



# ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM CỦA CÁC DUNG DỊCH NANO BẠC TỔNG HỢP TỪ DỊCH CHIẾT LÁ TRÀU (*PIPER BETLE*) VÀ LÁ TRỨNG CÁ (*MUNTINGIA CALABURA*)

## EVALUATION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF SILVER NANOPARTICLES FROM *PIPER BETLE* AND *MUNTINGIA CALABURA* LEAF AQUEOUS EXTRACTS

Cao Văn Dư<sup>a\*</sup>, Dương Thị Ngọc Dung<sup>b</sup>, Nguyễn Xuân Chương<sup>c</sup>, Hoàng Đức Thuận<sup>d</sup>, Ngô Văn Cường<sup>e</sup>, Nguyễn Phạm Lê Minh Anh<sup>f</sup>, Nguyễn Minh Đức<sup>g</sup>, Nguyễn Thị Hiền<sup>h</sup>, Nguyễn Thị Như Quỳnh<sup>i</sup>

Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, Biên Hòa, Đồng Nai, Việt Nam

<sup>a</sup>caovandulhu@gmail.com, <sup>b</sup>duongthingocdung.lhu@gmail.com, <sup>c</sup>nguyensexuanchuong1010@gmail.com, <sup>d</sup>hoangthuan08@gmail.com,

<sup>e</sup>vancuong283@gmail.com, <sup>f</sup>mianguyenpham97@gmail.com, <sup>g</sup>ds.nguyenminhduc.lhu@gmail.com, <sup>h</sup>hiensglhu@gmail.com,

<sup>i</sup>ds.nhuquynhnguyen@gmail.com

**TÓM TẮT.** Những năm gần đây, các dung dịch nano bạc được quan tâm nghiên cứu nhằm tạo ra những sản phẩm ứng dụng phục vụ trong đời sống. Có nhiều phương pháp để tổng hợp nano bạc, trong số đó có phương pháp khử hóa ion bạc bằng dịch chiết dược liệu (tổng hợp xanh). Đề tài đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của dung dịch nano bạc tổng hợp từ dịch chiết lá Tràu và dịch chiết lá Trứng cá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch Kirby-Bauer. Kết quả chỉ ra các dung dịch thử nghiệm đều ức chế sự tăng trưởng các loại vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và nấm *Candida albicans*. Giá trị MIC của các dung dịch nano bạc cũng được xác định bằng phương pháp pha loãng trong ống nghiệm và so sánh với penicillin G. Các dung dịch nano bạc đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn vượt trội so với penicillin G trên chủng vi khuẩn *P. aeruginosa*.

**ABSTRACT.** In recent years, silver nanoparticles (NPs) are got attention by researchers in purpose of creating applied products. There are several methods to synthesize silver NPs, one of them is the reduction of silver ion in plant extract (green synthesis). This research evaluates the antibacterial and antifungal activities of silver NPs synthesized from *Piper betle* and *Muntingia calabura* leaf aqueous extracts by agar diffusion method Kirby-Bauer. The results showed that the tested solutions inhibited the growth of bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and fungus *Candida albicans*. The MIC value of the nanosilver solutions were determined by broth dilution method and compared with penicillin G. All tested nanosilver solution exhibited superior antibacterial activity compared to penicillin G on strains *P. aeruginosa*.

**TỪ KHOÁ:** nano bạc, Tràu, Trứng cá, kháng khuẩn, kháng nấm

**KEYWORDS:** silver nanoparticles, *Piper betle*, *Muntingia calabura*, antibacterial, antifungal

### 1. GIỚI THIỆU

Hạt nano là những hạt có kích thước từ 1 – 100 nm [1]. Ngày nay, các hạt nano đang được nghiên cứu vì những tính chất và ứng dụng đặc biệt của chúng. Trong đó, các hạt nano bạc với hoạt tính kháng khuẩn được ứng dụng nhiều trong các sản phẩm y tế. Hoạt tính kháng khuẩn của nano bạc được biết đến là do: (1) sự bám dính của các tiểu phân nano bạc lên bề mặt của thành tế bào và màng tế bào làm rối loạn quá trình trao đổi chất (2) sự thâm nhập của các hạt nano vào bên trong tế bào làm phá hủy các cấu trúc nội bào (ti thể, không bào, ribosom) và cấu trúc của các phân tử sinh học (protein, lipid và ADN), (3) các hạt nano gây ra độc tế bào do tạo ra các gốc tự do oxy hóa, và (4) làm thay đổi các hệ thống thông tin di truyền của vi khuẩn [2]. Trong bối cảnh các loại vi khuẩn ngày càng đề kháng với các kháng sinh truyền thống, nano bạc được coi như là một niềm hy vọng mới cho nhân loại.

Để tổng hợp các hạt nano bạc, hai phương pháp thường được sử dụng là phương pháp kết tụ (bottom-up, hạt nano hình thành từ các ion hoặc các nguyên tử kết hợp lại với nhau) và phương pháp phân tán (top-down, hạt nano hình thành từ phân tán vật liệu khối) [1]. Trong phương pháp kết tụ, ion kim loại bị khử hóa để tạo thành các nguyên tử. Tác nhân khử hóa có thể là sóng điện từ, các chất khử hóa học

(acid citric, acid ascorbic...) và đặc biệt là dịch chiết từ các dược liệu (phương pháp tổng hợp xanh) [1]. Trong nghiên cứu trước đó, nhóm đã tổng hợp được thành công dung dịch nano bạc sử dụng dịch chiết lá Tràu và lá Trứng cá. Đề tài này tiếp tục đánh giá hiệu quả kháng khuẩn, kháng nấm của chúng, nhằm hoàn thiện hồ sơ khoa học, đưa các dung dịch ứng dụng vào các sản phẩm thực tế.

### 2. THỰC NGHIỆM

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dung dịch nano bạc từ dịch chiết lá Tràu và dịch chiết lá Trứng cá trong nghiên cứu trước đó của Cao Văn Dư và cộng sự (2020) [3] với các thông số kỹ thuật trong Bảng 1.

Received: December 18<sup>th</sup>, 2020

Accepted: January 15<sup>th</sup>, 2022

\*Corresponding Author

Email: hoangthuan08@gmail.com

**Bảng 1.** Các dung dịch nano bạc từ dịch chiết dược liệu

| Điều kiện tổng hợp   | Nano Trầu      | Nano Trứng cá  |
|----------------------|----------------|----------------|
| Dịch chiết 1% (g/ml) | 1 ml           | 1 ml           |
| AgNO <sub>3</sub>    | 9 ml dd 0,02 M | 4 ml dd 0,03 M |
| PVP 1%               | 45 ml          | 20 ml          |
| Acid ascorbic 0,01 M | 0,25 ml        | --             |
| Thời gian phản ứng   | 30 phút        | 30 phút        |
| Nhiệt độ phản ứng    | 60 °C          | 35 °C          |
| Nồng độ nano bạc     | 351 mg/L       | 518 mg/L       |
| Kích thước nano bạc  | 20 ± 3         | 11 ± 5         |
| Bước sóng hấp thụ    | 423 nm         | 427 nm         |
| Hình dạng hạt nano   | Tựa cầu        | Tựa cầu        |

## 2.2 Xác định hoạt tính kháng khuẩn

### Chủng vi khuẩn

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Gram âm.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gram dương.
- *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram âm.
- *Candida albicans* ATCC 10231, nấm men.

Các chủng vi khuẩn được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Vi sinh, khoa Dược - Trường Đại học Lạc Hồng.

### Hóa chất thử nghiệm

- Môi trường Mueller- Hinton Agar (MHA, Merck – Đức).
- Môi trường Brain Heart Infusion (BHI, Merck – Đức).
- Penicillin G (1.000.000 IU, Mekorpar)
- Nước cất một lần.

### Nuôi cấy và hoạt hóa vi khuẩn

Vi khuẩn và nấm được cấy hoạt hóa trong môi trường lỏng BHI, ủ ở 37 °C (tủ ấm) trong vòng 24 giờ để dung dịch trong ống nghiệm có độ đục bằng độ đục Mc Farland 0,5 (giá trị OD tại bước sóng 600nm trong khoảng 0,08-0,1), tương đương với nồng độ 1-1,5×10<sup>8</sup> vi khuẩn/ml. Pha loãng 100 lần để được mẫu có nồng độ 1-1,5×10<sup>6</sup> vi khuẩn/ml cho các thử nghiệm. Lưu ý: mẫu vi khuẩn/nấm phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút sau khi pha loãng.

### Xác định hoạt tính kháng khuẩn/kháng nấm trong môi trường đặc

Hoạt tính kháng khuẩn/kháng nấm trong môi trường đặc được thực hiện theo phương pháp Kirby-Bauer cải tiến [4]. Vi khuẩn thử nghiệm được trải trên thạch MHA. Đục 4 giếng (a, b, c, d), mỗi giếng có đường kính 6 mm. Cho vào mỗi giếng 80 µL dung dịch:

- Giếng a: dung dịch nano bạc đậm đặc (D<sub>max</sub>)
- Giếng b: dung dịch nano bạc nồng độ 1/2 D<sub>max</sub>
- Giếng c: dung dịch nano bạc nồng độ 1/4 D<sub>max</sub>
- Giếng d: dịch chiết dược liệu (dùng để tổng hợp nano bạc) Ủ mẫu ở 37 °C, quan sát đường kính vòng vô khuẩn (không có vi khuẩn mọc) sau 24 giờ.

### Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được xác định theo phương pháp pha loãng trong ống nghiệm [5].

Cho vào các ống nghiệm (giống nhau về kích thước, thể tích) mẫu thử (nano bạc), mẫu đối chiếu (penicillin G) với nồng độ giảm dần như sau:

- Ống 1: 4 ml dung dịch đậm đặc (D<sub>max</sub>)
- Ống 2: 4 ml dung dịch pha loãng 1/2 D<sub>max</sub>
- Ống 3: 4 ml dung dịch pha loãng 1/3 D<sub>max</sub>

Ống 4: 4 ml dung dịch pha loãng 1/4 D<sub>max</sub>

Ống 5: 4 ml dung dịch pha loãng 1/5 D<sub>max</sub>

.....

Thêm tiếp 200 µL vi khuẩn/nấm thử nghiệm vào mỗi ống. Ủ ở 37 °C. Sau 24 giờ quan sát độ đục của các ống. Giá trị MIC được xác định là nồng độ thấp nhất ức chế sự phát triển của vi khuẩn (dung dịch bên trong ống không bị đục).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Hoạt tính kháng khuẩn trên môi trường đặc

Kết quả quan sát đường kính vòng vô khuẩn cho thấy: Mẫu nano bạc Trầu và nano bạc Trứng cá đều có khả năng ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn Gram dương, Gram âm và nấm thử nghiệm (Bảng 2). Ở nồng độ cao nhất (351 mg/L), nano bạc Trầu có đường kính vòng vô khuẩn trên *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* và nấm *C. albicans* lần lượt là 13 mm, 13 mm, 10 mm và 11 mm (Hình 1). Ở nồng độ cao nhất (518 mg/L), nano bạc Trứng cá có đường kính vòng vô khuẩn trên *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* và nấm *C. albicans* lần lượt là 16 mm, 14 mm, 13 mm và 11 mm (Hình 2). Các dung dịch nano bạc thử nghiệm đều có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất trên chủng *P. aeruginosa* và hoạt tính kháng khuẩn *S. aureus* mạnh hơn *E. coli*.

Tại các ô chứng âm (giếng d, chỉ chứa dịch chiết dược liệu) không có vòng vô khuẩn, cho thấy dịch chiết dược liệu tại nồng độ thử nghiệm chỉ đóng vai trò làm chất khử hóa và chất ổn định trong tổng hợp nano bạc [6], không đóng vai trò kháng khuẩn trong dung dịch. Hoạt tính kháng khuẩn được cho là hoàn toàn do các tiểu phân nano bạc hình thành trong dung dịch đảm nhiệm.

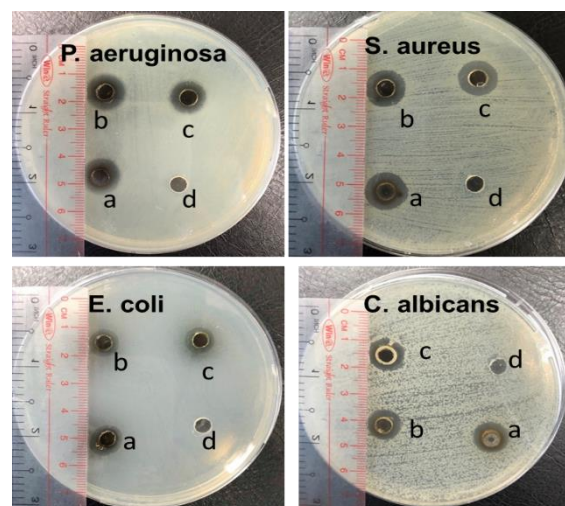
**Bảng 2.** Đường kính vòng vô khuẩn

| Vi khuẩn, nấm        | Đường kính nano Trầu (mm) (351 mg/mL) | Đường kính Nano Trứng cá (mm) (518 mg/mL) |
|----------------------|---------------------------------------|---|
| <i>P. aeruginosa</i> | 13*                                   | 16*                                       |
| <i>S. aureus</i>     | 13                                    | 14  |
| <i>E. coli</i>       | 10                                    | 13  |
| <i>C. albicans</i>   | 11                                    | 11  |

\*: hoạt tính mạnh nhất

**Hình 1.** Hoạt tính kháng khuẩn nano bạc Trầu

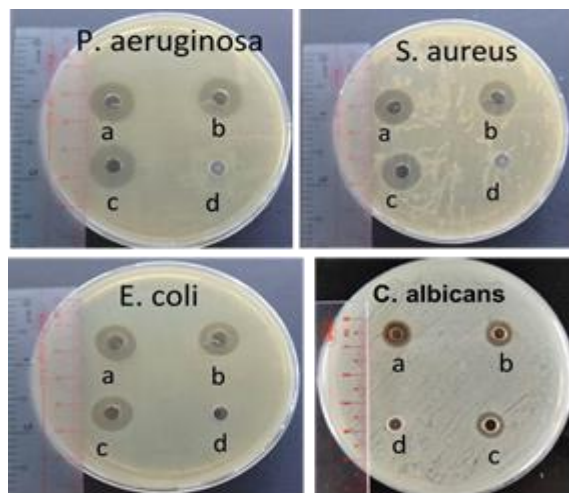
a: 351 mg/L, b: 175 mg/L, c: 88 mg/L, d: dịch chiết lá Trầu



Đường kính vòng vô khuẩn ít thay đổi khi nồng độ dung dịch nano bạc giảm mạnh còn 1/2 (giếng b) và 1/4 (giếng c) so với dung dịch mẹ (giếng a).

Mẫu nano Trứng cá có nồng độ cao hơn cho kết quả vòng vô khuẩn có đường kính lớn hơn mẫu nano Trà trên các chủng vi khuẩn tương ứng (Bảng 2).

**Hình 2.** Hoạt tính kháng khuẩn nano bạc Trứng cá  
a: 518 mg/L, b: 259 mg/L  
c: 130 mg/L, d: dịch chiết lá Trứng cá



### 3.5.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu

Kết quả thử nghiệm MIC thể hiện trong **Bảng 3**.

**Bảng 3.** Kết quả thử nghiệm MIC

| Vi khuẩn, nấm        | MIC nano Trà (mg/L) | MIC nano Trứng cá (mg/L) | MIC penicillin G (mg/L) |
|----------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | 70,2                | 25,9                     | 24.000                  |
| <i>S. aureus</i>     | 70,2                | 51,8                     | 0,3                     |
| <i>E. coli</i>       | 70,2                | 51,8                     | 6                       |
| <i>C.albicans</i>    | 70,2                | 51,8                     | 6                       |

So với penicillin G các mẫu nano bạc có hiệu lực kháng khuẩn thấp hơn ở các dòng *S. aureus*, *E. coli*, *C.albicans* nhưng lại có hiệu quả kháng khuẩn vượt trội ở trực khuẩn mũ xanh *P. aeruginosa*. So với mẫu nano Trà thì nano Trứng cá có MIC thấp hơn (hoạt tính mạnh hơn), có thể giải thích do kích thước hạt nano bạc Trứng cá ( $11 \pm 5$ ) nhỏ hơn so với nano Trà ( $20 \pm 3$ ), giúp các hạt nano bạc dễ xâm nhập vào bên trong tế bào vi khuẩn hơn, phù hợp với kết luận trong nghiên cứu trước đó của Tikam Chand Dakal và cộng sự (2016) [2].

Nhiều nhóm tác giả trên thế giới cũng đã có những nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc tổng hợp từ dịch chiết dược liệu. P. Shanmuga Praba và cộng sự (2014) nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc tổng hợp từ lá Trà (hạt nano có đỉnh hấp thụ UV vis ở 444 nm). Kết quả chỉ ra dung dịch có khả năng kháng *E. coli* và *S. aureus* với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 15 mm và 16 mm [7]. Mohd Azlan Ahmad và cộng sự

(2020) nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của nano bạc Trứng cá (kích thước hạt 22 – 37 nm) trên chủng *E. coli* cho kết quả vòng kháng khuẩn 10 mm [8]. Ở trong nước, nhóm nghiên cứu của Trần Vĩnh Hoàng (2012) đã khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc sử dụng chitosan làm chất khử/chất ổn định trên *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* và nấm *C. albicans* [9], tuy nhiên đến hiện tại chưa thấy có các công bố về thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của nano bạc từ dịch chiết lá Trứng cá và lá Trà ở Việt Nam.

## 4. KẾT LUẬN

Các dung dịch nano bạc tổng hợp từ dịch chiết lá Trà và dịch chiết lá Trứng cá có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm với các chủng *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* và *C. albicans*

## 5. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu là đề tài cấp cơ sở mã số (LHU-RF-MP-18-02-06). Cảm ơn Trường Đại học Lạc Hồng đã tạo điều kiện tốt nhất cho nhóm tác giả hoàn thành nghiên cứu này.

## 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Monalisha Rath; Swati S Panda; Nabin K Dhal. Synthesis of silver nano particles from plant extract and its application in cancer treatment: a review. *International journal of plant, animal and environmental sciences*. **2014**, 4 (3), 137-145.
- [2] Tikam Chand Dakal; Anu Kumar; Rita S. Majumdar; Vinod Yadav. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*. **2016**, volume 7, article 1831.
- [3] Cao Văn Dư và cộng sự. Tổng hợp xanh nano bạc từ dịch chiết dược liệu (Trà không, Trứng cá). *Tạp chí khoa học Lạc Hồng*. **2020**, số Tháng 3.
- [4] Gini George; Jeya Jothi. In vitro screening of antibacterial and antifungal activity of *Marsilea quadrifolia* (Marsileaceae) Linn. Extrac. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. **2015**, 3 (4), 313-329.
- [5] Ghodsieh Bagherzade. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2017**, 7 (3), 227-233.
- [6] Henry F. Aritonang; Harry Koleangan; Audy D. Wuntu. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of Medicinal Plants' (*Impatiens balsamina* and *Lantana camara*) Fresh Leaves and Analysis of Antimicrobial Activity. *International Journal of Microbiology*. **2019**, Article ID 8642303.
- [7] P. Shanmuga Praba. Synthesis of silver nano particles using *Piper betle* and its antibacterial activity. *European Chemical Bulletin*. **2014**, 3 (10), 1014-1016.
- [8] Mohd Azlan Ahmad. Green synthesis of silver nanoparticles using *Muntingia calabura* leaf extract and evaluation of antibacterial activities. *Platinum Open Access Journal*. **2020**, 10 (5), 6253-6261.
- [9] Trần Vĩnh Hoàng; Nguyễn Xuân Mạnh; Vương Thị Kim Oanh; Lê Thị Mai Hoa; Trần Đại Lâm. Nghiên cứu chế tạo và thử hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc sử dụng chitosan làm chất khử/chất ổn định. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. **2012**, 49 (6), 101-106.