

STUDY ON MORPHOLOGICAL, PHYTOCHEMICAL PROPERTIES AND ANTI-MICROBIAL ACTIVITY OF *AGERATUM CONYZOIDES* (LINN.) ASTERACEAE

Nguyen Thi Bach Tuyet*, Tran Thi Ngoc Mai, Nguyen Thi Thanh Nga, Pham Ben Chi

Nguyen Tat Thanh University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 23/12/2022 Revised: 09/4/2023 Published: 13/4/2023	This study aimed to evaluate morphological, phytochemical properties and anti-microbial activities of fractions of <i>Ageratum conyzoides</i> (AC). The sample was collected in Binh Duong province in June 2018 for analyzing its morphology, anatomical characteristics. Preliminary phytochemical screening of the leaves ethanol extract based on the Ciuley's procedure. Fraction extracts were prepared by partitioning method with solvents n-hexane, chloroform, ethyl acetate, and methanol. Their antimicrobial activities were determined by agar disc diffusion and agar dilution method. Morphological and anatomical characteristics of the parts of the collected plant showed many features of <i>A. conyzoides</i>. Its leaves contained flavonoid, alkaloid, polyphenol, tannin, saponin, reductant and essential oil. The ethylacetate extract exhibited the growth strongest of <i>S. aureus</i>, MRSA, <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i> with MIC value corresponding 125, 125, 500, 500 µg/mL. The chloroform fraction had the strongest antifungal activity, resisted <i>T. rubrum</i>, <i>M. gypseum</i>, <i>T. mentagrophytes</i> with MIC value corresponding 250, 250, 500 µg/mL. The results could provide basic information to isolate and determine the structure of substances with antibacterial and antifungal activities from the potential fractions.
KEYWORDS <i>Ageratum conyzoides</i> Morphological Phytochemical properties MIC Anti-microbial	

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT CỦA CÂY NGŨ SẮC *AGERATUM CONYZOIDES* (LINN.) ASTERACEAE

Nguyễn Thị Bạch Tuyết*, Trần Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Thanh Nga, Phạm Bền Chí

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 23/12/2022 Ngày hoàn thiện: 09/4/2023 Ngày đăng: 13/4/2023	Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát đặc điểm hình thái, thành phần hoá học và hoạt tính kháng vi sinh vật của cây Ngũ sắc (<i>Ageratum conyzoides</i> L. Asteraceae). Mẫu được liệu thu thập tại Bình Dương vào tháng 06/2018 để phân tích các đặc điểm hình thái, vi phẫu, bột của thân, rễ, lá cây Ngũ sắc. Sơ bộ phân tích thành phần hoá học của cao lá Ngũ sắc chiết bằng ethanol theo phương pháp Ciuley. Sử dụng các dung môi n-hexan, CHCl₃, ethyl acetat và methanol để chiết xuất phân đoạn bằng kỹ thuật lắc phân bố. Đánh giá hiệu quả kháng vi sinh vật bằng phương pháp khuếch tán đĩa và pha loãng trong môi trường thạch. Kết quả cho thấy mẫu thân, rễ, lá đã thể hiện được các đặc điểm hình thái, cấu tạo vi phẫu đặc trưng của loài <i>A. conyzoides</i>. Thành phần hoá học có trong cao chiết bằng ethanol từ lá Ngũ sắc gồm flavonoid, alkaloid, polyphenol, tannin, coumarin, saponin, chất khử và tinh dầu. Các phân đoạn có hoạt tính tốt nhất từ cao chiết bằng ethyl acetat có tác dụng kháng <i>S. aureus</i>, MRSA, <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i> với giá trị MIC tương ứng 125, 125, 500, 500 µg/mL; cao chiết bằng chloroform có tác dụng kháng <i>T. rubrum</i>, <i>M. gypseum</i>, <i>T. mentagrophytes</i> với giá trị MIC tương ứng 250, 250, 500 µg/mL. Các kết quả này tạo tiền đề để phân lập, xác định cấu trúc hoá học các chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm từ các cao chiết tiềm năng.
TỪ KHÓA Ngũ sắc Đặc điểm hình thái Thành phần hoá học MIC Kháng vi sinh vật	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7159>

* Corresponding author. Email: ntbttuyet@ntt.edu.vn

1. Giới thiệu

Nhiễm trùng là một vấn nạn toàn cầu đã được cảnh báo trong những năm gần đây. Theo WHO, năm 2009, tỉ lệ nhiễm trùng ở các nước phát triển chiếm 5 – 15% tổng số bệnh nhân nhập viện [1], đặc biệt ở Việt Nam tỉ lệ này cao gấp 20 lần [1]. Xuất phát từ thực trạng trên, nhiều thuốc kháng sinh mới ra đời, bao gồm cả các thuốc hoá dược và dược liệu. Tuy nhiên, các thuốc hóa dược thường có độc tính cao, nhiều tác dụng phụ và đặc biệt nếu lạm dụng sẽ dẫn đến tình trạng đề kháng thuốc. Theo báo cáo của Bệnh viện Chợ Rẫy ở giai đoạn 2009-2010, tỉ lệ đề kháng cephalosporin thế hệ 3,4 và quinolone đã lên tới 70% trên 5 chủng vi khuẩn *E. coli*, *A. baumannii*, *Klebsiella spp.*, *S. aureus* và *P. aeruginosa* [2]. Thuốc kháng nấm như fluconazol, itraconazol còn nhạy cảm cao nhưng cần phải sử dụng lâu dài nên khó tránh khỏi các tác dụng không mong muốn [3]. Do đó, việc sử dụng các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu đang ngày càng được chú trọng và đẩy mạnh phát triển.

Ngũ sắc hay còn gọi là Cứt lợn (*Ageratum conyzoides* Linn.) là một dược liệu tiềm năng, được sử dụng rộng rãi trong điều trị viêm xoang, viêm đường hô hấp [4], [5]. Năm 2002, nghiên cứu của Okanade chứng minh tinh dầu của Ngũ sắc kháng được 20 loài vi khuẩn và 12 loài vi nấm khác nhau, đặc biệt kháng *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Candida spp* [6]. Năm 2012, theo nghiên cứu của A. Adetutu, dịch chiết bằng ethyl acetat từ lá Ngũ sắc có hiệu quả kháng khuẩn trung bình [7]. Theo một nghiên cứu ở Mexico (2017) trên chủng *T. mentagrophytes* và *M. gypseum* cho thấy dịch chiết lá Ngũ sắc có tác dụng ức chế vi nấm với MIC 25 – 50 µg/mL [8]. Hiện nay, tại Việt Nam, nghiên cứu về Ngũ sắc vẫn còn hạn chế. Năm 1989, Nguyễn Văn Đàn và cộng sự đã công bố một số thành phần hoá học có trong cây Ngũ sắc [9]. Năm 2018, Nguyễn Thị Kim Liên đã phân lập được 4 chất flavonoid có trong cây Ngũ sắc [10]. Từ các tài liệu khoa học đã công bố, nhằm cung cấp thêm các dữ liệu khoa học về loài dược liệu này, nghiên cứu thực hiện khảo sát các đặc điểm hình thái, thành phần hoá học và hoạt tính kháng vi sinh vật của cây Ngũ sắc.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng thử nghiệm

2.1.1. Dược liệu

Cây Ngũ sắc được thu hái tại phường Phú Mỹ, thành phố Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương vào tháng 06/2018.

2.1.2. Vi sinh vật thử nghiệm

Vi khuẩn: *S. aureus* ATCC 29213; *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) ATCC 43300; *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 35218; *P. aeruginosa* ATCC 27853 được cung cấp bởi đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford, bộ môn Vi sinh – Ký sinh trùng, khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

Vi nấm: *Candida albicans* ATCC10231; *Candida tropicalis* PK12C; *Candida glabra* PK12B; *Trichophyton mentagrophytes* ND02; *Trichophyton mentagrophytes* ND25; *Trichophyton mentagrophytes* ND27A; *Trichophyton rubrum* ND14; *Microsporum gypseum* ND09 được cung cấp bởi bộ môn Vi sinh – Ký sinh trùng, khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành và Bệnh viện da liễu Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu về đặc điểm hình thái và sơ bộ thành phần hoá học

Hình thái: Quan sát, mô tả các đặc điểm thực vật như dạng sống, thân, lá, hoa, quả [11].

Đặc điểm vi phẫu: Mẫu tươi sau khi thu hái được rửa sạch, cắt, nhuộm và làm tiêu bản vi phẫu thân, rễ, lá theo phương pháp nhuộm kép bằng đỏ carmin – lục iod. Quan sát, mô tả cấu trúc vi phẫu đã nhuộm dưới kính hiển vi [12].

Đặc điểm bột dược liệu: Thân, rễ, lá của cây được cắt nhỏ và sấy ở nhiệt độ 60 – 70°C đến khô, nghiền và rây qua rây số 32. Quan sát các thành phần của bột dưới kính hiển vi, chụp ảnh và mô tả các cấu tử [12]. Đối với bột lá, nghiên cứu tiến hành phân tích sơ bộ thành phần hoá thực vật theo quy trình phân tích của Ciuley cải tiến [12].

2.2.2. Chiết xuất cao toàn phần và các cao phân đoạn từ lá Ngũ sắc

Sử dụng lượng mẫu thử là 2 g bột lá Ngũ sắc, sấy ở 105°C trong 2 giờ để xác định độ ẩm của bột lá [13]

$$\text{Độ ẩm (W)} = (\text{khối lượng đầu} - \text{khối lượng sau}) / (\text{khối lượng đầu}) \times 100\% \quad (1)$$

Chiết xuất cao toàn phần: Tiến hành làm sạch, phơi 5 kg dược liệu ở 30 - 40°C trong 3 - 4 ngày. Dược liệu sau khi phơi khô được xay nhỏ thành bột mịn đồng nhất thu được 500 g, làm ẩm với 500 mL dung môi. Tiếp tục thêm khoảng 5 lít cồn EtOH 96%, ngâm trong 24 giờ. Lọc, thu lấy dịch chiết, tiếp tục chiết lạnh bã dược liệu còn lại với lần lượt 3,8 lít và 2,5 lít dung môi. Gộp các dịch chiết và cô trên bếp cách thủy ở 40°C thu được cao toàn phần [13]. Hiệu suất chiết xuất cao toàn phần tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất (H)} = (\text{khối lượng cao}) / [\text{khối lượng dược liệu đã dùng} \times (100 - W)\%] \times 100\% \quad (2)$$

Từ cao toàn phần, tiến hành phân tán vào ethanol 10% với tỉ lệ 1:10, rồi lắc phân bố lần lượt với dung môi phân cực tăng dần (n-hexan, chloroform, ethyl acetat, methanol). Sau khi loại bỏ dung môi thu được các cao phân đoạn tương ứng [12].

2.2.3. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật bằng phương pháp khuếch tán đĩa

Mục tiêu: Đánh giá vùng ức chế của các phân đoạn trên các vi sinh vật thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán đĩa [14].

Mẫu thử: Các cao phân đoạn được hoà tan vào dung môi tương ứng để đạt nồng độ 0,1 g/mL.

Vi sinh vật thử nghiệm: Vi khuẩn được phân lập trên môi trường MHA, ủ 37°C/24 giờ. Lấy 3 - 5 khuẩn lạc riêng rẽ phân tán trong dung dịch NaCl 0,85% sao cho mật độ vi khuẩn đạt khoảng $1 - 2 \times 10^8$ CFU/mL ($OD_{600\text{ nm}}$ từ 0,08 - 0,12). Nấm men *C. albicans* được phân lập trong môi trường SDA, ủ 37°C/48 giờ. Lấy 3 - 5 khóm nấm phân tán trong dung dịch NaCl 0,85% bổ sung 0,05% Tween 80 sao cho mật độ vi nấm khoảng 10^6 CFU/mL ($OD_{530\text{ nm}}$ từ 0,08 - 0,12). Nấm da được hoạt hoá trên thạch nghiêng SDA trong 5 - 7 ngày ở nhiệt độ phòng. Dùng pipet pasteur cho nước muối sinh lý vào ngập khóm nấm, cạo nhẹ bề mặt nấm để lấy bào tử, cho huyền dịch nấm vào ống nghiệm vô trùng, lắc xoáy dịch nấm 20 - 30 giây, để lắng 3 - 5 phút, bỏ cặn, lấy dịch nấm đem đo. Điều chỉnh sao cho mật độ nấm khoảng $1 - 5 \times 10^6$ CFU/mL ($OD_{600\text{ nm}}$ từ 0,08 - 0,12) [15].

Tiến hành: Dùng que bông vô trùng trải đều huyền dịch vi sinh vật lên bề mặt môi trường thử nghiệm. Đặt đĩa giấy vô trùng đã tẩm 20 μ L mẫu thử ở nồng độ 0,1 g/mL. Ủ các đĩa thạch ở 37°C trong 24 giờ đối với vi khuẩn và 48 giờ đối với *Candida spp* và ở nhiệt độ phòng trong 5 - 7 ngày đối với nấm da. Ghi nhận đường kính vùng ức chế và lặp lại thí nghiệm 3 lần lấy giá trị trung bình.

2.2.4. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu vi sinh vật bằng phương pháp pha loãng trong thạch

Vi sinh vật thử nghiệm được chuẩn bị như mục 2.2.3. Cao tiềm năng được pha loãng liên tục $\frac{1}{2}$ lần trong DMSO 1% với nồng độ cao nhất là 1 mg/mL. Cây dịch vi khuẩn hoặc dịch vi nấm trên bề mặt thạch sao cho nồng độ vi sinh vật ở mỗi vết chấm là 10^4 CFU/mL. Ủ ở 37°C trong 24 giờ đối với vi khuẩn, trong 5 - 7 ngày ở nhiệt độ phòng đối với nấm da, sau đó đọc kết quả. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy giá trị MIC trung bình [16].

3. Kết quả và bàn luận

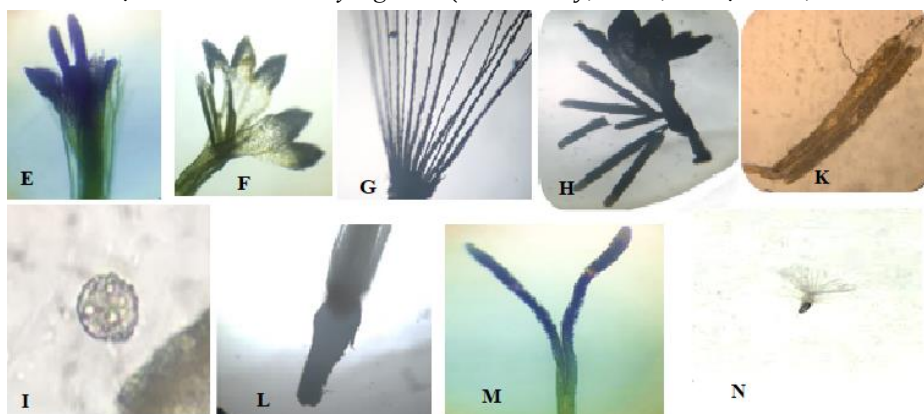
3.1. Đặc điểm thực vật học của mẫu nghiên cứu

Đặc điểm hình thái: Mẫu có thân cỏ màu xanh non, cao 20 - 70 cm, phủ lông mềm. Lá hình tam giác - bầu dục, dài 2 - 10 cm, rộng 1 - 5 cm, phiến lá viền răng cưa, đỉnh lá hẹp lại thành mũi

nhọn. Lá mọc đối, có 3 gân tỏa ra từ gốc lá, phủ lông mỏng màu trắng nhạt ở 2 mặt lá, mặt dưới nhạt hơn. Cụm hoa: dạng đầu, hợp lại thành ngù, cuống cụm hoa phủ lông dày, mềm; trong mỗi cụm hoa có 60 - 75 hoa nhỏ, đều là hoa lưỡng tính màu tím nhạt. Tổng bao gồm 2 hàng lá bắc; lá bắc hình bầu dục, đỉnh nhọn dần, mặt ngoài có lông và tuyến gần bằng nhau, dài 3 mm, màu xanh như lá. Ống tràng ngắn, dài 2 mm, loe ra ở đỉnh, có 5 thùy hình tam giác, phủ lông tơ. Bộ nhị: 5 nhị với chỉ nhị màu nâu, bao phần hình bầu dục thuôn dài nứt dọc có phần phụ, không có tai ở gốc, hạt phần hình tròn có gai. Bộ nhụy: Bầu dưới, thùy vòi nhụy dạng sợi, có lông tơ dày, đầu nhụy màu tím, vươn ra ngoài ống tràng. Quả bế, dài 1,5 - 2 mm, vỏ có gờ dọc và phủ lông tơ; mào lông trên đỉnh quả là 5 vảy có răng ở viền và dài hơn ống tràng (Hình 1, Hình 2). Qua khảo sát hình thái bên ngoài của mẫu cây thu được, đối chiếu với các tác giả khác như Đỗ Huy Bích [4], Lê Kim Biên [17], loài Ngũ sắc nghiên cứu có tên khoa học là *Ageratum conyzoides* (Linn.), họ Cúc (Asteraceae).



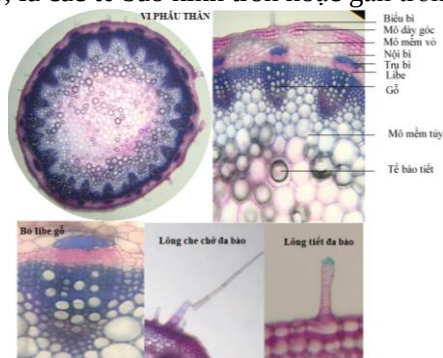
Hình 1. Đặc điểm hình thái cây Ngũ sắc (A. Toàn cây; B. Lá; C. Cụm hoa; D. Lá bắc)



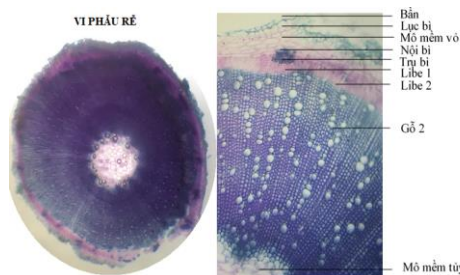
Hình 2. Đặc điểm cơ quan sinh sản cây Ngũ sắc (E. Hoa; F. Tràng hoa; G. Đài hoa; H. Nhị; K. Bao phấn và phần phụ; I. Hạt phấn; L. Bầu nhụy; M. Đầu nhụy; N. Quả).

Đặc điểm vi phẫu: Vi phẫu thân hình gần tròn. Vùng vỏ gồm biểu bì 1 lớp tế bào hình chữ nhật, không đều, lớp cutin mỏng. Trên biểu bì có nhiều lông che chở đa bào, lông tiết đa bào. Lông che chở đa bào phía trên một dãy 5 - 8 tế bào dài, gần gốc có nhiều tế bào nhỏ và ngắn hơn. Lông tiết đa bào có chân dài hoặc ngắn, đầu hình trứng thuôn cầu tạo bởi nhiều hàng tế bào có lớp cutin. Bên dưới lớp biểu bì là mô dày góc, gồm 3 - 4 lớp tế bào tròn hoặc đa giác gần tròn, kích thước lớn hơn hoặc bằng tế bào biểu bì, không đều. Mô mềm vỏ khuyết khoảng 2 - 4 lớp tế bào hình đa giác, vách mỏng. Tế bào tiết tinh dầu rải rác trong mô dày, mô mềm vỏ, nội bì, mô mềm tủy. Nội bì khung Caspary. Vùng trung trụ gồm trụ bì hóa sợi mô cứng thành từng cụm không đều trên libe 1. Libe 1 tế bào đa giác, kích thước nhỏ, không đều, xếp lộn xộn. Tượng tầng tạo libe 2 và gỗ 2 ở giữa của bó dẫn cấp 1, libe 2 ít hơn gỗ 2, xếp thành nhiều bó. Libe 2 tế bào hình chữ nhật vách uốn lượn xếp xuyên tâm. Mạch gỗ 2 hình đa giác, kích thước to nhỏ không đều, mô mềm gỗ 2 hình đa giác hoặc chữ nhật, kích thước nhỏ, vách dày hóa gỗ. Gỗ 1 tập trung thành nhiều cụm, mạch gỗ hình tròn hoặc đa giác gần tròn, mô mềm quanh gỗ 1 gồm nhiều lớp tế bào hình đa giác vách cellulose. Mô cứng nhiều lớp tế bào đa giác bao quanh gỗ 1. Tia tủy gồm nhiều dãy tế bào hình chữ nhật dài. Mô mềm tủy đạo chiếm một vùng rộng, là các tế bào hình tròn, không đều, vách hóa gỗ mỏng, bên trong chứa nhiều túi tiết tinh dầu (Hình 3).

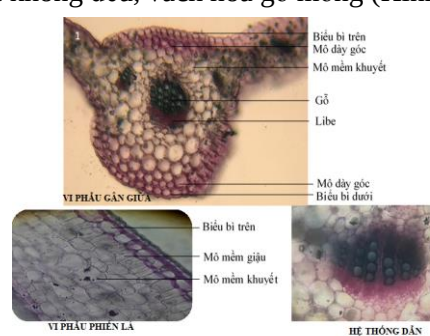
Vi phẫu rễ hình tròn. Các mô gồm 1 – 2 lớp bản tế bào hình chữ nhật, xếp xuyên tâm, thường bong tróc và có nhiều lỗ vỏ. Lục bì 2 – 3 lớp tế bào hình chữ nhật, xếp xuyên tâm với bản. Mô mềm vỏ khuyết tế bào hình bầu dục nằm ngang, vách mỏng. Nội bì khung Caspary. Trụ bì hóa sợi mô cứng thành từng cụm không đều trên chùy libe. Mỗi chùy libe gồm có libe 1 ngay dưới cụm sợi trụ bì, tế bào hình đa giác nhỏ, vách uốn lượn; libe 2 gồm 3 – 4 lớp tế bào hình chữ nhật vách uốn lượn xếp xuyên tâm. Gỗ 2, mạch gỗ hình đa giác, tròn hay bầu dục kích thước to nhỏ không đều, mô mềm gỗ hóa mô cứng. Gỗ 1 khó phân biệt. Mô mềm tủy đạo chiếm một vùng rất nhỏ, là các tế bào hình tròn hoặc gần tròn, kích thước không đều, vách hóa gỗ mỏng (Hình 4).



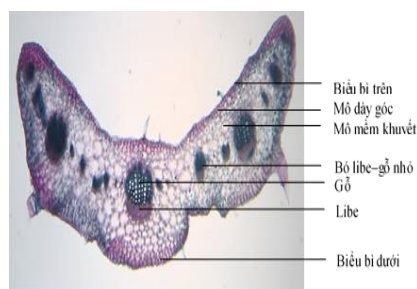
Hình 3. Một số đặc điểm vi phẫu thân Ngũ sắc



Hình 4. Một số đặc điểm vi phẫu rễ Ngũ sắc



Hình 5. Một số đặc điểm vi phẫu lá Ngũ sắc



Hình 6. Vi phẫu cuống lá

Vi phẫu lá (Hình 5): Gân giữa có mặt trên hơi bằng ở đỉnh, mặt dưới phình tròn thắt ở hai bên phiến lá, đôi khi có gờ lồi phụ. Biểu bì gồm các tế bào hình tròn hay chữ nhật, không đều, lớp cutin mỏng. Trên biểu bì có lông che chở và lông tiết đa bào. Ở giữa biểu bì trên và dưới có mô dày gồm 2 – 3 lớp tế bào hình đa giác, không đều. Mô mềm khuyết là các tế bào hình tròn hoặc bầu dục, không đều. Hệ thống dẫn gồm 1 bó dẫn lớn và 2 bó dẫn nhỏ 2 bên. Mỗi bó gồm gỗ ở trên, libe ở dưới. Mạch gỗ là các tế bào hình tròn hay đa giác xếp thành 5 – 6 dãy, libe gồm 5 – 8 lớp tế bào hình đa giác, kích thước nhỏ, xếp lộn xộn, xung quanh bó dẫn là 1 – 2 lớp tế bào mô mềm hình đa giác hoặc bầu dục, kích thước nhỏ. Tế bào tiết, lục lạp rải rác trong mô mềm. Phiến lá có biểu bì trên hình bầu dục kích thước không đều; biểu bì dưới tế bào nhỏ hơn. Biểu bì trên và dưới đều có lỗ khí. Mô mềm giậu 1-2 lớp tế bào hình chữ nhật xếp xít nhau. Mô mềm khuyết tế bào hình tròn, đa giác hoặc bầu dục, không đều. Bó gân phụ rải rác với gỗ ở trên, libe ở dưới. Tế bào tiết, lục lạp rải rác quanh phiến. Cuống lá (Hình 6) có mặt trên lõm, mặt dưới có 3 gân lồi. Biểu bì tế bào hình tròn hoặc hình chữ nhật, kích thước không đều, lớp cutin mỏng. Trên biểu bì có lông che chở và lông tiết đa bào. Giữa 2 biểu bì có mô dày góc với 2 – 9 lớp tế bào hình đa giác, kích thước không đều, nhiều ở các gân lồi và mép cuống lá. Mô mềm khuyết tế bào hình tròn, đa giác hoặc bầu dục với kích thước không đều. Có 3 bó libe gỗ lớn, 3 bó libe gỗ nhỏ và nhiều bó libe gỗ rất nhỏ. Lục lạp nằm rải rác quanh mép và các gân lồi của cuống.

Đặc điểm bột dược liệu: Bột thân (Hình 7.a): mịn, màu lục nhạt, có mùi thơm, không vị, xuất hiện các cấu tử bao gồm mảnh biểu bì, mảnh mô mềm, sợi cứng, lông che chở đa bào, mảnh mạch điểm, mảnh mạch xoắn, mảnh mạch vạch, tinh bột.

Bột lá (Hình 7.b): mịn, màu lục hơi sẫm, có mùi thơm, vị đắng nhẹ. Các cấu tử trong bột lá gồm mảnh biểu bì mang lỗ khí, mảnh mô mềm, tinh thể calci oxalate hình cầu gai, lông che chở đa bào, mảnh mạch điểm, mảnh mạch xoắn, mảnh mạch vạch.

Bột rễ (Hình 7.c): mịn, màu xám, không mùi, không vị. Các cấu tử trong bột rễ gồm mảnh bần, mảnh mô mềm, sợi cứng, lông che chở đa bào, lông hút, mảnh mạch điểm, mảnh mạch xoắn, mảnh mạch vạch.

Các đặc điểm soi bột ghi nhận được trong nghiên cứu giúp bổ sung cơ sở dữ liệu khoa học cho dược liệu này.



(a) Một số đặc điểm bột thân

(b) Một số đặc điểm bột lá

(c) Một số đặc điểm bột rễ

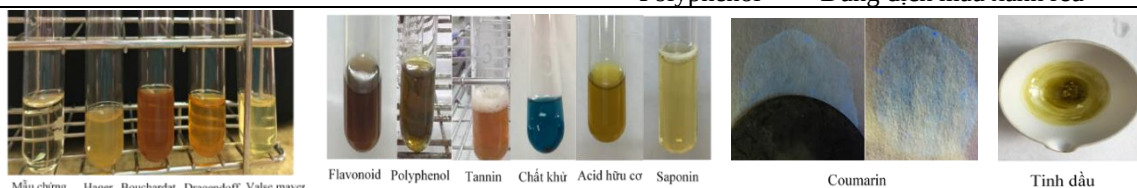
Hình 7. Các đặc điểm của bột dược liệu Ngũ sắc

3.2. Khảo sát sơ bộ thành phần hoá học

Phân tích sơ bộ thành phần hoá học có trong cao toàn phần cho thấy bột lá Ngũ sắc chứa tinh dầu, alkaloid, flavonoid, polyphenol, tannin, saponin, chất khử (Bảng 1, Hình 8).

Bảng 1. Sơ bộ thành phần hoá học trong cao toàn phần theo quy trình Ciuley

Nhóm hợp chất	Hiện tượng	Kết quả	Nhóm hợp chất	Hiện tượng	Kết quả
Tinh dầu	Có mùi thơm	+	Tannin	Tủa bông trắng	+
Alkaloid	Kết tủa	+	Saponin	Bọt bền 15 phút	+
Coumarin	Không tăng cường độ phát quang	–	Chất khử	Tủa đỏ gạch	+
Flavonoid	Dung dịch màu đỏ cam	+	Acid hữu cơ	Không có sủi bọt khí	–
			Polyphenol	Dung dịch màu xanh rêu	+

**Hình 8.** Kết quả khảo sát thành phần hóa học theo quy trình Ciuley

3.3. Chiết xuất cao toàn phần và các cao phân đoạn

Từ 5 kg lá tươi, tiến hành phơi, sấy khô và rây mịn được liệu thu được 500 g bột lá với độ ẩm trung bình 9,51%, nằm trong mức cho phép theo Dược điển Việt Nam IV [12]. Sau đó, tiến hành ngâm lạnh 500 g bột lá với dung môi ethanol 96% thu được 95,67 g cao toàn phần với hiệu suất chiết là 21,14%. Sau đó, sử dụng cao toàn phần để lacc phân bố với các dung môi khác nhau thu được 4 cao phân đoạn với khối lượng tương ứng cao n-hexan (28,35 g); cao chloroform (5,74 g); cao ethyl acetat (5,28 g) và cao methanol (25,32 g). Nghiên cứu sử dụng cao toàn phần và 4 cao phân đoạn để đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật.

3.4. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật bằng phương pháp khuếch tán

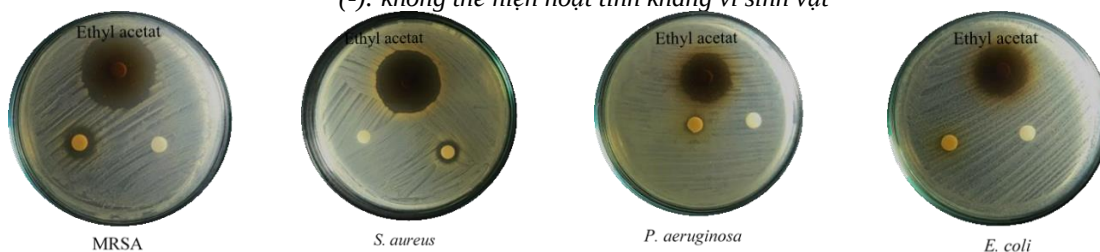
Đường kính vùng ức chế của các cao thử ở nồng độ 0,1 g/mL được thể hiện ở bảng 3. Dựa vào bảng 3 cho thấy mẫu chứng âm không cho vùng ức chế. Điều này cho thấy kết quả thử nghiệm không bị ảnh hưởng bởi dung môi.

Đối với vi khuẩn: Cao n-Hex không cho vùng ức chế ở tất cả vi khuẩn thử nghiệm. Điều này chứng tỏ cao n-Hex không có hoạt tính kháng khuẩn. Cao MeOH chỉ cho vùng ức chế với vi khuẩn Gram dương với d_{MRSA} 12,50 mm và $d_{S. aureus}$ 13,33 mm, không ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram âm. Cao TP, cao $CHCl_3$ và cao EtOAc đều có khả năng ức chế sự phát triển của đa số vi khuẩn thử nghiệm. Đặc biệt, cao EtOAc cho vùng ức chế vi khuẩn mạnh nhất với đường kính vùng ức chế lần lượt là *MRSA* 28,5 mm; *S. aureus* 29,67 mm, *P. aeruginosa* 20,50 mm; *E. coli* 20,33 mm (Hình 9). Tác dụng kháng khuẩn tốt hơn so với nghiên cứu của Adetutu A. và cộng sự trong sử dụng dịch chiết EtOAc của lá Ngũ sắc với đường kính vòng kháng *E. coli* là 12 mm, *S. aureus* là 16 mm, *MRSA* là 17 mm và không có tác dụng ức chế trên *P. aeruginosa* [7].

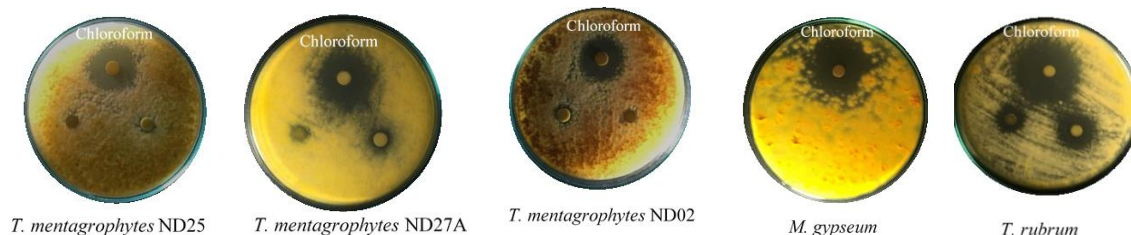
Bảng 3. Đường kính vùng ức chế (mm) của các mẫu thử nghiệm trên các chủng thử nghiệm

	Đường kính vòng ức chế vi khuẩn (mm) (Mean $\pm$ SD)					
	TP	n-Hex	$CHCl_3$	EtOAc	MeOH	Chứng âm
<i>MRSA</i>	12,50 $\pm$ 0,87	–	11,17 $\pm$ 0,58	28,50 $\pm$ 0,50	12,50 $\pm$ 0,50	–
<i>S. aureus</i>	14,83 $\pm$ 0,58	–	10,83 $\pm$ 0,58	29,67 $\pm$ 0,29	13,33 $\pm$ 0,29	–
<i>P.aeruginosa</i>	7,67 $\pm$ 0,29	–	7,83 $\pm$ 0,76	20,50 $\pm$ 0,50	–	–
<i>E. coli</i>	–	–	–	20,33 $\pm$ 0,29	–	–
<i>T. men</i> 02	7,67 $\pm$ 0,58	–	20,33 $\pm$ 0,29	10,50 $\pm$ 0,5	–	–
<i>T. men</i> 25	–	–	23,17 $\pm$ 0,29	12,83 $\pm$ 0,29	–	–
<i>T.men</i> 27A	–	10,33 $\pm$ 0,58	20,17 $\pm$ 0,58	11,83 $\pm$ 0,76	–	–
<i>T.rub</i>	7,50 $\pm$ 0	–	24,67 $\pm$ 0,29	10,67 $\pm$ 0,29	–	–
<i>M.gyp</i>	–	–	24,83 $\pm$ 0,58	–	–	–
<i>C. albi</i>	–	–	–	–	–	–
<i>C. tropi</i>	–	–	–	–	–	–
<i>C. gla</i>	–	–	–	–	–	–

Chú thích: *T. men* 02: *T. mentagrophytes* ND02; *T. men* 25: *T. mentagrophytes* ND25; *T. men* 27A: *T. mentagrophytes* ND27A; *T. rub*: *T. rubrum*; *M. gyp*: *M. gypseum*; *C. alb*: *C. albicans*; *C. tro*: *C. tropicalis*.
(-): không thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật



Hình 9. Đường kính vùng ức chế (mm) của cao EA trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm



Hình 10. Đường kính vùng ức chế (mm) của cao $CHCl_3$ trên các chủng vi nấm thử nghiệm

Đối với vi nấm: Tất cả các cao không thể hiện hoạt tính kháng nấm men *C. albicans*. Với nấm da, cao MeOH không có hoạt tính kháng các vi nấm thử nghiệm. Cao n-Hex thể hiện hoạt tính kháng nấm da yếu, chỉ cho vùng ức chế trên chủng *T. men* 27A với đường kính 10,33 mm. Cao TP cũng cho hoạt tính kháng nấm da yếu, chỉ tác động trên 2 chủng vi nấm thử nghiệm *T. men* 02 và *T. rub*. Cao EtOAc thể hiện hoạt tính kháng nấm da *Trichophyton* spp. ở mức trung bình. Đặc

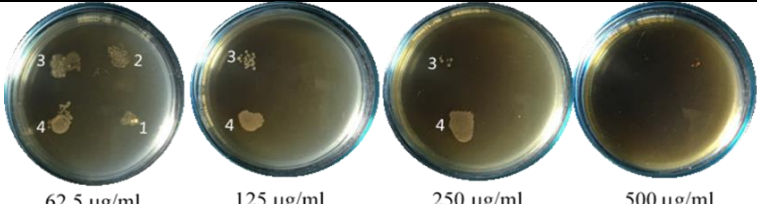
biệt, cao CHCl_3 cho vòng ức chế trên cả 5 chủng vi nấm thử nghiệm, kể cả nấm *M. gypseum* (Hình 10).

3.5. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Cao EtAOc và cao CHCl_3 có tác động kháng tốt nhất lần lượt trên vi khuẩn và vi nấm thử nghiệm, do đó nghiên cứu tiến hành xác định nồng độ tối thiểu ức chế phát triển vi sinh vật (MIC). Giá trị MIC của cao EtAOc và cao CHCl_3 được thể hiện lần lượt ở bảng 4, bảng 5, Hình 11, Hình 12.

Bảng 4. MIC của EtAOc trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm ($\mu\text{g/mL}$)

	MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
EtOAc	125 ± 0	125 ± 0	500 ± 0	500 ± 0



Hình 11. MIC của cao EtAOc trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm (1. MRSA; 2. *S. aureus*; 3. *P. aeruginosa*; 4. *E. coli*)

Bảng 5. MIC của cao CHCl_3 trên các chủng vi nấm thử nghiệm ($\mu\text{g/mL}$)

	<i>T. rub</i>	<i>M. gyp</i>	<i>T.men 02</i>	<i>T. men 25</i>	<i>T.men 27A</i>
Cao CHCl_3	250 ± 0	250 ± 0	500 ± 0	500 ± 0	500 ± 0



Hình 12. MIC của cao CHCl_3 trên các chủng vi nấm thử nghiệm (1. *T. rubrum*; 2. *M. gypseum*; 3. *T. mentagrophytes* ND02; 4. *T. mentagrophytes* ND25; 5. *T. mentagrophytes* ND27A)

MIC trên vi khuẩn *S. aureus* và MRSA của cao EtAOc là $125 \mu\text{g/mL}$, trên vi khuẩn *P. aeruginosa* và *E. coli* là $500 \mu\text{g/mL}$. Tác dụng kháng khuẩn kém hơn so với nghiên cứu của Horváth và cộng sự với giá trị MIC $50 \mu\text{g/mL}$ của dịch chiết EtOAc của lá Ngũ sắc trên chủng MRSA [18]. Tuy nhiên, kết quả này lại tốt hơn so với một nghiên cứu ở Ấn Độ của Mitra trên cả 4 chủng *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa* và *E. coli* với giá trị MIC 8 – 16 mg/mL [19]. Sự khác nhau này có thể do sự thay đổi địa điểm, hàm lượng hoạt chất theo mùa thu hái và sự khác nhau về chủng thử nghiệm. Cao chloroform có tác dụng ức chế vi nấm *T. rubrum* ở nồng độ $250 \mu\text{g/mL}$, các chủng *T. mentagrophytes* và *M. gypseum* ở nồng độ $500 \mu\text{g/mL}$. Mẫu thử nghiệm có hoạt tính kém hơn so với nghiên cứu ở Mexico trên các chủng *T. mentagrophytes* và *M. gypseum* với giá trị MIC 25 – $50 \mu\text{g/mL}$ [8]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng tôi ưu thế hơn nghiên cứu ở Tây Phi của Baldé A. M. và cộng sự với kết quả dịch chiết chloroform không có tác dụng ức chế trên chủng *T. rubrum* ở nồng độ $\leq 1 \text{ mg/mL}$ [20]. Kết quả thử nghiệm ban đầu về các chất có hoạt tính được học của loài Ngũ sắc thu hái ở tỉnh Bình Dương chỉ ở dạng cao nhưng vẫn cho kết quả kháng khuẩn, kháng nấm khá tốt, do đó nếu tiến hành thu được hợp chất tinh khiết, kết quả thí nghiệm được học có thể tương đương hoặc tốt hơn.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được các đặc điểm thực vật học của cây Ngũ sắc và thành phần hoá thực vật trong lá Ngũ sắc bao gồm flavonoid, alkaloid, polyphenol, tannin, coumarin, saponin, chất khử và tinh dầu. Các phân đoạn tách chất thu được có hoạt tính tốt nhất là cao ethyl acetat có tác dụng kháng *S. aureus*, MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa* với giá trị MIC tương ứng 125, 125, 500, 500 µg/mL; cao chloroform có tác dụng kháng *T. rubrum*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* với giá trị MIC tương ứng 250, 250, 500 µg/mL. Các kết quả này tạo tiền đề ban đầu để phân lập, xác định cấu trúc hoá học của các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cao ethyl acetat và kháng nấm từ cao chloroform.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. Pittet, "Review of scientific data related to hand hygiene" in *WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care*, vol.7, World Health Organization, ed. Geneva 2009, pp. 6-8.
- [2] N. T. T. Tran, "The infection and characteristics of antimicrobial resistance at Cho Ray Hospital in 2009 – 2010," (in vietnamese), *Medical Journal of Ho Chi Minh City*, vol. 15, no. 4, pp. 545-549, 2011.
- [3] R. Baran *et al.*, "Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 19, no. 1, pp. 21-29, 2005.
- [4] B. H. Do *et al.*, *Medicinal plants and medicinal animals in Vietnam* (in vietnamese), vol. 1, Hanoi Science and Technology Publishing House, pp. 375-377, 2006.
- [5] D. V. Nguyen and N. G. Pham, "Preparation of spray solution for sinusitis from *Ageratum conyzoides* collected in Quang Binh province," (in vietnamese), *Science and Technology Information Magazine of Quang Binh Province*, no. 1, pp. 26-18, 2017.
- [6] A. L. Okunade, "*Ageratum conyzoides* L. Asteraceae," *Fitoterapia*, vol. 73, no. 1, pp. 1-16, 2002.
- [7] A. Adetutu *et al.*, "Antibacterial activity and *in vitro* cytotoxicity of extracts and fractions of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. stem bark and *Ageratum conyzoides* Linn. leaves," *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 34, no. 2, pp. 478-483, 2012.
- [8] A. Parsaeimehr *et al.*, *Medicinal Plants Versus Skin Disorders: A Survey From Ancient to Modern Herbalism*. Academic Press, pp. 205-221, 2017.
- [9] X. D. Nguyen, T. T. T. Pham, V. D. Nguyen *et al.*, "Contribution to the study of the plant of *Ageratum conyzoides* L (in Vietnamese)," *Journal Essential Oil Research*, no. 1, p.135, 1989.
- [10] T. K. L. Nguyen, "Flavonoid in goat weed (*Ageratum conyzoides* L. Asteraceae)," (in vietnamese), *Journal of Science and Technology Nguyen Tat Thanh University*, no. 2, pp. 60-65, 2018.
- [11] Department of Botanical Medicine, *Practical course on medicinal plants*. Ho Chi Minh University of Medicine and Pharmacy (in vietnamese), pp. 5-15, 2015.
- [12] H. Tran *et al.*, *Methods of medicinal plant research*. Ho Chi Minh University of Medicine and Pharmacy (in vietnamese), pp. 2-126, 2015.
- [13] Ministry of Health, *Vietnamese pharmacopoeia V*, vol. 2, Hanoi Medical Publishing House (in vietnamese), pp. PL278-280, 2017.
- [14] CLSI, *Method for Antifungal disk diffusion susceptibility Testing of Yeasts*, Approved Guideline, 2004.
- [15] F. Hadacek and H. Greger, "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice," *Phytochemical analysis*, vol. 11, no. 3, pp. 137-147, 2000.
- [16] P. A. Wayne, "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests" in *CLSI standard M02*, vol. 38, Clinical and laboratory standards institute, Ed., 13th ed. New York, 2018, pp. 01-71.
- [17] B. K. Le, *Vietnamese botanicals*. Ha Noi Science and Technology Publishing House (in vietnamese), pp. 106 – 109, 2007.
- [18] G. Horváth *et al.*, "Natural substances from higher plants as potential anti-MRSA agents," in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 47, Atta-Ur Rahman Ed., 1st ed. Asmterdam: Elsevier, 2016, pp. 63-110.
- [19] P. K. Mitra, "Antibacterial activity of an isolated Compound (AC-1) from the Leaves of *Ageratum conyzoides* Linn," *Journal of Medicinal Plants*, vol. 1, no. 3, pp. 145-150, 2013.
- [20] A. M. Baldé *et al.*, "Ethnobotanical survey, antimicrobial and anticomplement activities of Guinean medicinal plants traditionally used in the treatment of inflammatory diseases in Conakry and Dubreka," *Journal of plant sciences*, vol. 3, no. 1-2, pp. 11-19, 2015.