

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của cao chiết quả Khổ qua rừng (*Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* ser.) thu hái ở tỉnh Bến Tre, Việt Nam

Võ Thị Bích Ngọc¹, Lê Thị Tường Vi², Trần Trung Trính¹,
Lý Hồng Hương Hạ¹ và Phạm Cảnh Em^{1*}

¹Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

²Bệnh viện Nhi đồng thành phố

TÓM TẮT

Khổ qua rừng (*Momordica charantia* var. *abbreviata* Ser.) là một nguồn giàu thành phần hoạt tính với nhiều chất chuyển hóa thứ cấp của flavonoid, alkaloid, saponin và steroid có hoạt tính kháng vi sinh vật. Nghiên cứu sử dụng chiết xuất hỗ trợ siêu âm như là một phương pháp chiết xuất xanh để tăng cường trích ly các hợp chất phenolic từ quả Khổ qua rừng. Kết quả cho thấy các cao chiết từ hai phương pháp thử nghiệm sử dụng dung môi methanol và ethanol với hỗ trợ của siêu âm đã cải thiện đáng kể hiệu suất chiết, hàm lượng phenolic tổng và hoạt tính kháng vi sinh vật so với phương pháp thông thường. Ngoài ra, các cao chiết này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm tốt chống lại 5 chủng vi khuẩn và 2 chủng nấm thử nghiệm với MIC = 64-256 µg/mL, đặc biệt là thể hiện tác dụng mạnh nhất trên hai chủng vi khuẩn gram âm *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa* với MIC lần lượt là 64 và 128-256 µg/mL. Hơn nữa, cao chiết methanol của quả chưa chín sử dụng phương pháp hỗ trợ siêu âm (U-M-MeOH) đã thể hiện hàm lượng phenolic tổng cao nhất cũng như thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm tốt nhất. Đây là cao chiết tiềm năng cho phát triển thuốc từ dược liệu có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm trong tương lai.

Từ khóa: Khổ qua rừng, hàm lượng phenolic, kháng khuẩn, kháng nấm

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng sinh là vũ khí quan trọng để chống lại các vi khuẩn gây bệnh. Tuy nhiên, việc lạm dụng kháng sinh đã dẫn tới tỷ lệ đề kháng kháng sinh ngày càng gia tăng và trở thành mối lo ngại hàng đầu trong lĩnh vực y tế của nhiều quốc gia [1]. Đề kháng kháng sinh được dự đoán sẽ là nguyên nhân của khoảng 10 triệu trường hợp tử vong hàng năm vào năm 2050 và gây thiệt hại trên 100 nghìn tỷ USD trên toàn thế giới [2]. Bên cạnh đó, đề kháng thuốc kháng nấm cũng diễn ra tương tự như đề kháng kháng sinh. Do đó, trước tình hình nguy cấp của đề kháng kháng sinh và đề kháng thuốc kháng nấm đòi hỏi phải nghiên cứu các tác nhân kháng khuẩn, kháng nấm mới, đặc biệt các tác nhân có nguồn gốc từ nhiên nhiên.

Khổ qua rừng (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Seringe) thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae) hay còn gọi là mướp đắng rừng, một cây leo mọc ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Khổ qua rừng theo

quan niệm của Đông y có tính hàn, vị đắng mà không gây độc. Do đó, khổ qua rừng có tác dụng tiêu độc, kháng viêm, thanh nhiệt, tiêu đờm và giảm ho. Các hoạt tính sinh học khác nhau của *M. charantia* đã được báo cáo như hạ đường huyết, kháng khuẩn, kháng virus, kháng ung thư, điều hòa miễn dịch, chống oxy hóa, tẩy giun sán, hạ sốt, chống đông máu, bảo vệ gan và chống viêm [3 - 5].

Quả Khổ qua rừng được sử dụng hàng ngày như một loại thực phẩm cũng như là một cây thuốc sử dụng theo truyền thống ở Đông Nam Á và một số nước khác. Quả Khổ qua rừng là nguồn dược liệu tiềm năng và được trồng ở nhiều tỉnh ở Việt Nam do dễ trồng và kỹ thuật chăm sóc đơn giản. Nguồn cung quả Khổ qua rừng có thể mở rộng nhanh và khả năng cung cấp lượng nguyên liệu lớn để làm thuốc. Các sản phẩm từ quả Khổ qua rừng được bán phổ biến ở Việt Nam bao gồm: quả sấy khô, bột quả và trà túi lọc. Trên thế giới, viên uống từ

Tác giả liên hệ: ThS. Phạm Cảnh em

Email: empc@hiu.vn

cao chiết quả Khổ qua rừng đã được sản xuất để giảm cân và ổn định đường huyết.

Một số nghiên cứu trên thế giới đã công bố cao chiết quả Khổ qua rừng được chiết bằng các dung môi khác nhau thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tiềm năng ở mức trung bình đến tốt trên nhiều chủng khuẩn như *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* và *Salmonella typhi* [6]. Trong khi đó, nghiên cứu về tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm của cao chiết quả Khổ qua rừng ở Việt Nam còn hạn chế, đặc biệt là chưa có nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cao chiết thu được từ phương pháp hiện đại với sự hỗ trợ của siêu âm. Do vậy, mục đích của nghiên cứu là đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cao chiết quả Khổ qua rừng được chiết bằng các dung môi khác nhau thông qua phương pháp thông thường và siêu âm.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng của nghiên cứu là cao chiết quả Khổ qua rừng (*Momordica charantia* Linn.) ở Việt Nam. Quả Khổ qua rừng được thu hái vào ngày 15/4/2023 tại tỉnh Bến Tre, Việt Nam. Mẫu quả chín (màu vàng, tuổi quả 30 ngày với hạt màu đỏ) và chưa chín (màu xanh, tuổi quả 16 - 22 ngày với hạt màu trắng hơi vàng) được rửa sạch bằng nước cất, để ráo nước, tách hạt và thái nhỏ. Sau đó, mẫu được sấy khô ở nhiệt độ phòng và nghiền thành bột mịn (khoảng 0.2 mm).

2.2. Chủng vi khuẩn và vi nấm

Chủng khuẩn sử dụng dòng vi khuẩn lưu trữ trong bộ sưu tập ATCC - Mỹ gồm: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, MRSA - Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 và MSSA - Methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Chủng nấm sử dụng dòng vi nấm lưu trữ trong bộ sưu tập ATCC - Mỹ gồm: *Candida albicans* ATCC 10231 và *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Điều kiện nuôi cấy: Môi trường tăng sinh sử dụng TSB (Tryptone Soya Broth), TSA (Tryptone Soya Agar) đối với vi khuẩn và SAB (Sabouraud dextrose agar) đối với vi nấm. Môi trường thử nghiệm sử dụng thạch Mueller - Hinton (MHA) và bổ sung 2% glucose đối với vi nấm *Candida albicans* và *Aspergillus niger*.

2.3. Hóa chất - Thuốc thử

Các hóa chất và môi trường sử dụng có nguồn gốc từ Merck (Đức) đạt tiêu chuẩn phân tích.

2.4. Trang thiết bị

Các thiết bị chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: bếp cách thủy Memmert (Đức), tủ sấy Memmert (Đức), máy đo quang GeneQuant 1300 (Mỹ), máy nghiền mẫu (FM-681 C, Hanil, Incheon, Korea), bể siêu âm Elma S120H (Đức), máy lắc quỹ đạo PSU-10i (Anh) và máy cô quay chân không Rotavapor® (Buchi Essen, Đức).

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Chiết cao bằng phương pháp thông thường

Mẫu bột khô của Khổ qua rừng được chiết trong dung môi ethanol 100% (v/v), ethanol 70% (v/v), methanol 100% (v/v) và methanol 70% (v/v) với tỷ lệ bột trên dung môi 1:10 (w/v) ở nhiệt độ phòng bằng máy lắc quỹ đạo (220 vòng/phút) trong 24 giờ.

2.5.2. Chiết cao bằng phương pháp siêu âm

Mẫu bột khô của Khổ qua rừng được chiết trong dung môi ethanol 100% (v/v), ethanol 70% (v/v), methanol 100% (v/v) và methanol 70% (v/v) với tỷ lệ bột trên dung môi 1:10 (w/v) ở nhiệt độ phòng với sự hỗ trợ của siêu âm trong 4 giờ.

2.5.3. Xử lý hỗn hợp sau chiết

Dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman® No.1 (Anh) và cô đuổi dung môi trong điều kiện áp suất giảm ở 40°C đến khô bằng máy cô quay chân không Buchi. Mẫu được lưu ở nhiệt độ 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.5.4. Hiệu suất chiết

Hiệu suất chiết được tính bằng công thức sau:

$$\text{Hiệu suất chiết (\%)} = \frac{\text{Khối lượng cao chiết khô (g)} \times 100}{\text{Khối lượng mẫu (g)}}$$

2.5.5. Thử nghiệm hóa thực vật

Các cao chiết khô của quả Khổ qua rừng được thử nghiệm để định tính các hợp chất phenol, alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid và triterpenoid theo phương pháp Ciuley cải tiến [7]. Các thử nghiệm này dựa trên quan sát trực quan về sự thay đổi màu sắc hoặc hình thành kết tủa sau khi thêm thuốc thử cụ thể.

2.5.6. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC)

TPC của cao chiết Khổ qua rừng được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu với acid gallic làm phenol chuẩn [8]. Dung dịch mẫu (1 mL với nồng độ 1 mg/100 mL) được trộn với 5 mL thuốc thử phenol của Folin-Ciocalteu (pha loãng 10 lần) và để yên trong 3 phút. Sau đó, 4 mL natri bicacbonat 7.5% (w/v) được thêm vào. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 765 nm. Kết quả được trình bày dưới dạng đương lượng mg acid gallic (GAE) trên g chất khô. TPC được tính bằng công thức như sau: $C = C_1 \times V/m$, trong đó C = hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE (đương lượng acid gallic)/g), C_1 = nồng độ acid gallic (mg/mL) được tính bằng phương trình đường chuẩn $y = 0.0078x + 0.1859$ ($R^2 = 0.9953$), V = thể tích cao chiết (mL) và m = khối lượng cao chiết (g). Các thử nghiệm xác định TPC được thực hiện lặp lại 3 lần.

2.5.7. Định tính hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Nghiên cứu định tính khả năng kháng khuẩn, kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trong thạch [9 - 10]. Pha chất thử với DMSO để có dung dịch với nồng độ là 10.24 mg/mL (kí hiệu: dung dịch S). Cấy vi khuẩn, vi nấm thử nghiệm trên môi trường thạch MHA. Đục lỗ đường kính 5 mm trong đĩa thạch bằng dụng cụ tiệt trùng. Dung dịch S được cho vào lỗ với thể tích khoảng 30 μ L. Tiến hành song song với một mẫu đối chứng DMSO (không có chất thử). Ủ hộp thạch trong tủ ấm 35 - 37°C trong 24 giờ đối với vi khuẩn và 48 giờ đối với vi nấm. Mẫu chứng chứa DMSO không ức chế sự phát triển của vi khuẩn, vi nấm. Dẫn chất có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm khi xung quanh lỗ (đường kính 6 mm) có vòng kháng khuẩn, kháng nấm lớn hơn 6 mm (tính cả đường kính lỗ).

2.5.8. Định lượng hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Nghiên cứu định lượng khả năng kháng khuẩn,

kháng nấm bằng phương pháp pha loãng trong thạch [9 - 10]. Mẫu đối chứng được chuẩn bị bằng cách cho 233.3 μ L chất thử từ dung dịch S vào 2.1 mL môi trường MHA (pha loãng 10 lần) đã để nguội ở 55°C, lắc đều rồi đổ hỗn hợp vào đĩa petri. Để nguội cho môi trường đông lại. Nếu có vết nước trên bề mặt, sấy đĩa thạch ở 50 - 70°C trong 10 phút. Vi khuẩn, vi nấm được pha loãng với nước muối sinh lý để đạt nồng độ 10^8 CFU/mL. Mỗi chất thử pha loãng 8 lần (tính từ dung dịch S) thu được 8 dung dịch hòa tan với môi trường MHA và cho vào 8 đĩa petri. Cho huyền dịch có vi khuẩn, vi nấm vào đĩa thạch đã pha chất thử ở những nồng độ khác nhau. Ủ hộp thạch trong tủ ấm ở nhiệt độ $\pm 37^\circ\text{C}$ trong 24 - 48 giờ đối với vi khuẩn và ở nhiệt độ $\pm 25^\circ\text{C}$ trong 48 giờ đối với vi nấm. Nồng độ nhỏ nhất mà vi khuẩn, vi nấm không phát triển được là nồng độ ức chế tối thiểu của chất thử (MIC). Dược chất ciprofloxacin (Sigma, Mỹ) được sử dụng làm chứng dương cho hoạt tính kháng khuẩn và dược chất ketoconazol (Himedia, Ấn Độ) được sử dụng làm chứng dương cho hoạt tính kháng nấm. Các thử nghiệm xác định MIC được thực hiện lặp lại 3 lần.

2.5.9. Phân tích thống kê

Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) được đánh giá thông qua phân tích phương sai một chiều (One-way ANOVA) bằng phần mềm SPSS 26.

3. KẾT QUẢ

3.1. Định tính nhóm hợp chất trong các cao chiết

Thành phần các nhóm hợp chất hiện diện trong các cao chiết quả Khổ qua rừng chín (R, ripen fruit) và chưa chín (M, mature fruit) được chiết bằng các alcol với nồng độ khác nhau 100% và 70% thông qua phương pháp thông thường (C, conventional method) và siêu âm (U, ultrasound-assisted method) được thể hiện trong Bảng 1 và 2.

Bảng 1. Thành phần hóa thực vật của cao quả Khổ qua rừng bằng phương pháp thông thường

STT	Nhóm hợp chất	Cao EtOH	Cao EtOH 70%	Cao MeOH	Cao MeOH 70%
1	Dẫn chất Phenol	+	+	+	+
2	Alkaloid	+	+	+	+
3	Flavonoid	+	+	+	+
4	Saponin	+	+	+	+
5	Tannin	-	-	+	+
6	Steroid	-	-	-	-
7	Triterpenoid	-	-	-	-

(+): dương tính, (-): âm tính, EtOH: ethanol, MeOH: methanol, nồng độ % được tính theo v/v (thể tích/thể tích), cao EtOH và cao MeOH: nồng độ alcol tương đương 100%

Bảng 2. Thành phần hóa thực vật của cao quả Khổ qua rừng bằng phương pháp siêu âm

STT	Nhóm hợp chất	Cao EtOH	Cao EtOH 70%	Cao MeOH	Cao MeOH 70%
1	Dẫn chất Phenol	+	+	+	+
2	Alkaloid	+	+	+	+
3	Flavonoid	+	+	+	+
4	Saponin	+	+	+	+
5	Tannin	+	+	+	+
6	Steroid	+	+	+	+
7	Triterpenoid	-	+	+	+

(+): dương tính, (-): âm tính, EtOH: ethanol, MeOH: methanol, nồng độ % được tính theo v/v (thể tích/thể tích), cao EtOH và cao MeOH: nồng độ alcol tương đương 100%

3.2. Hiệu suất chiết

Hiệu suất chiết của cao quả Khổ qua rừng với hai phương

pháp khác nhau siêu âm và thông thường trên 2 loại quả chưa chín và chín được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả hiệu suất chiết của cao quả Khổ qua rừng (%)

STT	Dung môi	C		U	
		M	R	M	R
1	EtOH 100%	8.07 ± 0.38	5.83 ± 0.65	26.12 ± 0.27*	17.97 ± 0.24*
2	EtOH 70%	11.44 ± 0.90	8.11 ± 0.78	34.48 ± 0.46*	26.50 ± 0.33*
3	MeOH 100%	9.94 ± 0.46	6.97 ± 0.52	27.98 ± 0.22*	18.74 ± 0.31*
4	MeOH 70%	12.78 ± 0.81	9.33 ± 0.89	33.60 ± 0.38*	29.09 ± 0.40*

EtOH: ethanol, MeOH: methanol, nồng độ % được tính theo v/v, C (conventional method): phương pháp thông thường, U (ultrasound-assisted method): phương pháp siêu âm, M (mature fruit): quả chưa chín/quả trưởng thành, R (ripen fruit): quả chín, * sự khác biệt đáng kể giữa phương pháp siêu âm và thông thường $p < 0.05$.

3.3. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC)

Hàm lượng TPC của cao chiết quả Khổ qua rừng ở

các phương pháp khác nhau, loại quả khác nhau và dung môi khác nhau được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) của cao quả Khổ qua rừng (mg GAE/g)

STT	Dung môi	C		U	
		M	R	M	R
1	EtOH 100%	7.57 ± 0.24	4.80 ± 0.18	18.31 ± 0.20*	15.24 ± 0.25*
2	EtOH 70%	6.28 ± 0.16	3.11 ± 0.13	16.44 ± 0.19*	13.93 ± 0.12*
3	MeOH 100%	8.31 ± 0.20	5.24 ± 0.25	19.65 ± 0.16*	16.55 ± 0.21*
4	MeOH 70%	6.44 ± 0.19	3.93 ± 0.12	17.01 ± 0.13*	14.89 ± 0.14*

EtOH: ethanol, MeOH: methanol, nồng độ % được tính theo v/v, C (conventional method): phương pháp thông thường, U (ultrasound-assisted method): phương pháp siêu âm, M (mature fruit): quả chưa chín/quả trưởng thành, R (ripen fruit): quả chín, * sự khác biệt đáng kể giữa phương pháp siêu âm và thông thường $p < 0.05$.

3.4. Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm

Nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn trên 5 chủng khuẩn (2 chủng Gram âm và 3 chủng Gram dương) với thuốc đối chứng dương là ciprofloxacin và hoạt tính kháng nấm trên 2 chủng nấm với thuốc

đối chứng dương là fluconazol. Kết quả định tính hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cao chiết quả Khổ qua rừng được thể hiện Bảng 5. Kết quả MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) của các cao chiết quả Khổ qua rừng được trình bày ở Bảng 6 và Hình 1.

Bảng 5. Kết quả định tính hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của cao chiết quả Khổ qua rừng

STT		Kháng khuẩn					Kháng nấm	
		EC	PA	SF	MSSA	MRSA	CA	AN
1	C-M-EtOH	+	+	+	+	+	+	+
2	C-M-EtOH70	+	+	+	+	-	-	-
3	C-M-MeOH	+	+	+	+	+	+	+
4	C-M-MeOH70	+	+	+	+	+	+	+
5	C-R-EtOH	+	+	-	-	-	-	-
6	C-R-EtOH70	+	+	-	-	-	-	-
7	C-R-MeOH	+	+	-	-	-	+	+
8	C-R-MeOH70	+	+	-	-	-	-	-
9	U-M-EtOH	+	+	+	+	+	+	+
10	U-M-EtOH70	+	+	+	+	+	+	+
11	U-M-MeOH	+	+	+	+	+	+	+
12	U-M-MeOH70	+	+	+	+	+	+	+
13	U-R-EtOH	+	+	+	+	+	+	+
14	U-R-EtOH70	+	+	+	+	+	+	+
15	U-R-MeOH	+	+	+	+	+	+	+
16	U-R-MeOH70	+	+	+	+	+	+	+

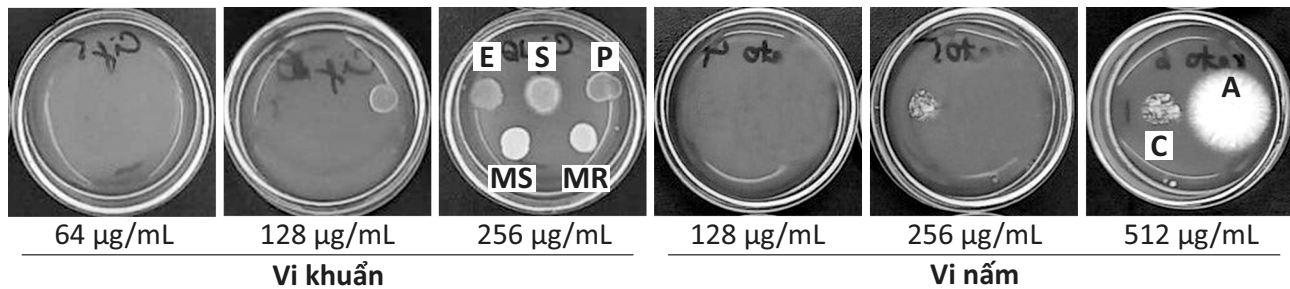
PA - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SF - *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, MRSA - Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, MSSA - Methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, CA - *Candida albicans* ATCC 10231, AN - *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Bảng 6. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của cao chiết quả Khổ qua rừng (MIC, µg/mL)

STT		Kháng khuẩn					Kháng nấm	
		EC	PA	SF	MSSA	MRSA	CA	AN
1	C-M-EtOH	256	256	1024	1024	1024	1024	1024
2	C-M-EtOH70	512	256	1024	1024	-	-	-
3	C-M-MeOH	256	256	1024	512	512	512	1024
4	C-M-MeOH70	512	256	1024	1024	1024	1024	1024
5	C-R-EtOH	1024	512	-	-	-	-	-
6	C-R-EtOH70	1024	512	-	-	-	-	-
7	C-R-MeOH	1024	512	-	-	-	1024	1024
8	C-R-MeOH70	1024	512	-	-	-	-	-
9	U-M-EtOH	256	64	256	256	256	128	256
10	U-M-EtOH70	256	128	512	512	512	512	512
11	U-M-MeOH	128	64	128	128	128	128	256
12	U-M-MeOH70	128	128	512	128	256	128	256
13	U-R-EtOH	128	128	512	512	512	512	512
14	U-R-EtOH70	256	128	512	512	1024	1024	1024
15	U-R-MeOH	128	128	256	512	256	512	512
16	U-R-MeOH70	256	128	512	512	512	512	512
17	Cipro	16	8	8	8	16	NT	NT
18	Flu	NT	NT	NT	NT	NT	4	256

NT: not tested (không thử nghiệm); -: MIC > 1024 µg/mL. EC - *Escherichia coli* ATCC 25922, PA - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SF - *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, MRSA - Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, MSSA - Methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, CA - *Candida albicans* ATCC 10231, AN - *Aspergillus niger* ATCC 16404. Cipro - Ciprofloxacin, Flu -

Fluconazol. MIC ($\mu\text{g/mL}$) $\pm 0.5 \mu\text{g/mL}$. EtOH: ethanol, MeOH: methanol, nồng độ % được tính theo v/v, C (conventional method): phương pháp thông thường, U (ultrasound-assisted method): phương pháp siêu âm, M (mature fruit): quả chưa chín/quả trưởng thành, R (ripen fruit): quả chín.



Hình 1. Kết quả MIC của cao chiết U-M-MeOH

(E - *Escherichia coli*, P - *Pseudomonas aeruginosa*, S - *Streptococcus faecalis*, MS - *Staphylococcus aureus*, MR - *Staphylococcus aureus* đề kháng methicylin (MRSA))

4. BÀN LUẬN

Thời gian chiết của phương pháp thông thường (24 giờ, nhiệt độ phòng) dài hơn 6 lần so với phương pháp chiết bằng siêu âm (4 giờ, nhiệt độ phòng). Thành phần hóa thực vật của cao chiết quả Khổ qua rừng chín (R) thể hiện sự tương đồng với cao chiết quả Khổ qua rừng chưa chín (M). Tuy nhiên, thành phần hóa thực vật trong cao chiết U đã thể hiện sự đa dạng hơn cao chiết C với sự hiện diện của cả tannin, steroid và triterpenoid. Với dung môi chiết MeOH và hỗ trợ siêu âm, cao chiết Khổ qua rừng chứa tất cả nhóm chất chính trong dược liệu như: Dẫn chất phenol, alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid và triterpenoid.

Mặc khác, kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất chiết của quả chưa chín cao hơn đáng kể so với quả chín, sử dụng dung môi MeOH có hiệu suất cao hơn đáng kể EtOH, đặc biệt là phương pháp siêu âm cao hơn khoảng 3 lần phương pháp thông thường ($p < 0.05$). Hiệu suất chiết cao nhất thể hiện ở dung môi MeOH 70% (v/v) với 33.60% ở quả chưa chín và 29.09% ở quả chín. Dung môi EtOH và MeOH ở nồng độ phần trăm thấp hơn đã thể hiện hiệu suất chiết tốt hơn. Điều này có thể là do sự hiện diện càng nhiều nước trong dung môi chiết sẽ tăng cường sự chiết các thành phần phân cực thân nước.

Tương tự như kết quả hiệu suất chiết, hàm lượng TPC của quả chưa chín cao hơn quả chín và phương pháp U cao hơn đáng kể phương pháp C khoảng 3 lần ($p < 0.05$). Tuy nhiên, hàm lượng TPC của dung môi EtOH và MeOH nồng độ thấp (70%) đã thể hiện thấp hơn dung môi chiết EtOH và MeOH nguyên chất. Hàm lượng TPC trên quả chưa chín M với phương pháp U với dung môi EtOH 100% và MeOH 100% cao nhất với giá trị lần lượt là 19.65 và 18.31 (mg GAE/g). Bên cạnh đó, dung môi MeOH 100% là dung môi chiết được nhiều TPC nhất ở cả quả chưa chín (19.65 mg GAE/g) và quả chín (16.55 mg GAE/g).

Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm là một trong những tác dụng sinh học quan trọng của dược liệu. Nồng độ cao nhất cho thử nghiệm xác định MIC là 1024 $\mu\text{g/mL}$. Đối với cả phương pháp thông thường và siêu âm, cao chiết quả chưa chín C-M và U-M đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm tốt hơn cao chiết quả chín C-R và U-R. Điều này có thể được giải thích thông qua hàm lượng TPC của cao C-M và U-M cao hơn 1.2-2.0 lần so với cao C-R và U-R. Hơn nữa, hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của cao chiết C thể hiện yếu hơn cao chiết U tương ứng ở từng loại quả và từng loại dung môi.

Đối với phương pháp chiết thông thường: tất cả cao chiết C đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn ở mức yếu-trung bình trên 2 chủng khuẩn Gram (-) *Escherichia coli* với MIC trong khoảng 256-1024 $\mu\text{g/mL}$ và *Pseudomonas aeruginosa* với MIC trong khoảng 256-512 $\mu\text{g/mL}$. Các cao chiết C-M-EtOH, C-M-MeOH và C-M-MeOH70 thể hiện tác dụng yếu trên 3 chủng khuẩn Gram (+) (*Streptococcus faecalis*, MRSA, MSSA) và 2 chủng nấm (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*) với MIC trong khoảng 512-1024 $\mu\text{g/mL}$, trong khi C-M-EtOH70 chỉ thể hiện tác dụng yếu 2 chủng khuẩn Gram (+) (*Streptococcus faecalis*, MSSA) với MIC = 1024 $\mu\text{g/mL}$ và không thể hiện tác dụng trên chủng khuẩn MRSA và 2 chủng nấm (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*) với MIC > 1024 $\mu\text{g/mL}$.

Đối với phương pháp chiết hỗ trợ siêu âm: tất cả cao chiết U đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm ở mức yếu đến tốt trên cả 5 chủng khuẩn và 2 chủng nấm thử nghiệm, trong đó hoạt tính tốt nhất thể hiện trên 2 chủng khuẩn Gram (-) *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa* với MIC trong khoảng 64-256 $\mu\text{g/mL}$.

Hoạt tính kháng khuẩn trên 3 chủng Gram (+) và kháng nấm trên 2 chủng nấm (MIC = 128-1024

$\mu\text{g}/\text{mL}$) thể hiện yếu hơn hoạt tính kháng khuẩn của 2 chủng khuẩn Gram (-). Kết quả này cho thấy ưu thế tác dụng trên chủng khuẩn Gram (-) của cao chiết quả Khổ qua rừng ở Việt Nam. Bên cạnh đó, cao chiết U-M-EtOH và U-M-MeOH thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm tốt nhất với MIC = 64-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ngoài ra, cao chiết U-M-EtOH và U-M-MeOH thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất trên chủng Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* với MIC = 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ khi so sánh với thuốc đối chiếu Ciprofloxacin (MIC = 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Trên các chủng khuẩn và chủng nấm còn lại, hai cao chiết U này cũng thể hiện hoạt tính tốt với MIC = 128-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, đặc biệt thể hiện hoạt tính kháng nấm tương đương với thuốc đối chiếu Fluconazol trên chủng *Aspergillus niger* (MIC = 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Đây là hai cao chiết rất tiềm năng để phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị nhiễm khuẩn và nhiễm nấm từ dược liệu Khổ qua rừng ở Việt Nam.

So sánh với các nghiên cứu tương tự khác, Nguyễn Thị Hồng Yến và Nguyễn Việt Khấn đã chứng minh cao Khổ qua rừng (*Momordica charantia*) với dung môi chiết MeOH-CHCl₃ có tác dụng kháng khuẩn trên cả 4 chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp gồm *Streptococcus* nhóm D, *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn trong khoảng 14-17 mm [11]. Cao MeOH thô của quả *M. charantia* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên chủng *S. aureus* với MIC = 125 mg/mL [12]. Cao chiết EtOH 60% của Khổ qua cũng được ghi nhận có hoạt tính kháng khuẩn trên chủng *Staphylococcus epidermidis* và *Escherichia coli* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 7.0 và 5.3 mm [13]. Bên cạnh đó, cao chiết thô MeOH từ quả Khổ qua thể hiện phổ kháng khuẩn rộng thông qua ức chế nhiều chủng vi sinh vật thử nghiệm (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* và *Salmonella typhi*). Hơn nữa, cao chiết MeOH 80% và MeOH 100% của quả chưa trưởng thành (quả non) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đầy hứa hẹn với đường kính vòng kháng khuẩn $>18.5 \pm 0.21$ mm trên chủng khuẩn *Staphylococcus aureus*, trong khi cao chiết MeOH

80% của quả trưởng thành (M) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tiềm năng với đường kính vòng kháng khuẩn 18.4 ± 0.17 mm trên chủng *Escherichia coli* [6]. Nghiên cứu hiện tại cũng cho thấy kết quả tương đồng. Nghiên cứu đã sử dụng dung môi EtOH 70% và MeOH 70% để chiết với mục đích vừa đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của các cao chiết quả Khổ qua rừng này so sánh với dung môi MeOH và EtOH nguyên chất vừa thể hiện tính mới khi các nghiên cứu tham khảo chưa thực hiện ở nồng độ alcol 70%. Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết quả Khổ qua rừng ở Việt Nam thể hiện ưu thế trên chủng Gram (-) cũng là một đặc tính nổi trội do không nhiều dược liệu thể hiện đặc tính này. Tóm lại, kết quả nghiên cứu đã chứng minh rằng quả chưa chín của Khổ qua rừng được chiết xuất trong MeOH nguyên chất có thể là một loại thuốc từ dược liệu với hoạt tính kháng khuẩn rất tiềm năng. Đặc biệt với phương pháp chiết hỗ trợ siêu âm, cao Khổ qua rừng đã cải thể hiện đáng kể hàm lượng TPC cũng như tiềm năng cho hoạt tính kháng vi sinh vật.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tiến hành định tính thành phần hóa học, xác định hiệu suất chiết, định lượng polyphenol tổng và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của cao chiết quả Khổ qua rừng ở Việt Nam. Các thông số: phương pháp chiết (thông thường và siêu âm), dung môi chiết (ethanol 100%, ethanol 70%, methanol 100% và methanol 70%) và loại quả (chín và chưa chín) đã được khảo sát để xác định cao chiết tối ưu. Kết quả cho thấy phương pháp siêu âm đã cải thiện đáng kể các thành phần hoạt tính trong cao chiết, hiệu suất chiết, hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính sinh học của cao chiết Khổ qua rừng. Ngoài ra, dung môi chiết MeOH và quả Khổ qua rừng chưa chín cho cao chiết có lượng polyphenol tổng cao nhất và hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm tốt nhất.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC16.15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. A. R. Naqvi, S. M. A. Shah, L. Kanwal, M. Saeed, Atta-Ul-Haq, J. Nisar, Z. Nisar and M. Akram, "Antimicrobial and antihypercholesterolemic activities of *Pulicaria gnaphalodes*," *Dose Response*, vol. 18, no. 1, p. 1559325820904858, 2020.
- [2] O'Neill, "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations," The review on

antimicrobial resistance, London: AMR, 2016.

- [3] S. Jia, M. Shen, F. Zhang and J. Xie, "Recent Advances in *Momordica charantia*: Functional components and biological activities," *Int J Mol Sci*, vol 18, p. 2555, 2017.

- [4] F. Kraatz, I. A. Müller, C. Ryppa and A. Warnecke, "Prodrug strategies in anticancer chemotherapy,"

Chem Med Chem., vol 3, pp. 20-53, 2008.

[5] R. Kaur, K. Kapoor and H. Kaur, "Plants as a source of anticancer agents," *J Nat Prod Plant Resour.*, vol 1, pp. 119-124, 2011.

[6] S. A. R. Naqvi, S. Ali, T.A. Sherazi, A. Haq, M. Saeed, M. Sulman, M. Rizwan, S. Alkahtani and M. M. Abdel-Daim, "Antioxidant, antibacterial, and anticancer activities of bitter gourd fruit extracts at three different cultivation stages," *Journal of Chemistry*, vol. 2020, pp. 1-10, 2020.

[7] Trần Hùng, *Giáo trình Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Bộ môn Dược liệu - Khoa Dược: Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, tr. 25-49, 2014.

[8] K. Slinkard and V. L. Singleton, "Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 28, no. 1, pp. 49-55, 1977.

[9] P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Tenover, *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., ASM Press, Washington, 1995.

[10] P. C. Em, L. T. Tuong Vi and T. N. Tuyen, "Design,

synthesis, bio-evaluation, and *in silico* studies of some *N*-substituted 6-(chloro/nitro)-1*H*-benzimidazole derivatives as antimicrobial and anticancer agents," *RSC Adv.*, vol. 12, pp. 21621-21646, 2022. DOI: 10.1039/d2ra03491c.

[11] Nguyễn Thị Hồng Yến và Nguyễn Viết Khẩn, "Xác định hàm lượng charantin, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn *in-vitro* của quả mướp đắng (*Momordica charantia*) ở Thừa Thiên Huế," *Tạp chí Y Dược học - Trường Đại học Y Dược Huế*, số 21, tr. 99-104, 2014.

[12] N.D.H. Cheong, L.A. Zakaria and H. Yusof, "Qualitative phytochemical screening and antibacterial properties of *Momordica charantia* methanolic extract against selected bacterial strains," *Mal J Med Health Sci.*, vol. 18, pp. 154-161, 2022.

[13] D.A.C. Rasmi, L. Zulkifli and N. Ahadia, "Antimicrobial activity test of bitter melon (*Momordica charantia* L.) plant extract against *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* bacteria and *Candida albicans*," *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, vol. 9, no. 2, pp. 454-458, 2023.

Evaluation of antibacterial and antifungal activities of wild bitter gourd fruit extracts (*Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* ser.) Collected from Ben Tre province, Vietnam

Vo Thi Bich Ngoc, Le Thi Tuong Vi, Tran Trung Trinh,
Ly Hong Huong Ha and Pham Canh Em

ABSTRACT

Wild bitter melon fruit (*Momordica charantia* var. *abbreviata* Ser.) is a rich source of phytochemicals with a variety of secondary metabolites of flavonoids, alkaloids, saponins, and steroids that act as antimicrobial activity. The present study explores the use of ultrasonically assisted extraction as a green extraction methodology to enhance the extraction of phenolic compounds from wild bitter melon fruit. The results indicated that extraction using methanol and ethanol solvents with the ultrasound-assisted method significantly improved the extraction yield, the total phenolic content, and antimicrobial activity compared conventional method. In addition, these extracts showed good antibacterial and antifungal activities against tested five bacterial strains and two fungal strains with MIC = 64-256 µg/mL, specifically also experienced the strongest effects on two gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* with MIC values of 128-256 and 64 µg/mL, respectively. Furthermore, the methanol extract of mature fruit using the ultrasound-assisted method (U-M-MeOH) showed the highest total phenolic content as well as exhibited the best antibacterial and antifungal activities. This is a potential extract for the development of medicinal herbs with antibacterial and antifungal activities in the future.

Keywords: Wild bitter melon fruit, phenolic content, antibacterial, antifungal

Received: 20/07/2023

Revised: 23/08/2023

Accepted for publication: 28/08/2023