

SỰ THUẦN CHỨNG VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CÂY TRÀU KHÔNG (*PIPER BETLE*) VÀ CÂY LỐT (*PIPER LOLOT*) Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Huỳnh Kim Diệu¹ và Nguyễn Thành Văn

ABSTRACT

Total 30 leaf samples of *Piper betle* and 30 leaf samples of *Piper lolot* cultivated in different places in the Mekong Delta provinces were collected. Their leaves were used for protein electrophoresis employing the SDS-PAGE method and testing the antibacterial susceptibilities expressed as minimum inhibitory concentrations (MIC) of eight selected bacteria strains *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda*. There were 13 different protein bands of these 30 *Piper betle* leaves and 15 different protein bands of *Piper lolot* leaves were discovered. Their protein bands were 3.33% and 63% polymorphic while the polymorphic individuals were 7.69 and 53%, and the phenotypic diversity value (H_o) = 3.84 và 1.3, the genetic diversity value H_{EP} = 0.79 and 0.18 and sum of the effective number alleles $SENA$ = 3.76 and 0.21. *Piper betle* had strong bacterial activity against tested bacteria (divided into 7 groups), especially against *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* (MIC=128-512 µg/ml). *Piper lolot* (divided into 3 groups) had weaker bacterial activity against tested bacteria, except against *Edwardsiella ictaluri* with MIC=256 µg/ml.

Keywords: *Piper betle*, *Piper lolot*, protein electrophoresis, minimum inhibitory concentration

Title: The genetic diversities and the antibacterial activity of *Piper betle* and *Piper lolot* in the Mekong Delta of Vietnamese

TÓM TẮT

Toàn bộ 30 mẫu lá Trầu Không từ 30 cây Trầu Không được thu thập ở 30 hộ dân thuộc tỉnh Kiên Giang và 30 mẫu Lót được thu thập từ tỉnh Đồng Tháp và thành phố Cần Thơ được điện di protein bằng phương pháp SDS-PAGE và thử hoạt tính kháng khuẩn (xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC) trên 8 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*. Kết quả cho thấy các mẫu lá Trầu Không có 13 và lá Lót có 15 dải băng protein khác nhau với lần lượt tỉ lệ cá thể đa hình là 7,69 và 53%, tỉ lệ băng protein đa hình 3,33 và 63%, chỉ số đa dạng về kiểu gen H_{EP} = 0,79 và 0,18 và số allele hiệu quả $SENA$ = 3,76 và 0,21, rõ nhất là chỉ số đa dạng về kiểu hình H_o = 3,84 và 1,3. Kết quả điện di cho thấy Trầu Không và Lót không thuần chủng, Trầu Không chia làm 11 dòng và Lót 5 dòng. Hoạt tính kháng khuẩn các dòng Trầu Không có khác nhau nhưng đều tác động tốt trên vi khuẩn thử nghiệm và chia làm 7 nhóm, tất cả các nhóm tác động rất mạnh trên *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* (MIC=128-512 µg/ml). Các dòng Lót chia là 3 nhóm, khả năng kháng khuẩn gần giống nhau và yếu, chỉ duy tác động rất mạnh trên *Edwardsiella ictaluri* (MIC= 256 µg/ml).

Từ khóa: cây Trầu Không, cây Lót, điện di protein, nồng độ ức chế tối thiểu

¹ Khoa NN & SHƯĐ, Trường Đại học Cần Thơ

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Lá Trầu Không (*Piper betle*) thường được dân gian sử dụng trị cảm, sốt nóng, nhức mỏi, chữa rắn cắn, chữa bệnh chàm mặt của trẻ em, vết thương nhiễm trùng có mủ sưng đau, hắc Lào, mề đay, ghê ngứa, sâu kiến đốt, bỏng, viêm quanh răng, dùng phòng trị bệnh viêm họng, bệnh bạch hầu; nước pha lá Trầu Không còn được dùng làm thuốc nhỏ mắt chữa viêm kết mạc, chữa viêm tai, trị đau bụng đầy hơi, tiêu chảy, nôn mửa; một số bệnh viện còn dùng lá Trầu Không nấu thành cao chữa bệnh viêm cận răng hiệu quả (Võ Văn Chi, 1991; Đỗ Tất Lợi, 2003; Đỗ Huy Bích *et al.*, 2004). Lá Lốt (*Piper lolot*); cũng giống Trầu Không cây Lốt đã được dân gian sử dụng nhiều trong trị nôn mửa, đau bụng, rối loạn tiêu hóa, tiêu chảy và cũng trị nhức răng, giải độc nấm và trị rắn cắn (Bùi Chí Hiếu, 1999). Hai cây Trầu không và Lá Lốt cùng họ Hồ tiêu Piperaceae và đã được sử dụng nhiều trong dân gian. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào cho biết sự thuần chủng của hai cây này. Để góp phần tìm hiểu về những cây thuốc này, nghiên cứu về sự thuần chủng của Trầu Không và Lốt được thực hiện. Mục đích từng bước chọn lọc ra những dòng có hoạt tính cao.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1 Vật liệu

- Lá Trầu Không: Mẫu thu tại tỉnh Kiên Giang
- Lá Lốt: Mẫu thu tại Lai vung, Lấp vò - tỉnh Đồng Tháp và Cần Thơ
- Sử dụng các chủng vi khuẩn:
 - + Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ viện Pasteur Tp Hồ Chí Minh: *Staphylococcus aureus* (Staph.), *Streptococcus faecalis* (Strep.), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (Pseu.), *Salmonella* spp. (*Sal.*), *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) và *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*).
 - + Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ khoa Thủy Sản (Trường Đại học Cần Thơ): *Edwardsiella ictaluri* (*E. ictaluri*)

2.2 Phương pháp thí nghiệm

2.2.1 Điện di protein

- 30 mẫu lá Trầu Không và 30 mẫu lá Lốt dùng điện di protein được thu từ 30 hộ dân khác nhau (cách khoảng 1 km).
- Điện di protein lá Trầu Không và Lá Lốt được tiến hành theo phương pháp SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Sự đa dạng về di truyền được đánh giá dựa trên những thông số H_o (đa dạng về kiểu hình), H_{EP} (đa dạng về kiểu gen) và SENA (tổng của số allele hiệu quả: sum of the effective number of alleles) (Hub and Ohnishi, 2002; Thanh *et al.*, 2003):

$$H_o = -\sum f_i \ln f_i, \quad H_{EP} = 1 - f_i^2, \quad SENA = (1/f_i^2 - 1)$$

Trong đó:

- f_i là tần số xuất hiện dãy băng protein i . Quy định tần số của những dãy băng protein được thấy bằng mắt thường, nếu có hiện diện cho điểm là 1, nếu không hiện diện cho điểm là 0.
- n là số dãy băng protein hiện diện.

- Nếu $H_o = 0$ chứng tỏ tính thuần chủng cao, nếu giá trị H_o lớn chứng tỏ có sự đa dạng về di truyền, tức cây không thuần chủng.
- H_{EP} biến thiên từ 0 đến 1, nếu trị số H_{EP} nhỏ chứng tỏ tính thuần chủng cao, nếu trị số H_{EP} lớn chứng tỏ có sự đa dạng về di truyền.
- SENA được tính toán dựa vào xác định số allele hiệu quả.
- Sự đa dạng về hình thái của cá thể hay của các dãy băng protein được ghi nhận khi sự biến đổi những dãy băng protein của nó $< 90\%$.

2.2.2 Thử hoạt tính kháng khuẩn

Các cây có sự khác biệt về dãy băng protein được trồng lại trong cùng điều kiện chăm sóc, dinh dưỡng. Sau khoảng 4 tháng, lá được hái thử hoạt tính kháng khuẩn.

- Lá Trầu Không và Lá Lốt được sấy khô và chiết ngấm kiệt với methanol, dịch chiết đem cô quay dưới áp suất thấp thu được cao thô, dùng thử hoạt tính kháng khuẩn MIC (minimum inhibitory concentration) (Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Viết Tựu, 1985).
- Dùng phương pháp pha loãng trong thạch để xác định MIC (Trương Công Quyền *et al.*, 1986; Từ Minh Koóng *et al.*, 2001).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự đa dạng về di truyền

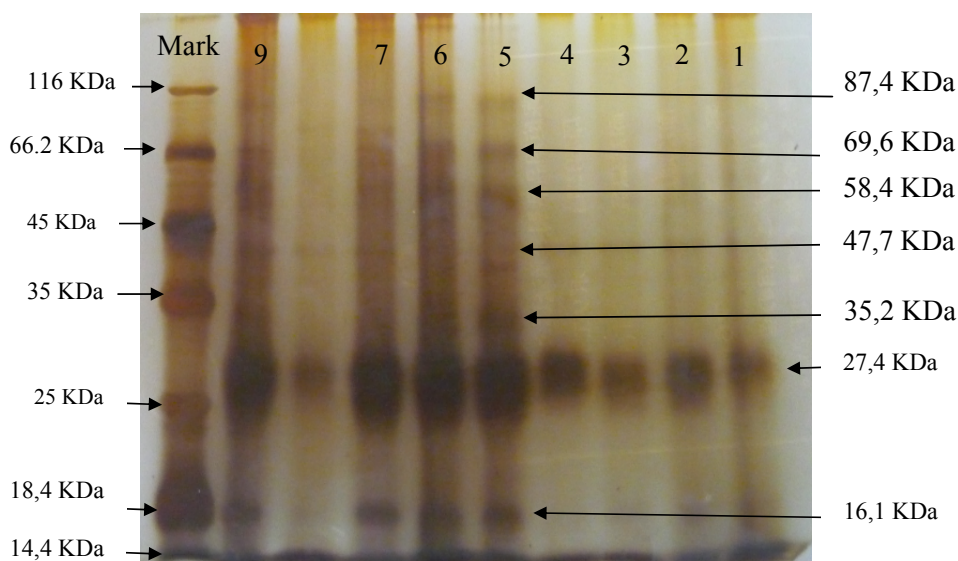
Trong 30 mẫu lá Trầu Không và 30 mẫu lá Lốt bằng phương pháp điện di protein SDS-PAGE phát hiện được lá Trầu Không có 13 dãy băng protein và lá Lốt có 15 dãy băng protein có sự khác biệt (Hình 1).

Bảng 1: Những thông số đa dạng về di truyền của cây Trầu Không và cây Lốt

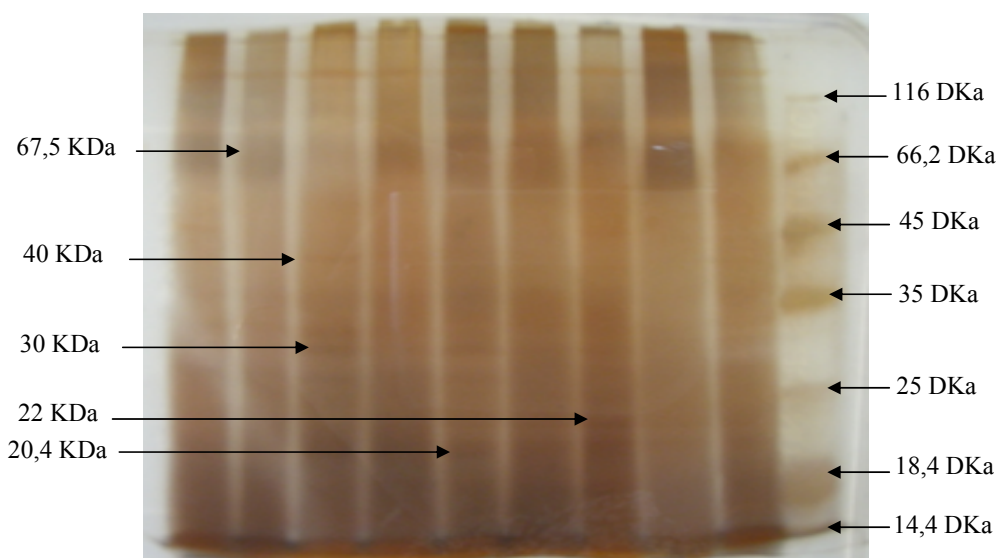
Thông số	Trầu không	Lốt
Cá thể đa hình (%)	7,69	53
Băng protein đa hình (%)	3,33	63
Đa dạng về kiểu hình H_o	3,84	1,3
Đa dạng về kiểu gen H_{EP}	0,79	0,18
SENA	3,76	0,21

Những thông số biểu thị sự đa dạng về di truyền của các lá Trầu Không và lá Lốt được trình bày qua bảng 1. Qua kết quả bảng 1 cho thấy các chỉ số đa dạng về kiểu gen H_{EP} của lá Trầu Không ($H_{EP} = 0,79$) cao hơn lá Lốt ($H_{EP} = 0,18$) và chỉ số đa dạng về kiểu hình ($H_o = 3,84$ và $1,3$) của lá Lốt cao hơn lá Trầu Không. Như vậy, cây Trầu Không và cây Lốt không thuần chủng mà gồm nhiều dòng (line).

Giá trị SENA biểu thị thông số allele có tác động trên mỗi locus của giống. Đối với giống thuần, giá trị SENA = 0, SENA càng lớn thì hiệu quả tác động càng lớn làm cho quần thể giống càng đa dạng. Kết quả phân tích cho thấy giá trị SENA trên cây Trầu Không (3,76) cao hơn cây Lốt (0,21), như vậy giá trị này đã góp phần cho thấy sự đa dạng dòng của cây Trầu Không cao hơn cây Lốt. Mặc dù tỉ lệ cá thể đa hình và tỉ lệ băng protein đa hình của lá Trầu Không (7,69% và 3,33%) thấp hơn lá Lốt (53% và 63%). Dựa vào kết quả điện di protein, cây Trầu Không được chia làm 11 dòng và cây Lốt được chia làm 5 dòng khác nhau.



Hình 1: Phổ điện di protein Trầu Không



Hình 2: Phổ điện di protein Lá lốt

Cây Trầu Không và cây Lốt được trồng bằng nhân giống vô tính (giâm cành), theo lý thuyết thì chúng phải thuần chủng, không có sự biến dị. Tuy nhiên, kết quả thu nhận được từ điện di protein cho thấy cấu trúc các dãy băng protein khác nhau và các thông số đa dạng về di truyền đã đánh giá được sự không thuần chủng của chúng. Như vậy khi được nhân giống qua nhiều đời cây Trầu Không và Lốt có thể có sự biến dị, có sự đa dạng về di truyền.

3.2 Thử hoạt tính kháng khuẩn

Các cây có sự khác biệt các dây băng protein, được trồng trong cùng điều kiện chăm sóc sau 4 tháng, lá các nhóm cây này được thử hoạt tính kháng khuẩn, kết quả được trình bày qua bảng 2 và bảng 3.

Bảng 2: Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với vi khuẩn của các dòng Lốt (MIC, µg/ml)

Dòng Lốt	Vi khuẩn							
	<i>Staph.</i>	<i>Strep.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseu.</i>	<i>Sal.</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. tarda</i>
1	4096	-	-	4096	-	4096	256	4096
2	-	-	-	4096	-	-	256	4096
3	4096	-	-	4096	-	4096	256	4096
4	-	-	-	4096	-	-	256	4096
5	4096	-	-	-	-	4096	256	2048

Ghi chú: -: MIC > 4096 µg/ml

Qua bảng 2, cho thấy khả năng tác động của các dòng lá Lốt trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm gần giống nhau và chia làm 3 nhóm (dòng 1 và 3; 2 và 4 như nhau; dòng 5) với MIC từ 256 µg/ml đến >4096 µg/ml, các dòng không tác động trên *Streptococcus faecalis*, *E. Coli* và *Salmonella*. spp (MIC > 4096 µg/ml), nhưng tất cả các dòng đều tác động rất mạnh trên *E. ictaluri* (MIC = 256 µg/ml), đây là một nguyên nhân gây bệnh gan thận mủ trên cá như: cá tra, cá trê, basa, cá nheo Mỹ,... bệnh thường xảy ra vào mùa mưa lũ kéo dài đến mùa khô (Bùi Quang Tề *et al.*, 2004) và đã kháng rất nhiều kháng sinh mạnh từ nhóm β-lactams đến nhóm Fluoroquinolones. *E. ictaluri* kháng với colistin (>90%), flumequin (8%), oxolinic acid (6%), streptomycin (83%), oxytetracyclin (81%) và trimethoprim (73%) (Từ Thanh Dung *et al.*, 2008).

Bảng 3: Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với vi khuẩn của các dòng Trầu Không (MIC, µg/ml)

Dòng Trầu không	Vi khuẩn							
	<i>Staph.</i>	<i>Strep.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseu.</i>	<i>Sal.</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. tarda</i>
1	256	512	512	256	512	512	512	256
2	512	2048	1024	512	1024	512	512	256
3	256	1024	512	256	512	512	256	128
4	256	1024	512	512	512	512	512	256
5	256	512	512	256	512	512	512	128
6	512	1024	1024	512	512	512	256	256
7	256	512	512	256	512	512	512	128
8	256	512	512	256	512	512	256	128
9	512	2048	1024	512	1024	512	512	256
10	512	2048	1024	512	1024	512	512	256
11	256	512	512	256	512	512	512	128

Kết quả bảng 3 cho thấy: hoạt tính kháng khuẩn của các dòng Trầu Không có thể chia làm 7 nhóm (trong đó dòng 5 giống dòng 6 và 7; dòng 2 giống dòng 9 và 10). Các dòng Trầu Không đều tác động tốt trên vi khuẩn thử nghiệm; tất cả tác động rất mạnh trên *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*

(MIC=256-512 µg/ml). Trong các dòng Trầu Không dòng 8 có hoạt phổ mạnh nhất, kế đến nhóm dòng 5, 6 và 7, rồi dòng 1. Kết quả này phù hợp với Đỗ Huy Bích *et al.* (2004) cho cao lá Trầu Không có hoạt tính ức chế *in vitro* các chủng vi khuẩn: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella*. spp, ...

Sự đa dạng về di truyền của cây Trầu Không và cây Lốt cũng ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của chúng với sự khác biệt chỉ số MIC.

Trầu Không và Lốt cùng họ và hình dạng giống nhau. Tuy nhiên, kết quả MIC đã cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của Trầu Không tốt hơn cây Lốt nhiều, chỉ trừ tác động trên *E. ictaluri* (Lốt với MIC=256 µg/ml).

Các vi khuẩn thử nghiệm *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus faecalis* là nhóm vi khuẩn gram dương gây viêm có mủ, viêm họng và *Pseudomonas aeruginosa* là trực khuẩn mủ xanh gây mưng mủ, viêm hoại tử, ở heo trưởng thành *Pseudomonas aeruginosa* còn tiết độc tố và nội độc tố gây viêm bàng quang, viêm âm đạo và viêm vú (Taylor, 1992). *Escherichia coli* là tác nhân chính gây tiêu chảy, *E. coli* là vi khuẩn có khả năng kháng thuốc nhanh nhất. Vi khuẩn *Salmonella* có thể gây bệnh đường ruột cho người, gia súc và gia cầm gọi là bệnh thương hàn, phó thương hàn, nhiễm trùng huyết và viêm ruột. *Aeromonas hydrophila* gây bệnh đốm đỏ; *Edwardsiella ictaluri* là nguyên nhân chính gây bệnh nhiễm trùng máu, bệnh gan thận mủ ở cá tra. *Edwardsiella tarda*, gây áp xe gan thận, gây bệnh trên tôm càng xanh (Quinn, 1994). *Edwardsiella tarda* còn lây nhiễm từ cá sang người gây tiêu chảy, viêm hệ thống niệu, viêm màng não, viêm nội tâm mạc, viêm dạ dày ruột, áp xe vòi trứng, áp xe vùng chậu; gây viêm dạ dày ruột, nhiễm khuẩn dạ dày và ruột. *Edwardsiella tarda* cũng là nguyên nhân gây viêm ruột già, áp xe ở gan và bệnh kiết lỵ ở người (Janda *et al.*, 1991).

Kết quả hoạt tính kháng khuẩn đã giải thích được tại sao cây Trầu Không được dân gian sử dụng sử dụng trị vết thương nhiễm trùng có mủ sưng đau, sâu kiến đốt, bỏng, viêm quanh răng, dùng phòng trị bệnh viêm họng, bệnh bạch hầu; chữa viêm kết mạc, chữa viêm tai, trị đau bụng đầy hơi, tiêu chảy, nôn mửa. Bên cạnh đây, kết quả nghiên cứu đã phát hiện ra khả năng trị được mầm bệnh thủy sản của lá Trầu Không và lá Lốt (đặc biệt trên *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*).

Thông qua Kết quả điện di protein đã giúp chọn lọc dòng Lốt và Trầu Không có hoạt tính kháng khuẩn cao. Các dòng có hoạt tính cao này hy vọng sẽ là tiềm năng thay thế kháng sinh trong tương lai.

4 KẾT LUẬN

Cây Lốt và Trầu Không đều không thuần chủng, chúng có nhiều dòng (Lốt 5 dòng và Trầu Không có 11 dòng) và các dòng này có sự khác biệt về hoạt tính kháng khuẩn, các dòng Lốt chỉ mạnh trên *Edwardsiella ictaluri*, các dòng Trầu Không hoạt tính kháng khuẩn rất mạnh, có triển vọng khai thác đại trà thay kháng sinh phòng trị nhiều bệnh cho gia súc lẫn động vật thủy sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Chí Hiếu (1999), *Dược lý trị liệu thuốc nam*, NXB Thanh niên.
- Bùi Quang Tề, Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Hữu Dũng và Nguyễn Thị Muội (2004), *Bệnh học thủy sản*, NXB Nông Nghiệp.
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mân, Đoàn Thị Thu, Nguyễn Tập và Trần Toàn (2004), *Cây Thuốc Và Động Vật Làm Thuốc Ở Việt Nam*, Tập II, NXB Khoa Học Và Kỹ Thuật.
- Đỗ Tất Lợi (2003), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội.
- Hub, M.K. and Ohnishi O. (2002), Genetic diversity and genetic population of wild radish revealed by AFLP, *Breeding Science*, 52:79-88.
- Janda, Michael J., Sharon L. Abbot, Susan Kroske-Bystrom, Wendy K. Cheung, Catherine Powers, Robert P. Kokka, and K. Tamura (1991), Pathogenic Properties of *Edwardsiella* Species, *Journal of Clinical Microbiology* September; 29(9): 1997-2001.
- Laemmli U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680 - 685.
- Nguyễn Văn Dân và Nguyễn Viết Tựu (1985), *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*, NXB Y học Tp Hồ Chí Minh.
- Quinn P. (2004), *Clinical veterinary microbiology*, Elsevier's Health Sciences Rights, Philadelphia, USA
- Taylor D.J. (1992), *Staphylococci*, in: *Disease of Swine* the seventh Edition, Leman Allen D., Straw Barbara E., Mengeling William L., D'Allaire Sylvie, Taylor David J. (1993), Iowa State University Press/ Ames, Iowa U.S.A.
- Thanh V.C., Nguyen T.N., Hirata Y. and Thuong N.V. (2003), Antenna protein diversity of prawns (*Macrobrachium*) in the MeKong Delta, *Biophere Conservation*, 5:11-17.
- Trương Công Quyền và cộng tác viên (1986), *Thực hành dược khoa*, NXB Y học.
- Từ Minh Koóng và cộng tác viên (2001), *Kỹ thuật sản xuất dược phẩm* Tập I, Trường Đại học Dược Hà Nội.
- Tu Thanh Dung, Freddy H., Nguyen A.T., Patric S., Margo B. and Annemie D. (2008), Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of Bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam, *Microbial drug resistance*, 14(4): 311-316.
- Võ Văn Chi (1999), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học.