

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT CỎ SỮA LÁ LỚN (EUPHORBIA HIRTA L.)

Đến tòa soạn 3-10-2019

Lê Thị Bạch, Nguyễn Trọng Tuấn, Trần Chí Linh, Đồng Ngọc Bích Ngân,
Huỳnh Thị Ngọc Ánh, Huỳnh Thị Ngọc Hồng, Bùi Thị Bửu Huệ

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Lê Tiến Dũng

Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

INVESTIGATION OF BIOACTIVITIES FROM EUPHORBIA HIRTA L. EXTRACT

This study aimed to evaluate antioxidant and antibacterial activities of Euphorbia hirta L. extract. The results showed that the extract of Euphorbia hirta L. displayed good antioxidant activities using DPPH, ABTS⁺ methods. In addition, this extract gave moderate antibacterial effect against three bacterial strains including Aeromonas dhakensis, Aeromonas hydrophila and Vibrio parahaemolyticus causing diseases on aquaculture species. Total phenolic and total flavonoid contents were 140.85±4.72 mg GAE/g extract and 202.42±10.25 mg QE/g extract, respectively. These results indicated that Euphorbia hirta L. is a potentially medicinal plant containing lots of natural antioxidant and antibacterial compounds.

Keywords: antioxidant, antibacterial, Euphorbia hirta L.

1. GIỚI THIỆU

Cây Cỏ sữa lá lớn lá lớn (*Euphorbia hirta* L.) là loài cây mọc dại ở Việt Nam, sinh trưởng và phát triển ở nhiều vùng khí hậu và thổ nhưỡng khác nhau và có nhiều công năng chữa bệnh hiệu quả [1]. Một số nghiên cứu cho thấy, các cao chiết từ Cỏ sữa lá lớn có khả năng kháng viêm [2], kháng khuẩn [3] và kháng oxi hóa [4,5]. Ngoài ra, Cỏ sữa lá lớn còn chứa nhóm các hoạt chất sinh học bao gồm alkaloid, flavonoid, glycoside, tannin, phenol và terpenoid [5, 6]. Ngày nay, càng có nhiều mối quan tâm về các chất kháng oxi hóa có nguồn gốc từ thực vật có tác dụng ngăn chặn quá trình oxi hóa không mong muốn trong cơ thể. Hơn nữa, cây Cỏ sữa lá lớn được sử dụng nhiều trong dân gian để chữa bệnh cho tôm cá, tuy nhiên, chỉ dừng ở mức kinh nghiệm, chưa có phương pháp khoa học cụ thể. Những nghiên

cứu về khả năng kháng oxi hóa và kháng khuẩn của Cỏ sữa lá lớn chưa được quan tâm nhiều. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là xác định hoạt tính kháng oxi hóa và kháng khuẩn của cao chiết Cỏ sữa lá lớn, làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo của Cỏ sữa lá lớn đặc biệt là trong nuôi trồng thủy sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện

2.1.1 Vật liệu thí nghiệm: Cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.) thu hái ở thành phố Cần Thơ được định danh bởi TS. Đặng Minh Quân, trường Đại học Cần Thơ. Mẫu thực vật (EupH1032017) được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Hóa hữu cơ, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Các chủng vi khuẩn gây bệnh trên thủy sản sử dụng trong thử nghiệm: *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas*

hydrophila và *Vibrio parahaemolyticus* được cung cấp bởi Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 2, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

2.1.2. Thiết bị: Tủ cấy (Class II BSC, Esco, Indonesia), nồi hấp khử trùng autoclave (HVE-50, Hirayama, Nhật), máy ly tâm (Mikro 12-24, Hettich, Đức), máy đo quang phổ (Beckman Coulter 640B, Mỹ), máy cô quay chân không (Heidolph, Đức), máy đo quang phổ Jasco V-730 (Nhật).

2.1.3. Hóa chất: DPPH (2,2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl) (Wako, Japan), ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate), Vitamin C, Trolox, Acid gallic, Quercetin, BHA, $K_2S_2O_8$, Folin Ciocalteu, $K_3Fe(CN)_6$, Methanol (Merck), môi trường Luria-Bertani (LB), kháng sinh Vancomycin HCl, Ethanol 96%, DMSO (Wako).

2.2. Điều chế cao chiết

Cỏ sữa lá lớn sau khi thu về được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Mẫu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm trong ethanol 96%. Mẫu được ngâm 5 lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô quay đũa dung môi thu được cao tổng Cỏ sữa lá lớn [7].

2.3. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa

2.3.1. Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết Cỏ sữa lá lớn được xác định theo Tarbart J. và cộng sự (2009) đồng thời có hiệu chỉnh [8]. Hỗn hợp phản ứng gồm 40 μ L DPPH (1000 μ g/mL) và 960 μ L cao chiết Cỏ sữa lá lớn (ở các nồng độ: 3, 6, 9, 12, 15, 18 và 21 μ g/mL). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối với thời gian 30 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ của DPPH ở bước sóng 517 nm. Chất đối chứng dương được sử dụng là vitamin C. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập để đảm bảo tính chính xác.

2.3.2. Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do ABTS⁺

Khả năng loại bỏ gốc tự do ABTS⁺ được thực hiện theo Nenadis N. và cộng sự (2004) [9]. Dung dịch ABTS⁺ được chuẩn bị bằng cách

cho 2 mL dung dịch ABTS 7 mM vào 2 mL dung dịch $K_2S_2O_8$ 2.45 mM. Ủ dung dịch trong bóng tối 16 giờ, sau đó pha loãng bằng ethanol, điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734 nm có mật độ quang là 0.7 ± 0.05 . Tiến hành khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺ bằng cách cho 990 μ L ABTS⁺ vào 10 μ L cao chiết Cỏ sữa lá lớn (ở các nồng độ: 4, 8, 12, 16, 20, 24 và 28 μ g/mL). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 6 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm. Chất đối chứng dương được sử dụng là trolox. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập để đảm bảo tính chính xác.

2.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết Cỏ sữa lá lớn được xác định dựa trên sự hình thành vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch nhỏ cao chiết. Dịch vi khuẩn với mật độ 1.5×10^6 CFU/mL được trải đều trên bề mặt đĩa thạch Luria-Bertani (LB) với thể tích dịch khuẩn là 100 μ L. Tiến hành đục lỗ tạo giếng thạch và nhỏ vào giếng thạch 50 μ L cao chiết Cỏ sữa lá lớn ở các nồng độ 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 và 5.0 mg/mL. Đường kính vòng vô khuẩn được đo bằng thước đo đơn vị mm sau 24 giờ ủ mẫu ở nhiệt độ 30°C.

2.5. Định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần

2.5.1. Định lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp của Fu và cộng sự (2011) có hiệu chỉnh. Hàm lượng polyphenol tổng trong cao chiết Cỏ sữa lá lớn được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn acid gallic [10].

2.5.2. Phương pháp định lượng flavonoid toàn phần

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định theo Zhishen và cộng sự (1999) có hiệu chỉnh. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao chiết Cỏ sữa lá lớn được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin [11].

2.6. Thống kê phân tích số liệu

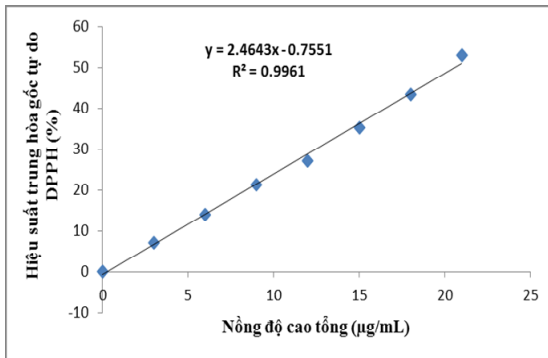
Số liệu được phân tích và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16. Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả về hoạt tính kháng oxy hóa

3.1.1. Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH

Kết quả cho thấy, hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH của cao chiết Cỏ sữa lá lớn tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết, khi nồng độ cao chiết tăng từ 3 µg/mL đến 21 µg/mL thì hiệu suất loại bỏ gốc tự do cũng tăng dần từ 7.16±0.47% đến 52.96±0.47% (Hình 1). Một kết quả nghiên cứu của Sharma và cộng sự [4] đã cho thấy cao chiết nước từ lá Cỏ sữa lá lớn thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* tốt, và đã được đánh giá theo phương pháp DPPH với giá trị IC₅₀ là 0.175 mg/mL. So với kết quả nghiên cứu của Abu Arra Basma và cộng sự [5], kết quả cho thấy khả năng kháng oxy hoá theo phương pháp DPPH của cao lá Cỏ sữa lá lớn cao nhất, với giá trị IC₅₀ của lá, hoa, rễ, thân và



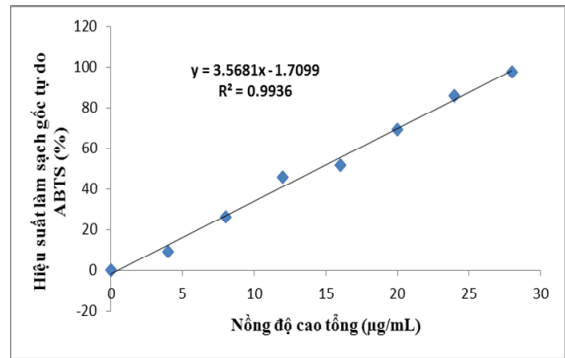
chất đối chứng BHT lần lượt là 0.803, 0.972, 0.989, 1.358 và 0.794 mg/mL. Trong khi đó kết quả nghiên cứu này cho thấy cao chiết Cỏ sữa lá lớn tại nồng độ 21 µg/mL đã có thể trung hòa được 52.96±0.47%.

3.1.2. Hiệu quả trung hòa gốc tự do ABTS•+

Kết quả cho thấy hiệu suất loại bỏ gốc tự do ABTS•+ của cao chiết Cỏ sữa lá lớn cũng tương tự như phương pháp DPPH. Khi nồng độ cao chiết tăng từ 4 µg/mL đến 28 µg/mL thì hiệu suất loại bỏ gốc tự do cũng tăng dần từ 9.27±1.71% đến 97.36±0.54% (Hình 1).

3.1.3. So sánh hiệu quả kháng oxy hóa của cao Cỏ sữa lá lớn với chất chuẩn

Giá trị IC₅₀ của cao chiết Cỏ sữa lá lớn so với chất chuẩn ở các phương pháp khác nhau được trình bày trong **Bảng 1**.



Hình 1. Đồ thị biểu thị hiệu suất làm sạch gốc tự do DPPH và ABTS⁺ của cao chiết

Bảng 1. Giá trị IC₅₀ của các phương pháp kháng oxy hóa

Mẫu thử	Phương pháp khảo sát (IC ₅₀ , µg/mL)	
	DPPH	ABTS
Cỏ sữa lá lớn	20.596 ^a ±0.164	14.492 ^a ±0.499
Vitamin C	3.660 ^b ±0.284	-
Trolox	-	2.896 ^b ±0.025

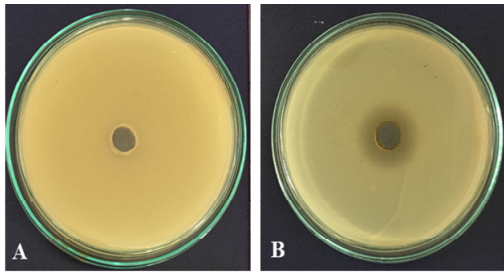
Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH, ABTS⁺ của cao chiết Cỏ sữa lá lớn được so sánh với chất chuẩn là vitamin C và trolox, tương ứng. Kết quả cho thấy khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và ABTS⁺ của cao chiết kém hơn vitamin C và trolox lần lượt là 5.63 lần và 5.0 lần. Tuy giá trị IC₅₀ của cao chiết đều cao hơn

so với vitamin C và trolox nhưng cũng đã thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa khá tốt của Cỏ sữa lá lớn thể hiện qua khả năng trung hòa gốc tự do DPPH, ABTS⁺.

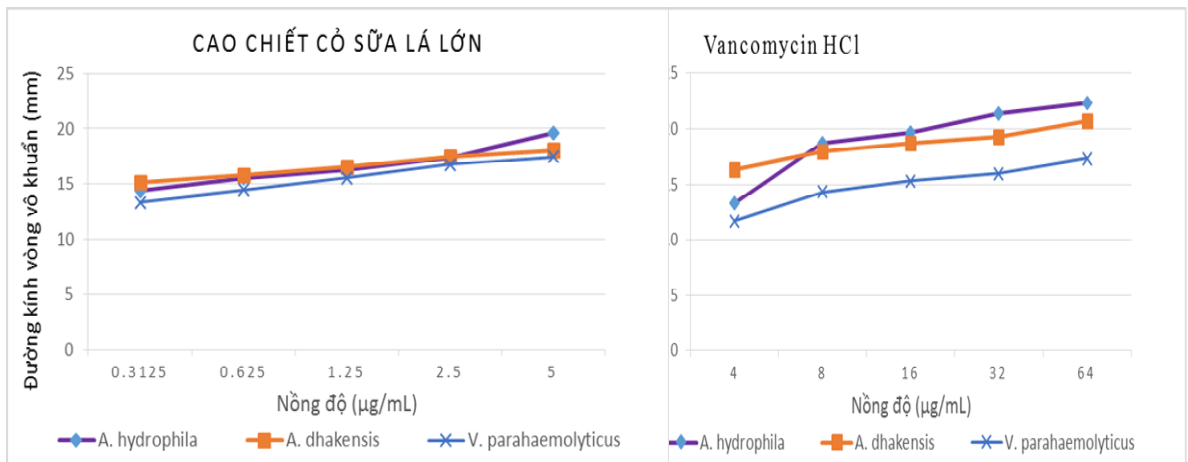
3.2. Kết quả về khả năng kháng khuẩn

Ảnh hưởng của DMSO 1% và cao chiết đến sự phát triển của vi khuẩn được trình bày ở **hình 2**. Kết quả cho thấy, DMSO 1% không có khả năng ức chế vi khuẩn thử nghiệm.



Hình 2. Ảnh hưởng của (A) DMSO 1% và (B) cao chiết lên sự phát triển của vi khuẩn *A. hydrophila*

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết Cỏ sữa lá lớn và kháng sinh Vancomycin HCl đối với ba chủng vi khuẩn: *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas hydrophila* và *Vibrio parahaemolyticus* được xác định dựa trên khả năng ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn thể hiện qua đường kính vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch tạo ra trên đĩa petri được trình bày ở Hình 3.



Hình 3. Đường kính vòng vô khuẩn của cao chiết và kháng sinh ở các nồng độ khác nhau

Kết quả trình bày ở hình 3 cho thấy cao chiết Cỏ sữa lá lớn có khả năng ức chế đối với cả ba chủng vi khuẩn. Khi nồng độ cao chiết càng tăng thì đường kính vòng vô khuẩn càng tăng. Đồng thời, sự thay đổi kích thước vòng vô khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nồng độ được khảo sát. Do đó, khi tăng nồng độ cao chiết Cỏ sữa lá lớn lên cao hơn có thể sẽ tạo ra các vòng vô khuẩn có đường kính còn lớn hơn nữa. Trong ba chủng vi khuẩn bị ức chế, cao chiết Cỏ sữa lá lớn cho hiệu quả ức chế các vi khuẩn không chênh lệch nhau nhiều. Trong khi cao chiết Cỏ sữa lá lớn có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* cho đường kính vòng vô khuẩn tăng từ 14.37 ± 0.19 mm tại nồng độ 0.3125 mg/mL lên 19.60 ± 0.30 mm tại nồng độ 5 mg/mL thì kháng sinh Vancomycin HCl đã có thể ức chế chủng vi khuẩn này trong dãy nồng độ 4-64 µg/mL.

Trong một nghiên cứu của Shanmugapriya Perumala và các cộng sự [12] về hoạt tính kháng khuẩn của một số loại cao chiết Cỏ sữa lá lớn trên 10 chủng vi khuẩn thử nghiệm cho thấy cao chiết ethanol của Cỏ sữa lá lớn có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất đối với *Salmonella typhi* với giá trị MIC là 0.031 mg/ml. Năm 2011, Geeta Singh và Padma Kumar cho biết cao chiết từ thân có hoạt tính ức chế các chủng vi khuẩn kiểm định với giá trị MIC = 0.078 mg/mL đối với khuẩn *E. coli* và *P. mirabilis* và MIC = 0.039 mg/mL của các cao chiết từ rễ và quả trên khuẩn *P. mirabilis* [13]. Điều này có thể là do sự hiện diện của các nhóm hoạt chất sinh học như flavonoid, alkaloid, tannin, triterpenoid và glycoside có trong Cỏ sữa lá lớn [14].

3.4. Kết quả định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần

Hàm lượng polyphenol tổng của Cỏ sữa lá lớn là 140.85 ± 4.75 mgGAE/g cao chiết và hàm

lượng flavonoid toàn phần là 202.42±10.25 mg QE/g cao chiết. Một nghiên cứu của Nenadis N. và cộng sự (2004), cũng đã xác định hàm lượng polyphenol trong lá, hoa, rễ và thân của Cỏ sữa lá lớn lần lượt là 206.17±1.95; 117.08±3.10; 83.15±1.19 và 65.70±1.72 mg GAE/g cao [9]. Như vậy, kết quả nghiên cứu này đã khẳng định Cỏ sữa lá lớn có chứa hàm lượng polyphenol và flavonoid cao. Đây cũng có thể là lý do cao chiết Cỏ sữa lá lớn đã thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn tốt.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã cho thấy Cao chiết Cỏ sữa lá lớn thể hiện các hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn tốt. Sự biểu hiện các hoạt tính này có thể là do cao chiết có chứa nhiều hợp chất tự nhiên có tác dụng sinh học cao như polyphenol và flavonoid. Các nghiên cứu tiếp theo về thành phần hóa học của cao chiết đang được tiếp tục để xác định hợp chất gây ra hoạt tính trên.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn dự án AquaBioActive (giữa Đại học Cần Thơ và các trường Đại học ở Bỉ) đã tài trợ để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tập I, 219(649), 503-505.

[2] Sharma, N., et al., (2014). *Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of Euphorbia hirta ethanolic extract*. *Molecules*, 19(9), 14567-81.

[3] Singh, G. and P. Kumar, (2013). *Phytochemical study and screening for antimicrobial activity of flavonoids of Euphorbia hirta*. *Int J Appl Basic Med Res*, 3(2), 111-116.

[4] Sharma, N.K., S. Dey, and R. Prasad, (2007). *In vitro antioxidant potential evaluation of Euphorbia hirta L*. *Pharmacologyonline*, 1, 91-98.

[5] Basma, A.A., et al., (2011). *Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of Euphorbia hirta L*. *Asian*

Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(5), 386-390.

[6] Patil, S.B. and C. Magdum, (2011). *Phytochemical investigation and antitumour activity of Euphorbia hirta Linn*. *Eur J Exp Biol*, 1, 51-56.

[7] Nguyễn Kim Phi Phụng, (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

[8] Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2009). *Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests*. *Food Chemistry*, 113(4), 1226-1233.

[9] Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). *Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4669-4674.

[10] Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2011). *Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits*. *Food Chemistry*, 129(2), 345-350.

[11] Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.

[12] Perumal, S., Mahmud, R., Pillai, S., Lee, W. C., & Ramanathan, S. (2012). *Antimicrobial activity and cytotoxicity evaluation of Euphorbia hirta (L.) extracts from Malaysia*. *APCBEE Procedia*, 2, 80-85.

[13] Singh, G. and P. Kumar, (2013). *Phytochemical study and screening for antimicrobial activity of flavonoids of Euphorbia hirta*. *Int J Appl Basic Med Res*, 3(2), 111-116.

[14] Le Thi Bach, Le Tien Dung, Nguyen Quoc Chau Thanh, Nguyen Trong Tuan, Nguyen Thanh Phuong, Patrick Kestemont, Joëlle Quetin-Leclercq, and Bui Thi Buu Hue, (2018). *Antioxidative activity of some medicinal plants in the Mekong delta of Vietnam via protection of pancreatic MIN6 β -cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis*. *Journal of Analytical Sciences*, 23(2), 190-197.