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.*, vol. 22, pp. 65–73, 2010.
- [25]. 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”, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 3, no. 5, pp. 351–355, 2010.
- [26]. P. Ruban, K. Gajalakshmi, “*In vitro* antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract against human pathogens”, *Asian Pacific Journal of Tropical*, vol. 2, no. 5, pp. 399–403, 2012.
- [27]. A. Kumar, A. Singh, “Review on *Hibiscus rosa sinensis*”, *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* vol. 3, no. 2, pp. 534–538, 2012.

Study on antibacterial activities of *Hibiscus rosa-sinensis* L. Leaf and flower extracts against *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*

Luong Thi My Ngan, Le Thi Kim Lan, Nguyen Thi Thuy Linh, Nguyen Ngoc Quy, Le Thi Thanh Loan,
Truong Thị Huynh Hoa, Tran Trung Hieu
University of Science, VNU-HCM
Corresponding author: ltmngan@hcmus.edu.vn

Received: 02-01-2017, Accepted: 24-7-2018, Published: 10-08-2018

Abstract – Antibiotic resistance of bacterial strains causing serious diseases is one of the major concerns of public health worldwide. Metabolites of plants, particularly higher plants, have been suggested as alternative potential sources for antibacterial products due to their safe. They have little or no side effects and may act at multiple and novel target sites to bacteria. The study aims to evaluate antibacterial activities of leaf and flower extracts and solvent soluble fractions of the extracts against *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*, the major causes of infection-related kidney stones (struvite stones). Diameters of inhibitory zones, and MIC and MBC values of the extracts and fractions against the bacteria were evaluated. The results

showed that the extracts and fractions derived from flowers have activities stronger than those from leaves, especially the ethyl acetate fraction (EtOAc fr.). The inhibitory zone diameters of 10 mg per paper disc of the EtOAc fr. towards *Ps. aeruginosa*, *Pr. mirabilis*, and *K. pneumoniae* were 17, 15 and 13 mm, respectively. The EtOAc fraction. had antibacterial activity against both *Ps. aeruginosa* and *Pr. mirabilis* with MIC (MBC) values of 2.5–5.0 (7.5) mg/mL and against *K. pneumoniae* with MIC (MBC) values of 7.5 (10) mg/mL. The fraction needs to be more studied for identifying its major active constituents. These leaf and flower extracts of *H. rosa-sinensis* could be used to treat against urinary tract infections caused by multiple drug resistant bacteria.

Index Terms – *Hibiscus rosa-sinensis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, antibacterial activity, plant extracts