
**A STUDY ON ANTIBACTERIAL EFFECTS, POLYPHENOL CONTENTS
AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF EXTRACTS
FROM PLUCHEA INDICA**

Tran Thi Hong¹, Hoang Thanh Hao², Nguyen Thi Thanh Ha^{2*}, Nguyen Thanh Hai²

¹National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

²Vietnam National University of Agriculture

Received 16 February 2024

Accepted 28 March 2024

Abstract: Our study investigated antibacterial effects of extracts from *Pluchea Indica* on gram positive and negative bacteria, including *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. In addition, we also measured polyphenol contents and antioxidant activities, applying Folin Ciocalteu and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reagents. Extracts from 6 solvents, including hot water, ethanol, methanol, ethyl acetate, acetone and hexane were used. Experiments were performed in Laboratory of Pharmacology research and Drug development, Center of Research excellence and Innovation, Vietnam National University of Agriculture, from October 2023 to February, 2024. The results showed that *Pluchea Indica* exerted inhibition on gram positive bacteria, including *B. subtilis* and *S. aureus*, and also contained polyphenol and antioxidant activities at significant levels. It confirms the potentials of applying this plant as a natural therapy for bacteria infections. In 6 investigated solvents, methanol showed the best extracting efficacies, in all of 3 parameters, including antibacterial properties, polyphenol contents and antioxidant activities. These results suggest that this solvent should be further studied to explore the potentials of *Pluchea Indica* and make use of this material in practice.

Key words: *Pluchea Indica*, extract, antibacterial effects, polyphenol, antioxidant activity

* Corresponding author

E-mail address: phexinhdep@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v4i1.143>

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ỨC CHẾ VI KHUẨN VÀ KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG POLYPHENOL, HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CÁC DỊCH CHIẾT TỪ DƯỢC LIỆU CÚC TÀN (*PLUCHEA INDICA*)

Trần Thị Hồng¹, Hoàng Thanh Hảo², Nguyễn Thị Thanh Hà^{2*}, Nguyễn Thanh Hải²

¹Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

²Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 02 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 03 năm 2024

Tóm tắt: Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành khảo sát dịch chiết của cây cúc tần (*Pluchea Indica*) trên các vi khuẩn gram dương và gram âm, bao gồm *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 và *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. Bên cạnh đó, hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết cũng được xác định, sử dụng thuốc thử Folin Ciocalteu và 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Sáu loại dung môi được sử dụng để chiết dược liệu cúc tần, bao gồm: nước nóng, ethanol, methanol, ethyl acetate, acetone và hexane. Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Dược lý và Phát triển thuốc, Trung tâm nghiên cứu xuất sắc và đổi mới sáng tạo, Học viện Nông Nghiệp Việt Nam từ tháng 10 năm 2023 đến tháng 2 năm 2024. Kết quả cho thấy, các dịch chiết có khả năng ức chế nhóm vi khuẩn gram dương, bao gồm *B. subtilis* và *S. aureus*, đồng thời có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa ở mức đáng kể. Điều này khẳng định tiềm năng ứng dụng của cây thuốc này với vai trò là một chất kháng khuẩn có nguồn gốc tự nhiên. Trong số các dung môi khảo sát, methanol cho hiệu quả tốt nhất trên cả 3 chỉ tiêu và ức chế vi khuẩn, hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa. Theo đó, chúng tôi cho rằng dịch chiết với dung môi này nên được tiếp tục nghiên cứu để khai thác khả năng ứng dụng của cây thuốc này trong thực tiễn.

Từ khóa: cúc tần, dịch chiết, kháng khuẩn, polyphenol, chống oxy hóa.

1. Đặt vấn đề

Theo quan niệm truyền thống, kháng sinh được định nghĩa là những chất do các vi sinh vật (vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn...) tạo ra

có khả năng ức chế sự phát triển hoặc tiêu diệt vi khuẩn. Hiện nay, khoa học kỹ thuật ngày càng phát triển kháng sinh không chỉ được tạo ra bởi các vi sinh vật mà còn được tạo ra bằng

quá trình bán tổng hợp hoặc tổng hợp hóa học. Nguồn kháng sinh này được sử dụng không hợp lý, có phần lạm dụng kháng sinh gây hiện tượng kháng kháng sinh, tồn chất kháng sinh trong thực phẩm, chăn nuôi. Ngày nay có càng nhiều mối quan tâm đối với việc tìm kiếm các chất kháng khuẩn có nguồn gốc tự nhiên. Đặc biệt các cây dược liệu, chúng cho ít tác dụng phụ, khả năng kháng chậm hơn, an toàn khi sử dụng.

Cúc tần hay còn có tên gọi khác là cây từ bi, đại ngải, nan luật, có tên khoa học là *Pluchea Indica*. Đây là loại cây thuốc phổ biến, được y học cổ truyền ứng dụng cho việc chữa trị nhiều loại bệnh [1]. Các nghiên cứu đã chứng minh cúc tần được có tác dụng trên bệnh đái tháo đường, u bướu, tăng huyết áp và viêm bàng quang. Dịch chiết của lá cây ức chế sự phát triển của cả vi khuẩn gram âm và gram dương [2], đồng thời cũng có nhiều các hoạt tính sinh học khác, điển hình như khả năng chống oxy hóa và chống viêm [3]. Tuy nhiên, các khảo sát về cây thuốc này với nguồn nguyên liệu thu thập tại Việt Nam còn chưa nhiều. Vì thế, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn, hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ nguồn dược liệu này tại Việt Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Cúc tần đã qua sơ chế do công ty dược liệu cổ truyền Bình An (Nghĩa Trai, Hưng Yên) cung cấp. Vi khuẩn thí nghiệm được thu mua từ bộ sưu tập giống chuẩn ATCC của Mỹ (ATCC, American Type Culture Collection), gồm các chủng là *Bacillus subtilis* (*B. Subtilis*) ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 9027 và *Salmonella typhimurium* ATCC 13311.

2.2. Chiết xuất dược liệu

Dược liệu khô được nghiền nhỏ, mịn với kích thước < 0,5 mm. Ngâm dược liệu trong từng loại dung môi nước nóng, methanol, ethanol, ethyl acetate, acetone và hexane với tỉ lệ 1/30 (g/ml) cứ 10g dược liệu khô ngâm trong 300ml dung môi. Với dung môi ethanol, methanol vortex dung dịch 5 - 10 phút để ngâm sau 24 giờ. Đối với dung môi nước nóng vortex 30 phút sau đó lọc qua bằng vải lọc. Sử dụng các ống tube 15ml để đựng dịch chiết dược liệu chuẩn bị để ly tâm. Ly tâm lọc tại tần số 3500 vòng/ phút trong thời gian 10 phút lắng các cặn thảo dược. Dùng giấy lọc để loại bỏ phần cặn bị trôi trong quá trình đổ dịch chiết từ tube 15ml thu lấy dịch chiết. Đối với từng dung môi dược liệu nhiệt độ chiết cao không cao quá 45°C để dược liệu giữ được hoạt tính sinh học giảm các tác động xấu đến hoạt tính trong quá trình chiết. Dịch

chiết sau đó được cô quay hút chân không, sử dụng máy cô quay chân không (RE- 501 Rotary evaporator, công ty Zheng Keda, Trung Quốc) để loại hết dung môi trong áp suất thấp. Cao dược liệu của 6 dung môi sau khi chiết xuất được bảo quản tại nhiệt độ - 30 °C và sử dụng trong vòng 3 tháng. Khi thí nghiệm, cao được hòa tan bởi dimethyl sulfoxide (DMSO) pha loãng thành 5ml dịch chiết hàm lượng dịch chiết gốc này có nồng độ 2g/ml (khối lượng dược liệu khô/ ml). Dược liệu gốc được pha loãng tại 4 nồng độ: 250; 500; 1000; 2000 mg/ml. Dịch chiết dược liệu lúc này được bảo quản dịch chiết dược liệu đông lạnh để đảm bảo dược liệu giữ được hoạt tính trong thời gian dài.

2.3. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết dược liệu trên vi khuẩn

Việc kiểm tra tác dụng ức chế của các dịch chiết được thực hiện theo nguyên lý khuếch tán trên thạch của Kirby-Bauer. Canh khuẩn có nồng độ 10^6 cfu/ml được cấy trên bề mặt thạch Muller Hinton (Merck, Đức) [4, 5]. Đợi sau khi bề mặt thạch khô, chúng tôi tiếp tục sử dụng các ống khâu bằng đồng có đường kính bên trong lòng ống là 1cm để đục và tạo ra 4 giếng bên trong lòng đĩa, sao cho mỗi giếng cách nhau 2-3 cm. Cuối cùng, 100 μ l dịch chiết dược liệu tại các nồng độ khác

n nhau được lần lượt nhỏ vào mỗi giếng. Các đĩa thạch này sau đó được để trong tủ mát tại nhiệt độ 15 °C trong 3 tiếng để dịch chiết khuếch tán hết ra bề mặt thạch [6], rồi tiếp tục chuyển sang nuôi ở 37 °C trong 24 tiếng rồi lấy ra quan sát. Khi đó, tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn sẽ được đánh giá thông qua độ lớn của đường kính vòng vô khuẩn tạo ra xung quanh giếng, xác định bằng máy đo độ lớn vòng vô khuẩn (Haloes Caliper – Zone Reader).

2.4. Phương pháp xác định hàm lượng polyphenol

Hàm lượng polyphenol trong dịch chiết được chúng tôi xác định theo phương pháp của Suda *et al.* [7]. Ở các ống thí nghiệm, 0.1 ml chất chuẩn hoặc các dịch chiết pha loãng đến nồng độ 20 mg/ml sẽ được trộn với 0.5 ml *Folin-Ciocalteu's* phenol reagent (Merck, Đức). Sau khi để yên tại nhiệt độ phòng trong 3 phút, mỗi ống sẽ được cho thêm 0,5 ml 10% Na_2CO_3 và 2,5 ml nước cất, rồi ủ trong 60 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Mức độ hấp phụ của các ống được xác định tại bước sóng 750 nm, sử dụng máy quang phổ so màu 722 (Ultra Violet-Visibility Spectrum, công ty Jinghua, Trung Quốc). Thí nghiệm của tôi sử dụng acid Chlorogenic (Merck, Đức) làm chất chuẩn để tính toán hàm lượng polyphenol, theo đó hàm

lượng polyphenol trong mỗi 100mg bột được liệu được quy đổi tương đương sang số mg acid Chlorogenic.

2.5. Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa

Trong nghiên cứu này tôi xác định hoạt tính oxy hoá bằng các phân tích sử dụng chất DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), theo phương pháp của Masuda *et al.* [8]. Dung dịch DPPH sử dụng trong thí nghiệm được pha bằng cách trộn 0.1 g DPPH với 50 ml ethanol 96%. Ở các ống thí nghiệm, 0.1ml chất chuẩn hoặc các dịch chiết pha loãng đến nồng độ 20 mg/ml sẽ được trộn với 50 µl DPPH và 2,4ml nước cất. Vortex dung dịch trong 10 giây để trong bóng tối 60 phút rồi đo. Mức độ hấp phụ ánh sáng của các ống được xác định tại bước sóng 515 nm, với các ống đối chứng âm bao gồm 100 ml dịch chiết + 50 µl dung môi DMSO (không có DPPH) + 2,4 ml nước cất, còn ống đối chứng gồm 2,5 ml nước cất + 50 µl DPPH.

Khả năng chống oxy hóa của mẫu thí nghiệm được tính toán theo công thức:

$$AA \% = \frac{Ac-As-Ab}{Ac} \times 100$$

Trong đó:

Ac= Giá trị mật độ quang (OD) của ống đối chứng

As = Giá trị mật độ quang (OD) của ống thí nghiệm

Ab = Giá trị mật độ quang (OD) của ống đối chứng âm

Thí nghiệm của chúng tôi sử dụng Vitamin E (alpha-Tocopherol, Merck, Đức) làm chất chuẩn để tính toán hoạt tính chống vi khuẩn, theo đó hoạt tính chống oxy hóa của 100 mg bột dược liệu sẽ được quy đổi tương đương sang số mg Vitamin E.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả đường kính đường kính vòng vô khuẩn của cao chiết cúc tần

Kết quả đường kính đường kính vòng vô khuẩn của cao chiết cúc tần bởi 6 dung môi được chúng tôi trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của dược liệu cúc tần.

Vi khuẩn	Dung môi	Kích thước đường kính vòng vô khuẩn mm			
		250mg/ml	500mg/ m	1000mg/ml	2000mg/ ml
<i>B. subtilis</i>	Methanol	1.11±1.56	2.01±0.05	2.76±1.35	3.48±0.60
	Ethanol	2.82±0.72	2.425±0.73	1.34±0.33	2.67±0.70
	Ethyl	1.51±0.57	1.75±0.99	2.28±1.42	3.34±0.57
	Aceton	2.20±1.26	3.27±0.29	2.97±0.29	3.39±0.26
	Hexane	2.22±0.25	2.72±0.43	3.18±1.07	3.27±0.83
<i>S. aureus</i>	Methanol	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	8.78±0.89

Ghi chú: Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của từng giá trị. Các dịch chiết không tạo đường kính vòng vô khuẩn tại mọi nồng độ thí nghiệm không được thể hiện trên bảng. .

Kết quả của chúng tôi cho thấy dịch chiết cúc tần chỉ cho tác dụng trên vi khuẩn gram dương, trong khi không có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gram âm, bao gồm *P. aureginosa* và *E. coli*. Điều này tương đồng với kết quả kháng khuẩn của nghiên cứu của Sirikhwan [9], trong đó kháng định vi khuẩn gram dương thường mẫn cảm hơn với các chất có hoạt tính kháng khuẩn. Điều này được giải thích một phần là do sự khác biệt trong đặc điểm cấu tạo của lớp vỏ vi khuẩn giữa nhóm vi khuẩn gram dương và gram âm. Trong khi vỏ vi khuẩn gram dương chỉ gồm có thành tế bào được cấu tạo từ peptidoglycan và một lớp phospholipid, thì vỏ của vi khuẩn gram âm lại bao gồm thêm cả lớp lipopolysaccharide có tính tự vệ cao ở phía bên ngoài, theo đó giúp nhóm vi khuẩn này

đề kháng tốt hơn với sự xâm nhập của các tác nhân kháng khuẩn.

Khi so sánh dịch chiết của các dung môi khác nhau, chúng tôi thấy dung môi methanol cho hoạt tính kháng khuẩn tối ưu nhất, thể hiện được tác dụng trên cả 2 vi khuẩn gram dương là *B. subtilis* và *S. aureus* 25923. Ngược lại, dung môi nước nóng cho hiệu quả kém nhất khi không tạo ra vòng vô khuẩn trên tất cả các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Điều này được giải thích là do các hoạt chất có tính kháng khuẩn trong thực vật như các hợp chất polyphenol thường kém tan trong nước hơn so với dung môi hữu cơ, trong khi hầu hết các thành phần có khả năng ức chế vi sinh vật phát triển của thực vật đã được xác định là có khả năng tan vào các dung môi nhóm rượu, ví dụ như methanol.

3.2. Kết quả xác định hàm lượng polyphenol dịch chiết cúc tần

Kết quả đo hàm lượng polyphenol được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng polyphenol của dịch chiết cúc tần (tính theo mg acid chlorogenic quy đổi/ 100 mg bột dược liệu).

Dung môi	Hàm lượng polyphenol
Nước nóng	0.390±0.019
Methanol	0.707±0.043
Ethanol	0.008±0.001
Ethyl acetate	0.016±0.001
Acetone	0.033±0.002
Hexane	0.004±0.001

Từ kết quả ở bảng 2 chúng tôi thấy hàm lượng polyphenol của dịch chiết cúc tần với dung môi methanol là cao nhất, đạt 0.707±0.043 (mg acid chlorogenic quy đổi/ 100 mg bột dược liệu), sau đó là đến dịch chiết với dung môi nước nóng, đạt

0.390 ± 0.019 (mg acid chlorogenic quy đổi/ 100 mg bột dược liệu).

3.3. Kết quả xác định khả năng chống oxy hóa của dược liệu

Kết quả xác định hoạt tính chống oxy hóa được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết cúc tần (tính theo mg Vitamin E quy đổi/ 100 mg bột dược liệu).

Dung môi	Hoạt tính chống oxy hóa
Nước nóng	0.536±0.362
Methanol	1.043±0.420
Ethanol	0.154±0.029
Ethyl acetate	0.138±0.000
Acetone	0.485±0.419
Hexane	0.040±0.007

Từ bảng 3 chúng ta thấy tương tự như kết quả xác định hàm lượng polyphenol, thì dịch chiết cúc tần với dung môi methanol cũng cho hoạt tính chống oxy hoá mạnh nhất, đạt 1.043 ±

0.420 (mg Vitamin E quy đổi/ 100 mg bột dược liệu), sau đó là đến dung môi nước nóng, đạt 0.536 ± 0.362 (mg Vitamin E quy đổi/ 100 mg bột dược liệu).

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu chúng tôi đã sơ bộ chứng minh được khả năng ức chế của các tannin trên vi khuẩn gram dương là *B. subtilis* và *S. aureus*, theo đó khẳng định tiềm năng ứng dụng của dược liệu này với vai trò chất kháng khuẩn tự nhiên. Bên cạnh đó, nghiên cứu của chúng tôi còn cho thấy dược liệu này có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hoá ở mức cao. Trong số 6 dung môi khảo sát, dung môi methanol tạo ra dịch chiết tannin có đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất, đồng thời cũng có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hoá cao nhất. Do đó, methanol được xác định là dung môi ưu việt nhất để chiết xuất dược liệu này. Tuy nhiên, chúng tôi cho rằng còn cần thêm nhiều công tác nghiên cứu tiếp để xác định hoạt chất chính trong dược liệu, cũng như đánh giá tác dụng của dịch chiết trên cơ thể động vật và trong điều kiện *in vivo*.

Tài liệu tham khảo

[1] Đỗ Tất Lợi (2014), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Hồng Đức, Hà Nội.

[2] Qiu, Y. Q., Qi, S. H., Zhang, S., Tian, X. P., Xiao, Z. H., Li, M. Y., & Li, Q. X. (2008). Thiophene derivatives from the aerial part of *Pluchea indica*. *Heterocycles*, 75, 1757-1764.

<https://doi.org/10.3987/COM-08-11345> on May 13, 2022

[3] Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., & Srisook, K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(2), 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.01.01> on May 13, 2022

[4] Hudzicki & Jan (2009). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol* (2020). Retrieved from <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf> on March 22.

[5] Nguyễn Thanh Hà. *Phương pháp kỹ thuật khoan giấy kháng sinh khuếch tán*. Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật Y học. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1991:329-338.

[6] Bùi Thị Tho & Nguyễn Thị Thanh Hà (2009). *Giáo trình Dược liệu Thú y*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội

[7] Suda, I., T. Oki, Y. Nishiba, M. Masuda, M. Kobayashi, S. Nagai, R. Hiyane & T. Miyashige (2005). “Poluphenol Contents and Radical-Scavenging Activity of Extracts from Fruits and Vegetables in Cultivated in Okinawa, Japan.”

Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology-nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi - J JPN SOC FOOD SCI TECHNOL 52: 462-471.

[8] Masuda, T.; Oyama, Y.; Inaba, Y.; Toi, Y.; Arata, T.; Takeda, Y.; Nakamoto, K.; Kuninaga, H.; Nishizato, S.; Nonaka, A. Antioxidant related activities of ethanol extracts from edible and medicinal plants cultivated in Okinawa, Japan. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2002**, *49*, 652–661.

[9] Sirikhwan, T. (2021). Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial assessment of *Pluchea indica* (L.) Less extract as an active ingredient in natural lotion bar. *Int. J. Curr. Pharm. Res*,13(2), 51-57. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2021v13i2.415> 55 on May 13, 2022.