

NGHIÊN CỨU CẤU TẠO GIẢI PHẪU VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ THÂN RỄ CÂY SÂM ĐÁ KBANG (*Curcuma singularis* Gagnep.)

HỒ THIÊN HOÀNG², VÕ PHÁT THỊNH¹, LÊ THỊ THU TRANG^{1*}

¹ Khoa dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

² Viện Công nghệ Sinh học và Thực Phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: ltttrang@ntt.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstih.v59i05.4592>

Tóm tắt. Nghiên cứu này tiến hành mô tả đặc điểm về cấu tạo giải phẫu của các bộ phận (rễ, thân rễ, bẹ lá, phiến lá) của cây Sâm đá Kbang (*Curcuma singularis* Gagnep.), một loài mới được ghi nhận ở Việt Nam năm 2016. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ thân rễ cây Sâm đá Kbang được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC). Hình ảnh cấu tạo giải phẫu Sâm đá kbang cho thấy cấu trúc đặc trưng của thân rễ với nhiều bó vết lá nằm rải rác trong vùng vỏ; mô mềm ở rễ và thân rễ có nhiều tế bào chứa chất tiết màu vàng; bẹ lá và phiến lá với nhiều bó dẫn xếp thành hàng, biểu bì ở phiến lá có nhiều lông che chở đa bào. Cao chiết ethanol từ thân rễ cây Sâm đá Kbang thể hiện hoạt lực kháng mạnh với một số chủng khuẩn kiểm định như MRSA, MSSA; kháng trung bình với chủng *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli*.

Từ khóa. Sâm đá Kbang, *Curcuma singularis*, giải phẫu, kháng khuẩn, MIC.

1. GIỚI THIỆU

Sâm đá Kbang (*Curcuma singularis* Gagnep.) là một loài cây thân thảo thuộc họ Gừng (Zingiberaceae) đã được đồng bào Bana biết từ rất lâu với tác dụng bồi dưỡng sức khỏe, người dân gọi là “thuốc khỏe”. Gần đây, *C. singularis* chính thức được ghi nhận cho hệ thực vật Việt Nam bởi Nguyen và ctv (2016) với mẫu vật thu hái tại huyện Kbang, tỉnh Gia Lai. Loài này đã được mô tả, minh họa bằng hình ảnh, xác định thành phần hóa học và khả năng kháng khuẩn của tinh dầu thân rễ tươi [1]. Năm 2022, Doan và ctv chỉ ra rằng chiết xuất thân rễ *C. singularis* thể hiện tác dụng chống tăng sinh trên dòng tế bào AGS bằng cách kích hoạt con đường apoptosis ti thể phụ thuộc caspase. Thân rễ *C. singularis* có thể được sử dụng như một tác nhân hóa trị liệu để điều trị ung thư dạ dày với điều tra chống ung thư in vitro và đánh giá an toàn sinh học in vivo. Các hoạt chất chính tìm thấy bao gồm curcumol, ar-turmerone, và germacrone [2]. N. M. Cuong và ctv (2017) đã tách chiết tinh dầu từ *C. singularis* và kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu. Kết quả cho thấy có 68 hoạt chất được phát hiện bao gồm mono và sesquiterpenes với thành phần chính là camphor (25.83%), germacrone (8.00%), caryophyllene oxide (4.48%), terpinen-4-ol (3.84%), and germacrone-4,5-epoxide (3.84%). Tinh dầu từ *C. singularis* cho thấy hoạt tính chống lại các chủng vi sinh vật như *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli* [3].

Hiện nay, kháng kháng sinh đã trở thành một vấn đề nghiêm trọng và phổ biến ở các nước đang phát triển, gây tử vong cao mỗi năm. Việc sử dụng kháng sinh không hợp lý là yếu tố lớn nhất dẫn đến kháng kháng sinh và sự xuất hiện của vi khuẩn đa kháng thuốc trên toàn cầu. Điều này làm giảm hiệu quả của thuốc kháng sinh, khiến việc điều trị bệnh nhân trở nên khó khăn, tốn kém hoặc thậm chí là không thể điều trị. Một hướng mới được mở ra là sử dụng các chế phẩm, chất điều trị thay thế có nguồn gốc thực vật một cách hiệu quả, an toàn và chi phí thấp [4-6]. Thêm vào đó, để sử dụng an toàn và hiệu quả nguồn nguyên liệu từ thực vật, việc định danh chính xác tên loài là cực kỳ quan trọng. Hình thái của loài *C. singularis* Gagnep. đã được Nguyễn Quốc Bình mô tả năm 2016 nhưng đến nay vẫn chưa có công bố nào về cấu tạo giải phẫu của loài. Nghiên cứu này dựa trên mô tả hình thái Sâm đá Kbang để định danh loài và tiến hành giải phẫu, mô tả cấu tạo vi học của các bộ phận rễ, thân rễ, bẹ lá, phiến lá của *C. singularis*, góp phần cung cấp cơ sở dữ liệu giúp nhận diện chính xác tên loài *C. singularis*. Ngoài ra, nghiên cứu còn khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết tổng ethanol từ thân rễ cây Sâm đá Kbang lên các chủng vi khuẩn gây bệnh và kháng thuốc kháng sinh cao trên người như *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA), Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), *Escherichia coli* ATCC 25922 [7].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu thực vật: Sâm đá Kbang (*Curcuma singularis*) được thu ở làng Stor, xã Tơ Tung, huyện Kbang, tỉnh Gia Lai.

Mẫu vi sinh vật: 4 chủng vi khuẩn gồm: *Escherichia coli* ATCC 25922, Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Các chủng vi khuẩn được cung cấp bởi Bộ môn Vi sinh – Kí sinh trùng, Khoa Dược, trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

2.2. Khảo sát hình thái và cấu tạo giải phẫu

Việc xác định trên khoa học của loài nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp hình thái so sánh. Các cơ quan sinh dưỡng và sinh sản của loài được khảo sát chi tiết và so sánh đối chiếu với công bố trước đây [1].

Giải phẫu các bộ phận của Sâm đá Kbang bằng cách cắt vi phẫu bằng tay và nhuộm với thuốc nhuộm kép (đỏ Carmin và lục iod). Sau đó quan sát bằng kính hiển vi quang học (OLYMPUS CX22).

2.3. Phương pháp xử lý mẫu và điều chế cao tổng ethanol

Bột thân rễ khô (2000 g) với độ ẩm 9,8% ngâm trong ethanol tuyệt đối với tỉ lệ 1:3 (w/v). Sau 3 ngày, lọc và thu dịch chiết. Phần bột còn lại được tiếp tục ngâm trong ethanol (2 lần, 3 ngày/lần). Tất cả các dịch chiết được cô quay chân không ở 60°C để loại bỏ hết ethanol và thu cao tổng ethanol. Hiệu suất thu nhận cao tổng được tính là tỉ lệ % cao thu được so với khối lượng khô của mẫu [8].

2.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Cao chiết được hòa tan trong DMSO 10% ở nồng độ 200 mg/mL. Mỗi dịch cao chiết cho vào các giếng (đường kính 6 mm, dày 4 mm) trên môi trường thạch MHA (Muller Hinton Agar) đã được cấy trải 100 μ L dịch vi khuẩn ở nồng độ 10^8 CFU/mL (độ đục McFarland 0,5). Các đĩa thử nghiệm được ủ ở 37 °C trong 24 giờ và ghi nhận đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh giếng. Mẫu đối chứng âm chỉ chứa DMSO 10%. Mẫu chứng dương được sử dụng là các đĩa giấy kháng sinh ampicillin (Cty TNHH và TM Nam Khoa) và amikacin (HiMedia Laboratories, LLC). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở các thời điểm khác nhau. Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá bằng cách đo đường kính vòng ức chế vi khuẩn (d) theo công thức $d \text{ (mm)} = D - D'$ với D là đường kính vòng vô khuẩn và D' là đường kính lỗ thạch [8].

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, Minimum Bactericidal Concentration) được thực hiện trên đĩa 96 giếng theo hướng dẫn của CLSI M07-A9 với chỉ thị màu resazurin. Các cao chiết được pha loãng trong dung dịch DMSO 10% thành dãy nồng độ khảo sát từ 0-20 mg/mL. 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. Các giếng đối chứng âm chỉ chứa dịch vi khuẩn, môi trường và DMSO. Các giếng đối chứng dương chứa dịch vi khuẩn, DMSO, môi trường và kháng sinh (ampicillin và amikacin). 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. 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). Quan sát sự đổi màu, ghi nhận giá trị MIC [8].

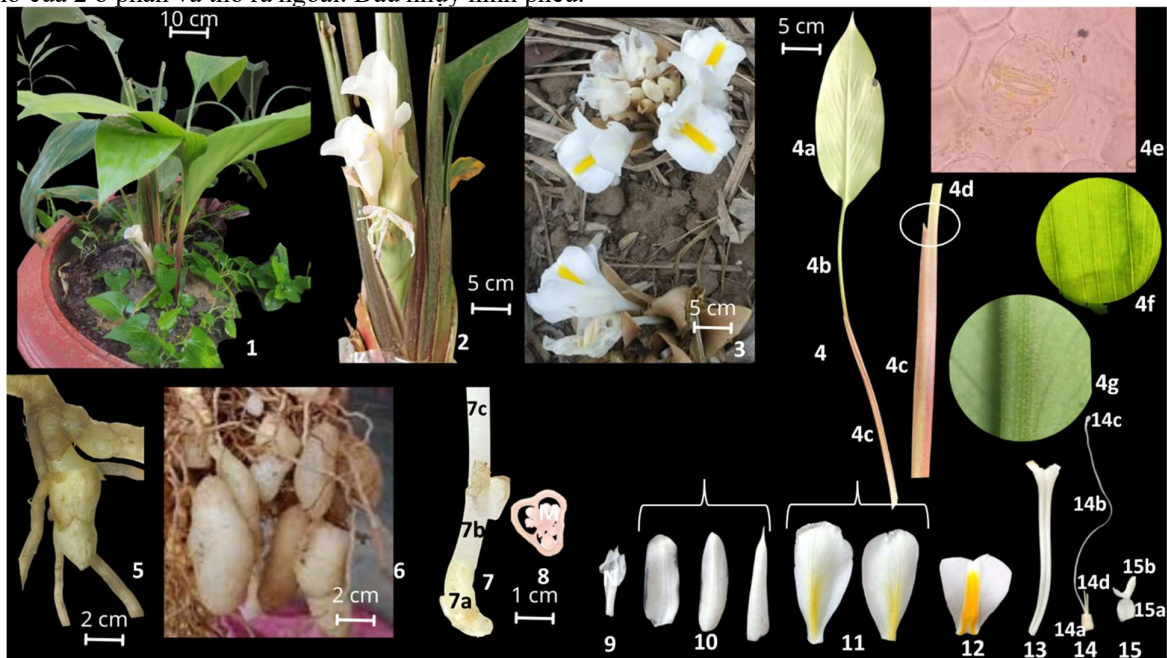
Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định bằng phương pháp trải đĩa: 100 μ L dịch thử nghiệm trên các giếng không có sự đổi màu của resazurin được trải lên các đĩa môi trường thạch MH và được ủ ở 37°C, sau 24 giờ quan sát sự sống sót của vi khuẩn. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của các cao chiết có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn trong giếng, 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. Mỗi thí nghiệm được thực hiện ít nhất 3 lần vào các thời điểm khác nhau để khẳng định kết quả [8].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái của Sâm đá Kbang

Cây thân thảo, tàn lụi vào mùa khô. Cây thường mọc thành bụi, cao 30–50 cm. Lá đơn nguyên, mọc cách, mỗi cây trưởng thành có 3-6 lá, lá mọc từ mặt đất, có chiều cao bằng chiều cao cây; phiến lá dài 10-22 cm, rộng 5-7 cm, hình trứng hoặc hình bầu dục, chóp nhọn, gốc tròn hoặc hình nêm, màu xanh lục, mặt trên bóng, mặt dưới màu nhạt hơn và có nhiều lông mịn như nhung; cuống lá dài 5-9 cm, hình trụ với một mặt hơi lõm; bẹ lá hình lòng máng ôm lấy nhau tạo thành thân giả, có lưỡi nhỏ do phần cuống bẹ lá có 2 mép

nối với nhau tạo thành gờ nhỏ, màu trắng. Rễ mọc ngầm dưới đất, phân nhánh và có đốt ngắn, bề mặt có nhiều vảy khô do lá biến đổi thành, thân rễ non có màu trắng, khi già có màu hơi vàng, có mùi thơm. Từ rễ có thể mọc ra nhiều rễ và có khi phình to thành củ; mỗi củ có cuống dài 3–8 cm, hình ô van, không có xơ. Củ non có màu vàng nhạt, vỏ mỏng, khi già có màu nâu nhạt, có mùi thơm, dẻo, dính. Hoa dạng cụm, mỗi cụm 4–8 hoa, các hoa mọc rất sát nhau. Mỗi hoa có 1 lá bắc ôm lấy hoa; lá bắc dài 3–4 cm, rộng 2,5–3 cm, hình tam giác, đỉnh tù. Hoa dài 7–8,5 cm, mọc từ nách lá bắc; đài hoa hình ống, dài 2–2,5 cm gồm 3 lá đài đều, màu trắng, rất mỏng, dính nhau; tràng hoa gồm 3 cánh hoa hình ô van, khá đều, màu trắng, dính nhau phía dưới thành ống dài 4–4,5 cm, hơi loe về phía đỉnh, trên chia 3 thùy 2,2–2,6 x 1,5–2 cm; Hoa chỉ còn 1 nhị thụ với bao phần 2 ô dài 9–11 mm, gốc mỗi ô kéo dài thành chùy dẹt, bằng nhau dài 3–4 mm, hướng trong; chỉ nhị hình lòng máng 4–5 x 1,5–2 cm, màu trắng ôm lấy vòi nhụy. Nhị thụ thuộc vòng trong, đối diện với cánh môi (do 2 nhị lép biến đổi thành). Cánh môi có hình trứng lớn, kích thước 2,2–2,5 x 1,8–2,1 cm, đỉnh có rãnh, dài 1–1,5 mm, màu trắng, có dải màu vàng chạy dọc ở giữa. Vòng ngoài chỉ còn 2 nhị lép biến đổi thành dạng cánh hoa, hình trứng hẹp không đều, kích thước 2,5–2,8 x 1,2–1,5 cm, màu trắng, có dải màu vàng dọc gần giữa. Bầu noãn 4–5 x 3–4 mm, hình bầu dục, mỏng nước, màu trắng, bầu dưới, 3 ô, mỗi ô chứa nhiều noãn, đỉnh noãn trung trụ. 1 vòi nhụy dài 4,5–5,5 cm, màu trắng, hình sợi, chui qua khe hở của 2 ô phần và thò ra ngoài. Đầu nhụy hình phễu.



Hình 1. Hình thái cây Sâm đá (*Curcuma singularis* Gagnep.)

1. Cây có hoa, 2. Cụm hoa, 3. Cụm hoa mùa khô (khi thân khí sinh tàn lụi), 4. Lá cây, 4a. Phiến lá, 4b. Cuống lá, 4c. Bẹ lá, 4d. Lưỡi nhỏ, 4e. Lỗ khí kiểu song bào, 4f. Mặt trên lá, 4g. Mặt dưới lá, 5. Thân ngầm và rễ, 6. Củ, 7a. Bầu noãn, 7b. Ống dài, 7c. Ống tràng, 8. Bầu noãn cắt noãn, 9. Đài hoa, 10. Ba cánh hoa, 11. Hai nhị lép, 12. Cánh môi, 13. Ống tràng, 14. Bộ nhụy, 14a. Bầu noãn, 14b. Vòi nhụy, 14c. Đầu nhụy, 14d. Hai vòi nhụy lép, 15. Nhị thụ, 15a. Chỉ nhị, 15b. Bao phần

Mẫu chuẩn: Thorel 3194 (P)

Mẫu nghiên cứu: SĐ 1121, thu ở làng Stor, xã Tơ Tung, huyện Kbang, tỉnh Gia Lai.

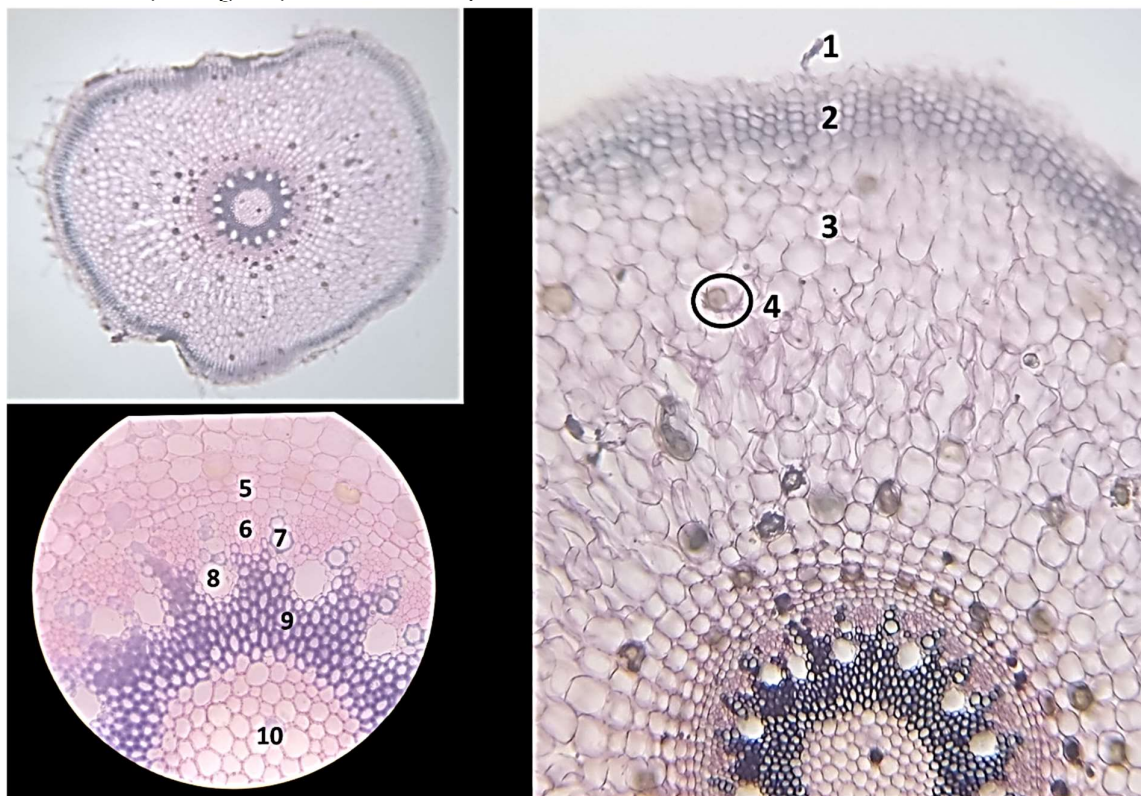
Ngày thu mẫu: 12/11/2021

Phân bố: Việt Nam (huyện Kbang, tỉnh Gia Lai), Thái Lan, Lào, Campuchia

3.2. Cấu tạo giải phẫu

Rễ: vi phẫu thường méo, ít khi tròn, chia làm 2 vùng: vùng vỏ từ tầng lông hút đến nội bì chiếm $\frac{3}{4}$ diện tích vi phẫu, vùng trụ giữa từ trụ bì trở vào trong chiếm $\frac{1}{4}$ diện tích vi phẫu. Từ ngoài vào trong gồm các mô: tầng lông hút gồm 1 lớp tế bào sống, vách cellulose, hình dạng khá đều, xếp khít nhau, có nhiều lông

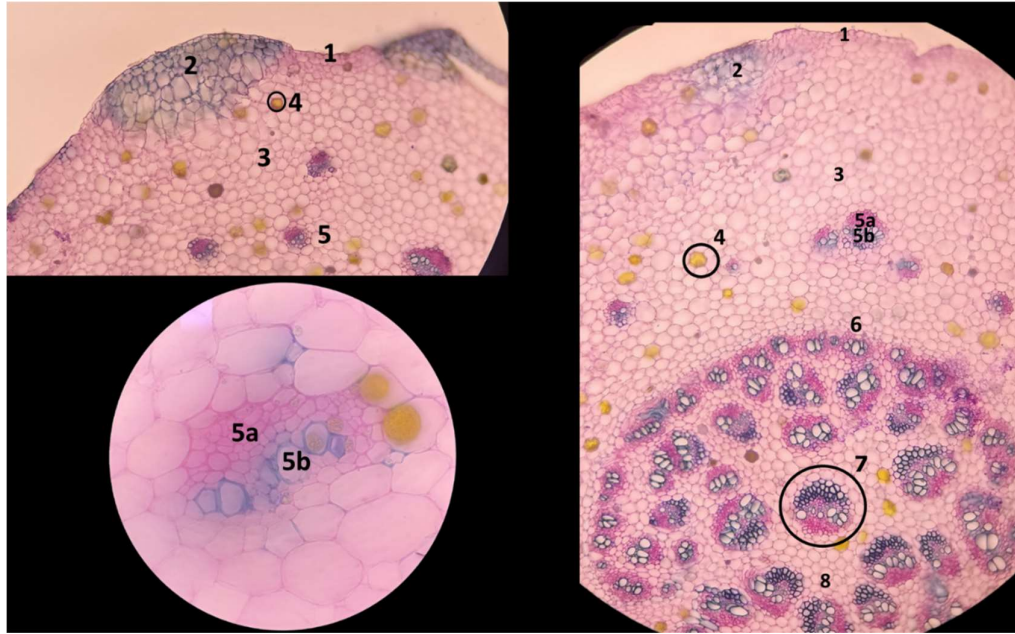
hút. Tầng suberoid gồm 4-5 lớp tế bào hình chữ nhật hoặc vuông, vách mỏng chất bền, xếp xuyên tâm. Mô mềm vỏ chia làm 2 vùng: mô mềm vỏ ngoài gồm 10 – 12 lớp tế bào vách cellulose, kích thước không đều, xếp lộn xộn chứa các khoảng gian bào khá to (mô mềm khuyết); mô mềm vỏ trong gồm 8 – 10 lớp tế bào hình chữ nhật hoặc hình vuông, vách cellulose, kích thước nhỏ dần càng vào tâm, xếp thành vòng đồng tâm vào dây xuyên tâm (mô mềm đạo). Trong vùng mô mềm vỏ có rất nhiều tế bào chứa chất tiết màu vàng. Nội bì hình chữ U không rõ. Trụ bì gồm 1 lớp tế bào hình đa giác, vách cellulose, đều, xếp xen kẽ nội bì. Hệ thống dẫn gồm 18 – 20 bó libe 1 xếp xen kẽ với 18 – 20 bó tiền mạch trên một vòng sát trụ bì. Libe cấp 1 gồm 4 – 5 lớp tế bào hình đa giác, vách cellulose, không đều, phân hóa hướng tâm. Bó tiền mạch gồm 2 – 4 mạch tiền mạch, hình đa giác, vách mỏng, phân hóa hướng tâm. Có 14 – 15 mạch hậu mạch nằm thành một vòng dưới libe 1 và tiền mạch. Mạch hậu mạch có hình đa giác, hơi tròn, vách mỏng, kích thước to gấp 8 – 10 lần tiền mạch. Mô mềm tủy chia thành 2 vùng: mô mềm tủy ngoài gồm 8 – 10 lớp tế bào hình đa giác, vách mỏng, xếp khít nhau theo kiểu mô mềm đặc; mô mềm tủy trong gồm 6 – 7 lớp tế bào hình đa giác, vách cellulose, không đều, kiểu mô mềm đạo.



Hình 2. Cấu tạo giải phẫu rễ cây Sâm đá (*Curcuma singularis*)

7. Tiền mạch, 8. Hậu mạch, 9. Mô mềm tủy hóa mô cứng, 10. Mô mềm tủy vách cellulose

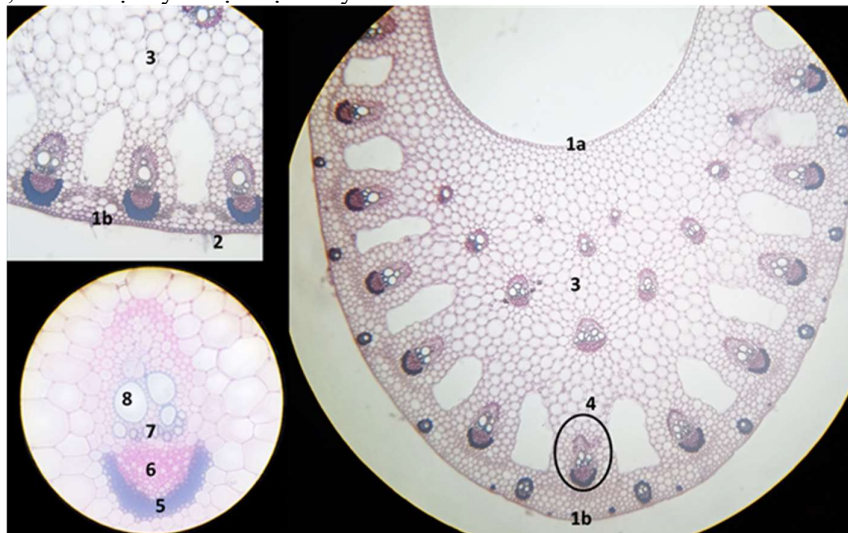
Thân rễ: Vi phẫu tiết diện tròn. Biểu bì tế bào hình chữ nhật, kích thước nhỏ. Cụm mô cứng 3-6 lớp tế bào hình đa giác, vách mỏng chất bền, kích thước không đều, xếp lộn xộn thành từng cụm lớn ở các chỗ lồi. Mô mềm vỏ khuyết gồm nhiều lớp tế bào hình tròn hoặc đa giác gần tròn, mô mềm vỏ sẽ càng dày hơn khi thân rễ phình to thành củ; có bó vết lá trong mô mềm vỏ. Nội bì không rõ. Trụ bì gồm 1 lớp tế bào hình đa giác, vách cellulose. Nhiều bó dẫn xếp không thứ tự từ trụ bì vào trong mô mềm tủy, các bó bên trong kích thước hơi lớn hơn. Bó dẫn gồm cụm libe chồng lên 2 - 7 mạch hậu mạch to, hình tròn hoặc gần tròn; mạch tiền mạch một hoặc không có. Dưới gỗ có cụm mô cứng gồm 1-3 lớp tế bào hình đa giác, có khi không có mô cứng. Mô mềm tủy đạo tế bào hình tròn hoặc hơi bầu dục, kích thước không đều. Vùng tủy chiếm hơn 1/3 đường kính vi phẫu. Có nhiều tế bào chứa chất tiết màu vàng nằm rải rác khắp vùng mô mềm.



Hình 3 Cấu tạo giải phẫu thân rễ cây Sâm đá (*Curcuma singularis*)

1. Biểu bì, 2. Cụm mô cứng, 3. Mô mềm vỏ, 4. Chất tiết, 5. Bó vết lá, 5a. Libe, 5b. Gỗ, 6. Nội bì, 7. Bó dẫn, 8. Mô mềm tủy

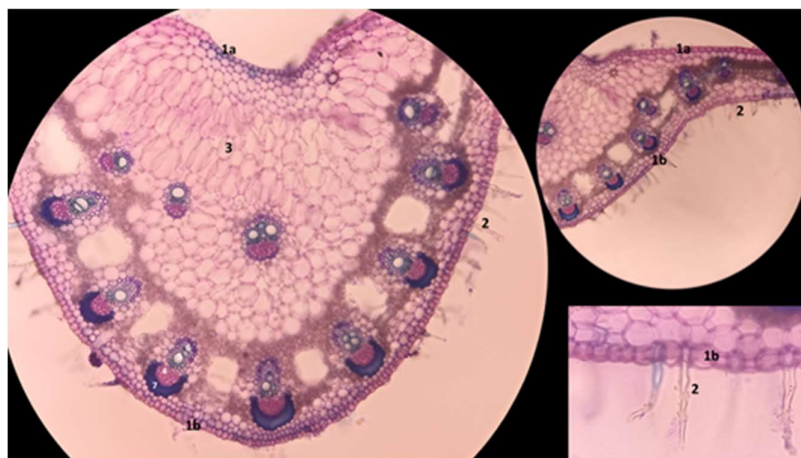
Bẹ lá: mặt trên lõm, mặt dưới lồi. Biểu bì tế bào hình chữ nhật hoặc đa giác xếp khít nhau. Mô mềm đạo tế bào gần tròn hoặc đa giác, kích thước không đều nhau. Ở phía biểu bì dưới có các bó libe gỗ lớn nhỏ xếp thành hàng xen kẽ nhau. Bó lớn có cấu tạo với gỗ ở trên, libe ở dưới. Gỗ gồm có: 1-3 mạch hậu mộc, 2-4 mạch tiền mộc; dưới libe là cụm mô cứng, tế bào đa giác kích thước nhỏ, vách dày tẩm chất gỗ; trên gỗ có khoảng 2-3 lớp tế bào hình đa giác, vách cellulose dày, xếp lộn xộn khít nhau. Bó nhỏ có cấu tạo tương tự bó lớn nhưng mô cứng bao liên tục với 2-3 lớp tế bào hình đa giác, vách dày. Ở phía trên rải rác cũng có 9-10 bó libe gỗ; dưới gỗ và trên libe có 2-3 lớp tế bào vách cellulose dày. Các cụm mô mềm xếp xen kẽ các bó libe gỗ lớn, đôi khi bị hủy để lại một khuyết lớn.



Hình 4 Cấu tạo giải phẫu bẹ lá cây Sâm đá (*Curcuma singularis*)

- 1a. Biểu bì trên, 1b. Biểu bì dưới, 2. Lông che chở, 3. Mô mềm, 4. Bó dẫn, 5. Mô cứng, 6. Libe, 7. Tiền mộc, 8. Hậu mộc

Phiến lá: gồm gân giữa và phiến lá chính ở hai bên. Gân giữa: mặt trên lõm, mặt dưới lồi. Biểu bì tế bào hình chữ nhật hoặc đa giác xếp khít nhau, biểu bì dưới có nhiều lông che chở đa bào một dãy thường có 2 tế bào. Mô mềm chủ yếu là mô mềm khuyết tế bào gần tròn hoặc đa giác, kích thước không đều nhau; phía dưới biểu bì trên có 2-3 lớp mô mềm đặc với các tế bào xếp khít nhau. Ở phía biểu bì dưới có các bó libe gỗ lớn xếp thành hàng với gỗ ở trên, libe ở dưới. Gỗ gồm có: 1-2 mạch hậu mộc, 1-2 mạch tiền mộc; dưới libe và trên gỗ là cụm mô cứng, dưới libe tế bào đa giác kích thước nhỏ, vách rất dày tẩm chất gỗ; trên gỗ các tế bào hình đa giác, vách mỏng hơn. Ở phía trên rải rác cũng có 3-4 bó libe gỗ, xếp thành hàng và lệch về một phía của gân giữa; dưới gỗ và trên libe có 2 lớp tế bào mô cứng. Các cụm mô mềm xốp xen kẽ các bó libe gỗ lớn, đôi khi bị hủy để lại một khuyết lớn, xung quanh có nhiều lục lạp.



Hình 5 Cấu tạo giải phẫu phiến lá cây (*Curcuma singularis*)

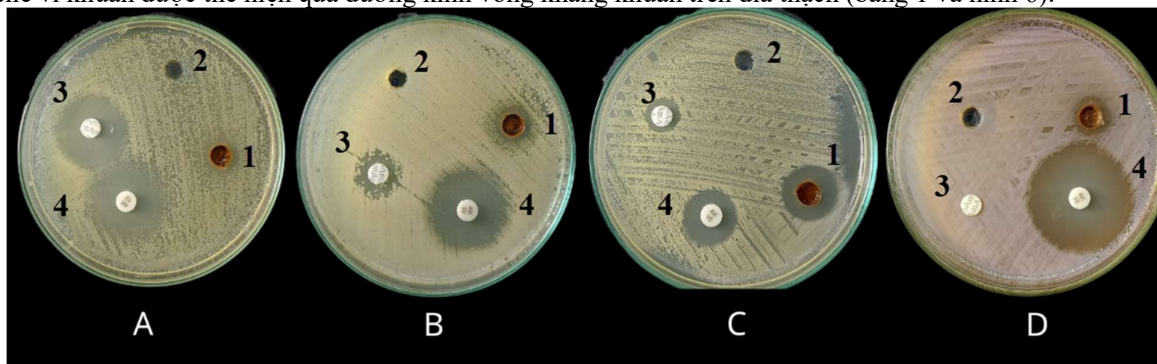
1a. Biểu bì trên, 1b. Biểu bì dưới, 2. Lông che chở, 3. Mô mềm, 4. Libe, 5. Hậu mộc, 6. Tiền mộc, 7. Mô cứng

3.3. Điều chế cao chiết tổng ethanol từ thân rễ Sâm đá Kbang.

Thân rễ cây Sâm đá khô (2000 g) qua quá trình xử lý thu được 1750 g bột dược liệu. Tiến hành tách chiết với ethanol tuyệt đối theo tỉ lệ 1:3 w/v (lặp lại 3 lần) thu được 84 g cao chiết thân rễ Sâm đá với hiệu suất chiết cao là 4,8 %. Cao chiết ethanol từ thân rễ Sâm đá có màu nâu sẫm, dạng rắn mềm, hơi rít và có mùi thơm đặc trưng.

3.4. Hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ thân rễ cây Sâm đá được khảo sát ở các nồng độ khác nhau từ 50 mg/mL đến 250 mg/mL. Kết quả cho thấy hoạt lực kháng của cao chiết với các chủng vi khuẩn thử nghiệm thể hiện rõ ở nồng độ từ 200 mg/mL. Khả năng kháng khuẩn được xác định dựa trên khả năng ức chế vi khuẩn được thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn trên đĩa thạch (bảng 1 và hình 6).



Hình 6. Kết quả kháng sinh đồ của cao chiết thân rễ

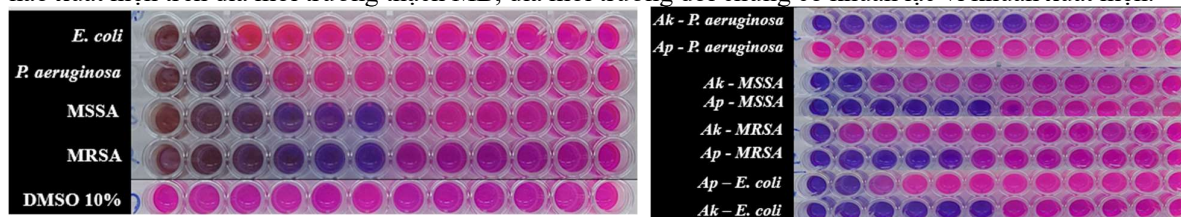
A. MSSA B. MRSA C. *E. coli* D. *P. aeruginosa*
1. Cao chiết, 2. DMSO, 3. Ampicillin, 4. Amikacin

Bảng 1: Đường kính vòng kháng khuẩn của dịch chiết ethanol thân rễ Sâm đá.

Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	MSSA	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Cao chiết 200 mg/mL	11,67±0,29	15,83±0,29	9,67±0,57	11,17±0,29
DMSO 10%	0,00	0,00	0,00	0,00
Ak 10 µg	27,83±0,29	14,83±0,57	29,83±0,29	34,67±0,29
Amp10 µg	15,17±0,29	11,67±0,29	24,67±0,58	0,00

Dựa vào đường kính vòng kháng khuẩn (bảng 1) cho thấy cao chiết ethanol thân rễ Sâm đá ở nồng độ 200 mg/mL có khả năng kháng cả 4 chủng khuẩn khảo sát với đường kính vòng kháng từ 9,67±0,57 mm đến 15,83±0,29 mm. Trong đó, khả năng kháng MRSA là cao nhất với đường kính vòng kháng là 15,83±0,29 mm, tiếp theo là MSSA (11,67±0,29 mm), *P. aeruginosa* (11,17±0,29 mm) và kháng yếu nhất với *E. coli* (9,67±0,57 mm). Đường kính vòng kháng của cao chiết trên chủng MRSA cao hơn hai chứng dương ampicillin 10 µg và amikacin 10 µg với đường kính vòng kháng lần lượt là 11,67±0,29 mm và 14,83±0,57 mm. Cao chiết ethanol từ thân rễ Sâm đá có khả năng kháng với chủng vi khuẩn *P. aeruginosa*, trong khi kháng sinh ampicillin lại không có tác dụng kháng chủng vi khuẩn này.

Dựa vào sự đổi màu của thuốc thử resazurin trên đĩa 96 giếng có thể xác định được nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của thân rễ Sâm đá với 4 chủng vi khuẩn thử nghiệm. 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). Các giếng không có sự đổi màu của resazurin được trải lên các đĩa môi trường thạch MB. 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, không có khuẩn lạc nào xuất hiện trên đĩa môi trường thạch MB, đĩa môi trường đối chứng có khuẩn lạc vi khuẩn xuất hiện.



A

B

Hình 6. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết thân rễ Sâm đá và các chứng dương, chứng âm trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm

A. Cao chiết và chứng âm

B. Chứng dương

Nhìn chung, giá trị MIC của cao chiết Sâm đá trên các chủng khuẩn thí nghiệm đều không vượt quá 10 mg/mL, tức có hiệu quả kháng khuẩn vừa phải. Nồng độ MIC càng thấp chứng tỏ các chủng vi khuẩn nhạy cảm với cao chiết thân rễ Sâm đá. Ở MSSA và MRSA, cao chiết có nồng độ MIC đạt giá trị thấp nhất là 0,625 mg/mL cho thấy khả năng kháng MSSA và MRSA của cao chiết có khả năng kháng tốt 2 chủng vi khuẩn này ngay cả khi ở nồng độ thấp. Ở *P. aeruginosa*, nồng độ MIC là 5 mg/mL có thấy hiệu quả kháng khuẩn tương đối tốt, đặc biệt khi *P. aeruginosa* một trong những tác nhân chủ yếu gây nhiễm trùng bệnh viện khả năng kháng thuốc cao. Ở *E. coli*, nồng độ MIC cao nhất là 10 mg/mL cho thấy hoạt tính kháng yếu của cao chiết đối với loại vi khuẩn gram âm này.

Bảng 2: Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết với các chủng vi khuẩn được thử nghiệm

Chủng vi khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết (mg/mL)
MSSA	0,625
MRSA	0,625
<i>E. coli</i>	10,000
<i>P. aeruginosa</i>	5,000

Kết quả cấy trải các giếng không có sự đổi màu của resazurin ở các nồng độ MIC, 2MIC và 3MIC ở các chủng vi khuẩn thử nghiệm cho thấy nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đối với MSSA và MRSA lớn hơn

2,5 mg/mL; đối với *P. aeruginosa* lớn hơn 15 mg/mL; đối với *E. coli* lớn hơn 20 mg/mL. Các đĩa cấy trải đều có xuất hiện khuẩn lạc cho thấy cao chiết chỉ có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn nhưng không có tác dụng diệt khuẩn.

Bảng 3: Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các chứng dương với các chủng vi khuẩn thử nghiệm

Chủng vi khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu (µg/mL) của chứng dương	
	Amikacin	Ampicillin
MSSA	1,0	16,0
MRSA	2,0	32,0
<i>E. coli</i>	1,0	16,0
<i>P. aeruginosa</i>	0,5	-

S. aureus là một loại vi khuẩn Gram dương gây ra nhiều loại bệnh lý, từ các bệnh ngoài da đến những bệnh nghiêm trọng như viêm phổi, viêm tủy xương, viêm nội tâm mạc, viêm màng não và nhiễm trùng huyết. Vi khuẩn này còn là một tác nhân gây nhiễm trùng bệnh viện, cản trở việc điều trị các chấn thương như bỏng và áp xe da ở bệnh nhân nhập viện. *S. aureus* là một trong 5 vi sinh vật có tỷ lệ mắc bệnh cao nhất ở bệnh nhân nhập viện. Trong những năm gần đây, tình trạng kháng thuốc kháng sinh đã trở thành một vấn đề đáng báo động trên toàn thế giới. Năm 2017, Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã phân loại *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) và *S. aureus* kháng vancomycin (VRSA) là các mầm bệnh ưu tiên cao, đòi hỏi những nỗ lực toàn cầu để phát triển các phương pháp điều trị và thuốc mới để giảm thiểu các hậu quả trong tương lai của nhiễm trùng bởi các vi khuẩn này. Hiện tại, chỉ có bảy loại kháng sinh đang trong giai đoạn tiền lâm sàng để điều trị nhiễm trùng MRSA [9]. Vì vậy, các chế phẩm hoặc hợp chất được chiết xuất từ thực vật như là một hướng đầy triển vọng về hiệu lực và tính an toàn. Cao chiết ethanol từ thân rễ Sâm đá thể hiện khả năng kháng tốt với MRSA, có tiềm năng trở thành nguồn nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật để thay thế hoặc kết hợp với các kháng sinh khác trong điều trị nhiễm trùng *S. aureus*, đặc biệt là *S. aureus* kháng methicillin (MRSA). Okwu và ctv (2019) khảo sát hoạt tính kháng MRSA, *P. aeruginosa* và *E. coli* từ chiết xuất ethanol của lá cây Bời lời nhót (*Litsea iteodaphne*) ở nồng độ 400 mg/mL cho kết quả kháng khuẩn với đường kính vòng ức chế lần lượt là 8,1; 6,3 và 5,7 mm và cho giá trị MIC thấp nhất với MRSA (0,0256 mg/mL) [6]. Wikaningtyas P và ctv (2016) đã khảo sát hoạt tính kháng khuẩn từ dịch chiết của 8 loài thực vật, trong đó có 3 loài thuộc họ Gừng gồm *Curcuma xanthorrhiz*, *Kaempferia pandurata* và *Zingiber officinale* cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất, được tính theo giá trị nồng độ ức chế tối thiểu, chống lại MRSA được thể hiện qua chiết xuất *K. pandurata* (256 µg/mL), tiếp theo là *C. xanthorrhiza* (512 µg/mL) và *Z. officinale* (>8192 µg/mL) [10].

Nhiễm trùng *P. aeruginosa* đã trở thành một mối quan tâm hàng đầu trong các bệnh nhiễm trùng mắc phải tại bệnh viện, đặc biệt là ở những bệnh nhân bị bệnh nặng và suy giảm miễn dịch. Vấn đề chính dẫn đến tỷ lệ tử vong cao nằm ở việc xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng thuốc. Do đó, hiện nay nhiều nghiên cứu được tiến hành để có thể tìm ra hướng mới để giải quyết vấn đề này [11]. Latha và ctv (2010) đã nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất *Vernonia cinerea* (L.) với *P. aeruginosa* cho giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 3,13 mg/mL [5]. Gonalimali và ctv (2018) đã khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết *Hibiscus sabdariffa*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum*, và *Thymus vulgaris* với các vi sinh vật gây bệnh phổ biến trên người bao gồm *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans* thấy rằng dịch chiết ethanol của *Rosmarinus officinalis* có hoạt tính kháng với các chủng vi khuẩn thử nghiệm với đường kính vùng ức chế lớn nhất đối với *P. aeruginosa* (23.4 ± 1.4 mm) nhưng không có tác dụng ức chế với *Candida albicans*. Chỉ các chiết xuất ethanol của cây đinh hương và cỏ xạ hương cho thấy tác dụng chống nấm đối với *C. albicans* với các vùng ức chế tương ứng từ $25,2 \pm 1,4$ đến $15,8 \pm 1,2$ mm [4].

Dựa trên kết quả thí nghiệm với DMSO 10%, các mẫu chứng âm đều không xuất hiện vòng kháng khuẩn, đây là lí do khi các thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn thường sử dụng DMSO làm chứng âm. Và kết quả này cũng khẳng định rằng, DMSO không ảnh hưởng đến kết quả các thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trong nghiên cứu này.

Cao chiết ethanol từ thân rễ Sâm đá trước khi khảo sát hoạt tính kháng khuẩn đã được sấy thăng hoa 24 giờ để loại bỏ hoàn toàn dung môi và nước nên có thể loại trừ khả năng kháng khuẩn là do dung môi gây ra.

Chứng dương ampicillin không có hoạt tính kháng trên chủng *Pseudomonas aeruginosa*, có thể giải thích là do *P. aeruginosa* là vi khuẩn gây bệnh phổ biến nhất trong môi trường bệnh viện và khả năng kháng thuốc cao với nhiều loại kháng sinh. Đề kháng kháng sinh của *P. aeruginosa* hiện nay từ 70-80% gây kháng

cao với betalactam[7]. Ampicillin là kháng sinh phổ rộng thuộc nhóm betalactam, nên *P. aeruginosa* có khả năng đề kháng ampicillin, điều này cũng được thể hiện qua kết quả thí nghiệm.

Amikacin là kháng sinh bán tổng hợp họ aminoglycosid, thường được sử dụng để ức chế các chủng vi khuẩn gram âm hiếu khí, trong đó có *P. aeruginosa*. Do đó, amikacin được dùng làm chứng dương trong thí nghiệm này.

4. KẾT LUẬN

Dựa vào đặc điểm hình thái có thể định danh loài Sâm đá ở huyện Kbang, tỉnh Gia Lai có tên khoa học là *Curcuma singularis* Gagnep. Hình ảnh cấu tạo giải phẫu Sâm đá Kbang cho thấy cấu trúc đặc trưng của thân rễ với nhiều bó vết lá nằm rải rác trong vùng vỏ; mô mềm ở rễ và thân rễ có nhiều tế bào chứa chất tiết màu vàng; bẹ lá và phiến lá với nhiều bó dẫn xếp thành hàng, biểu bì ở phiến lá có nhiều lông che chở đa bào. Cao chiết ethanol từ thân rễ Sâm đá có hoạt tính kháng với tất cả các chủng khuẩn khảo sát gồm *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA), Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA) và *Escherichia coli* ATCC 25922; cao chiết thể hiện hoạt lực kháng mạnh với MRSA (MIC = 0,625 mg/mL, d = 15,83±0,29 mm), MSSA (MIC = 0,625 mg/mL, d = 11,67±0,29 mm); kháng trung bình với chủng *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 5 mg/mL, d = 11,17±0,29 mm) và *Escherichia coli* (MIC = 10 mg/mL, d = 9,67±0,57 mm). Các đĩa cấy trải đều để khảo sát MBC đều có xuất hiện khuẩn lạc cho thấy cao chiết chỉ có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn nhưng không thể tiêu diệt vi khuẩn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi trường Đại học Nguyễn Tất Thành theo hợp đồng số: 2021.01.94/HĐ-KHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Q. N. Binh, A. H. Tuan, V. N. Dat, T. V. T. Thanh, P. N. Hanh, M. N. Cuong, *et al.*, "A new record Species for Flora of Vietnam—*Curcuma singularis* Gagnep.(Zingiberaceae)," *VNU Journal of Science: Natural Sciences Technology*, vol. 33, pp. 25-29, 2017.
- [2] C. C. Doan, T. L. Le, N. Q. C. Ho, T. H. L. La, V. C. Nguyen, V. D. Le, *et al.*, "Bioactive chemical constituents, in vitro anti-proliferative activity and in vivo toxicity of the extract of *Curcuma singularis* Gagnep rhizomes," *J Ethnopharmacol*, vol. 284, p. 114803, Feb 10 2022.
- [3] N. M. Cuong, V. T. Ha, P. N. Khanh, D. T. Van, T. D. Cuong, T. T. Huong, *et al.*, "Chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil from the rhizomes of *Curcuma singularis* growing in Vietnam," *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod*, vol. 5, pp. 20-25, 2017.
- [4] F. D. Gonelimali, J. Lin, W. Miao, J. Xuan, F. Charles, M. Chen, *et al.*, "Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms," *Front Microbiol*, vol. 9, p. 1639, 2018.
- [5] L. Y. Latha, I. Darah, M. J. Kassim, and S. Sasidharan, "Antibacterial activity and morphological changes of *Pseudomonas aeruginosa* cells after exposure to *Vernonia cinerea* extract," *Ultrastruct Pathol*, vol. 34, pp. 219-25, Aug 2010.
- [6] O. M. Okwu MU, Akpoka AO, Izevbuwa OE, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review," *AIMS Microbiol*, vol. Apr 15, pp. 5(2):117-137, 2019.
- [7] T. V. Ngọc, P. T. N. Thảo, and T. T. T. Nga, "Khảo sát đặc điểm kháng thuốc của *Pseudomonas aeruginosa* và *Acinetobacter baumannii* gây viêm phổi bệnh viện," *Thời sự y học*, vol. 3, 2017.
- [8] L. T. M. Ngân, N. T. Lê Thị Kim Lan, T. Linh, N. N. Quý, T. T. Lê Thị Thanh Loan, H. Hoa, *et al.*, "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*," *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* vol. 2, pp. 19-26, 2018.
- [9] B. M. N. Souza, J. G. Pinto, A. H. C. Pereira, A. G. Minan, and J. Ferreira-Strixino, "Efficiency of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Photodithazine(RR) on MSSA and MRSA Strains," *Antibiotics (Basel)*, vol. 10, p. 869, Jul 17 2021.
- [10] P. Wikaningtyas and E. Y. Sukandar, "The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens," *The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens*, vol. 6, pp. 16-19, 2016.
- [11] M. Bassetti, A. Vena, A. Croxatto, E. Righi, and B. Guery, "How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections," *Drugs in context*, vol. 7, pp. 1-18, 2018.

RESEARCH ON ANATOMICAL STRUCTURE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT FROM RHIZOMES OF *Curcuma singularis* Gagnep

HỒ THIÊN HOÀNG², VÕ PHÁT THỊNH¹, LÊ THỊ THU TRANG^{1*}

¹ Pharmacy Department, Nguyen Tat Thanh University

² Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City

*Corresponding: lttrang@ntt.edu.vn

Abstract *Curcuma singularis* Gagnep. was first recorded for the flora of Vietnam in 2016 of which the specimen collected from Kbang district, Gia Lai province, Vietnam. This research was conducted to describe the morphological and anatomical structures of root, rhizome, petiole, and leaf blade of *C. singularis*. The antibacterial activities of the ethanol extract obtained from *C. singularis* rhizomes were determined by using diffusion agar plate, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bacterium kill concentration (MBC). As a result, the anatomical structures of *C. singularis* showed that the structural characteristic of the rhizome possesses many medullary bundles in the cortex; and secretory cells in parenchyma in the root and rhizome; leaf blade and leaf sheath have many vascular bundles arranged in rows the epidermis on the leaf blade is covered with multicellular hairs. The ethanol extract isolated from *C. singularis* rhizomes was found to be effective against several bacterial strains, including Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

Key words. *Curcuma singularis*, morphological and anatomical structures, antibacterial activity, MIC.

Ngày gửi bài: 21/06/2022

Ngày chấp nhận đăng: 21/10/2022