

ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH THUẦN CHỦNG VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CÂY CỎ MỤC (*ECLIPTA PROSTRATE*) VÀ CÂY DIỆP HẠ CHÂU THÂN XANH (*PHYLLANTHUS NIRURI*) Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Huỳnh Kim Diệu¹ và Lê Thị Loan Em

ABSTRACT

Total 30 samples of *Phyllanthus niruri* and 30 samples of *Eclipta prostrata* cultivated in different provinces of Mekong delta were collected for protein electrophoresis employing the SDS-PAGE method and tested for the antibacterial susceptibilities expressed as minimum inhibitory concentrations (MIC) of eight selected bacteria strains *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* and *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda*. There were 8 lines of *Phyllanthus niruri* and 11 lines of *Eclipta prostrata* were discovered. Their protein bands were 0.11% and 0.1% polymorphic while the polymorphic individuals were 0.4% and 0.07%, the phenotypic diversity value (H_o) = 5.31 and 2.61, the genetic diversity value (H_{EP}) = 0.71 and 0.6 and sum of the effective number alleles $SENA = 2.42$ and 1.52 respectively. The antibacterial activity of *Phyllanthus niruri* was divided into 7 groups, all of them had the strong antibacterial activities against *Edwardsiella tarda* with MIC = 64-512 $\mu\text{g/ml}$ and *Aeromonas hydrophila* MIC=512-1024 $\mu\text{g/ml}$. *Eclipta prostrata* was divided into 3 groups and had strong antibacterial susceptibilities against *Edwardsiella tarda* (MIC=256-512 $\mu\text{g/ml}$), *Edwardsiella ictaluri* (MIC=512 $\mu\text{g/ml}$) and *Aeromonas hydrophila* (MIC=256-512 $\mu\text{g/ml}$).

Keywords: *Phyllanthus niruri*, *Eclipta prostrata*, protein electrophoresis, minimum inhibitory concentration

Title: Evaluation the genetic diversity and anti-bacterial activity of *Phyllanthus niruri* and *Eclipta prostrata* in the Mekong Delta

TÓM TẮT

30 mẫu Chó Đẻ Thân Xanh (CĐTX) và 30 mẫu Cỏ Mục thu thập ở nhiều tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long, 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.* và *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*. Kết quả cho thấy các mẫu CĐTX và Cỏ Mục có tỉ lệ cá thể đa hình lần lượt 0,11% và 0,1%, tỉ lệ băng protein đa hình 0,4% và 0,07%, và số allele hiệu quả $SENA = 2,42$ và 1,52, chỉ số chỉ đa dạng về kiểu gen $H_{EP} = 0,71$ và 0,6 và rõ nhất là đa dạng về kiểu hình $H_o = 5,31$ và 2,61. Cây CĐTX và Cỏ Mục không thuần chủng: CĐTX có 8 dòng và Cỏ Mục có 11 dòng. Hoạt tính kháng khuẩn của các dòng CĐTX và Cỏ Mục trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm không giống nhau. CĐTX chia 7 nhóm nhưng tất cả các dòng đều tác động rất mạnh trên *Edwardsiella tarda* (MIC = 64-512 $\mu\text{g/ml}$), kể đến *Aeromonas hydrophila* (MIC=512-1024 $\mu\text{g/ml}$); các dòng Cỏ Mục đều có khả năng tác động trên các vi khuẩn thử nghiệm và có thể chia làm 3 nhóm và đều tác động mạnh trên

¹ Khoa NN & SHƯĐ, Trường Đại học Cần Thơ

Edwardsiella tarda (MIC=256-512 µg/ml), kể đến *Edwardsiella ictaluri* (MIC=512 µg/ml) và *Aeromonas hydrophila* (MIC=256-512 µg/ml).

Từ khóa: chó Đẻ Thân Xanh, Cỏ Mực, điện di protein, nồng độ ức chế tối thiểu

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Cỏ Mực còn gọi là cây Nhọ Nồi, thường được dùng cầm máu bên trong và bên ngoài, chữa ho ra máu, lao phổi ỉ ra máu; cũng được dùng chữa ho, bông, chống viêm nhiễm trong các trường hợp cảm sốt, cúm, ban sởi, nhiễm khuẩn đường hô hấp, trĩ mụt nhọt, viêm cơ lỗ ngứa, đau mắt, sưng răng, đau dạ dày; điều trị nấm da, eczema, vết loét, viêm da; (Võ Văn Chi *et al.*, 1999). Cao lỏng lá Cỏ Mực đã được dùng điều trị bệnh nhân bị viêm âm đạo do tạp khuẩn, do nấm và do *Trichomonas*, và được cho có độc tính rất thấp, giới hạn an toàn rộng, cầm máu tốt, trong vài trường hợp cá biệt, tác dụng này của Cỏ Mực thể hiện rõ rệt hơn cả tác dụng của vitamin K (rõ rệt trong các trường hợp suy gan).

Bên cạnh đây, cây Chó đẻ thân xanh (CĐTX) cũng là cây mọc hoang như cây Cỏ Mực và cũng được dân gian sử dụng rất nhiều để bảo vệ gan, làm giảm mức độ xơ gan, sát khuẩn (đắp các vết thương sưng tấy và loét, mụt nhọt, lỗ ngứa ngoài da, trĩ ỉ, bệnh lậu), các bệnh của hệ niệu – sinh dục, và đái tháo đường. Thuốc có tác dụng lợi tiểu trị sỏi mật và sỏi thận, chống oxy hóa và độc tính thấp, có độ an toàn cao. CĐTX cũng có tác dụng gây hạ đường máu, hạ áp và lợi tiểu ở người (Đỗ Huy Bích *et al.*, 2004). Tác dụng nổi bật nhất của cây CĐTX là chữa suy gan; chứng viêm gan vàng da hay xơ gan cổ trướng (Trần Xuân Thuyết, 2003).

Hai cây thuốc này 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 cây Cỏ Mực và Chó đẻ thân xanh 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

- CĐTX và Cỏ Mực: sử dụng toàn cây (trừ rễ).
- Cây hoang dại được thu hái ở một số huyện thuộc tỉnh An Giang, Hậu Giang, Tiền Giang và Cần Thơ.
- Các chủng vi khuẩn được sử dụng:
 - +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* (Ed. tarda) và *Aeromonas hydrophila* (A. hydrophila).
 - +Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ khoa Thủy Sản (Đại học Cần Thơ): *Edwardsiella ictaluri*(Ed. ictaluri).

2.2 Phương pháp thí nghiệm

2.2.1 Điện di protein

- 30 mẫu CĐTX và 30 mẫu Cỏ Mực dùng điện di protein được thu từ 30 hộ dân khác nhau (cách nhau tối thiểu 1km).

- Điện di protein CĐTĐ và Cỏ Mực 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 alen 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 dây băng protein i . Qui định tần số của những dây 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 dây 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 dây băng protein được ghi nhận khi sự biến đổi những dây băng protein của nó $< 90\%$.

2.2.2 Thử hoạt tính kháng khuẩn

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

- CĐTĐ và Cỏ Mực được sấy khô, chiết bằng phương pháp ngâm dầm với methanol và loại bỏ dung môi bằng máy cô quay đến cạn, được cao thô, dùng thử hoạt tính kháng khuẩn MIC (minimum inhibitory concentration) (Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Việt Tự, 1985).
- Dùng phương pháp phương pháp 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 CĐTĐ và 30 mẫu Cỏ Mực bằng phương pháp điện di protein SDS-PAGE phát hiện được CĐTĐ có 18 dây băng protein và Cỏ Mực có 10 dây băng protein có sự khác biệt (Hình 1 và Hình 2).

Những thông số biểu thị sự đa dạng về di truyền của CĐTĐ và Cỏ Mực được trình bày qua Bảng 1. Qua kết quả Bảng 1 cho thấy tỉ lệ cá thể đa hình của CĐTĐ và Cỏ Mực lần lượt là 0,11% và 0,1%, tỉ lệ băng protein đa hình là 0,4% và 0,07%, và số allele hiệu quả $SENA = 2,42$ và $1,52$, rõ nhất là chỉ số chỉ đa dạng về kiểu gen $H_{EP} = 0,71$ và $0,6$ và đa dạng về kiểu hình $H_o = 5,31$ và $2,61$. Như vậy, cây CĐTĐ và Cỏ Mực không thuần chủng mà gồm nhiều dòng (line), nhưng cùng loài (species). Theo Rao *et al.* (1992), kết quả cấu trúc những dây băng protein giữa

các dòng trong cùng loài có khác biệt nhưng vẫn tiêu biểu cho mỗi loài và giữa các loài, khi điện di bằng SDS-PAGE sẽ cho các dãy băng protein khác nhau về số lượng lẫn trọng khối.

Dựa vào kết quả điện di protein cho thấy CĐTĐX có 8 dòng và Cỏ Mực được chia làm 11 dòng khác nhau.

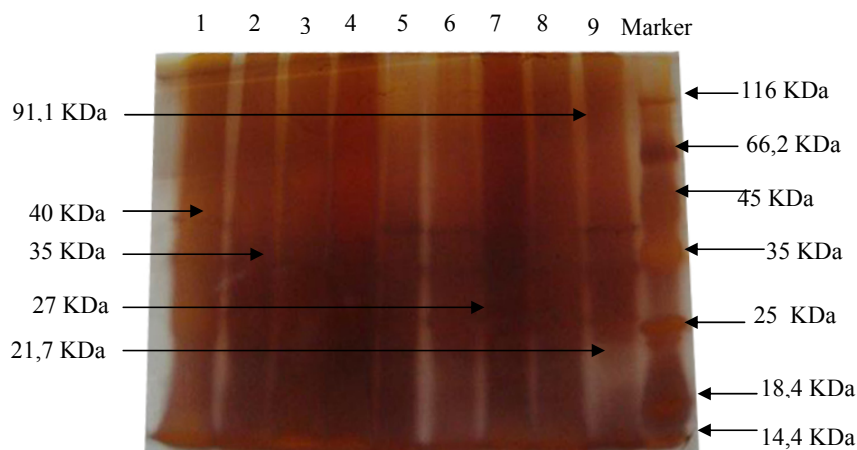
Cây CĐTĐX và Cỏ Mực là cây mọc hoang khắp nơi và có sự đa dạng về di truyền.

Cây CĐTĐX mọc hoang đại rất nhiều nơi, có hoa đơn tính, hoa đực và hoa cái trên cùng 1 cây, nhờ gió hoặc theo dòng nước mà có sự thụ phấn chéo tạo nên sự đa dạng giữa các dòng.

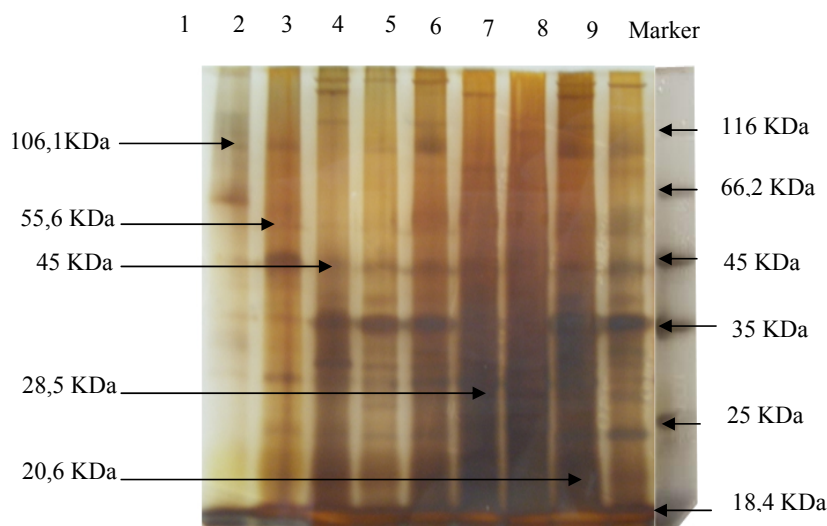
Cỏ Mực có hoa đơn hoặc lưỡng tính (hoa cái ở ngoài và hoa lưỡng tính ở giữa) mọc hoang đại nhiều nơi trong tự nhiên nên dễ dàng xảy ra hiện tượng thụ phấn chéo, vì thế Cỏ Mực có nhiều dòng.

Bảng 1: Những thông số đa dạng về di truyền của cây CĐTĐX và cây Cỏ Mực

Thông số	CĐTĐX	Cỏ Mực
Cá thể đa hình (%)	0,11	0,1
Băng protein đa hình (%)	0,4	0,07
Đa dạng về kiểu hình Ho	5,31	2,61
Đa dạng về kiểu gen H _{EP}	0,71	0,6
SENA	2,42	1,52



Hình 1: Phổ điện di protein Cỏ Mực



Hình 2: Phổ điện di protein của CDTX

3.2 Thử hoạt tính kháng khuẩn

Các cây có sự khác biệt các dải 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 CDTX (MIC, µg/ml)

Dòng CDTX	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	1024	4096	2048	1024	1024	512	2048	256
2	2048	4096	4096	1024	2048	512	1024	128
3	1024	4096	4096	2048	4096	512	1024	64
4	1024	4096	4096	1024	2048	1024	2048	256
5	1024	4096	4096	1024	2048	1024	2048	256
6	2048	4096	4096	1024	1024	512	2048	256
7	4096	4096	4096	4096	4096	1024	2048	512
8	2048	4096	4096	2048	2048	512	2048	256

Qua bảng 2, cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của các dòng CDTX trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm không giống nhau (chỉ có dòng 4 và 5 giống nhau), nhưng tất cả các dòng đều tác động rất mạnh trên *Edwardsiella tarda* (MIC = 64-512 µg/ml), kể đến *Aeromonas hydrophila* (MIC=512-1024 µg/ml) và cùng tác động yếu trên *Streptococcus faecalis* và *E. Coli* (MIC= 2048- 4096 µg/ml).

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

Dòng Cỏ Mực	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	2048	2048	4096	2048	4096	2048	512	256
2	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	512
3	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	512
4	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	256
5	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	256
6	2048	2048	4096	2048	4096	2048	512	256
7	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	256
8	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	256
9	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	256
10	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	256
11	1024	2048	2048	2048	2048	1024	512	256

Kết quả bảng 3 cho thấy các dòng Cỏ Mực đều có khả năng tác động trên các vi khuẩn thử nghiệm và có thể chia làm 3 nhóm (dòng 1 giống dòng 6; dòng 2 giống dòng 3; dòng 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 giống nhau). Các dòng Cỏ Mực đều tác động rất mạnh trên *Edwardsiella tarda* (MIC=256-512 µg/ml), kể đến *Edwardsiella ictaluri* (MIC=512 µg/ml), *Staphylococcus aureus* và *Aeromonas hydrophila* (MIC=1024-2048 µg/ml).

Sự đa dạng về di truyền của cây CĐTĐ và Cỏ Mực cũng ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của chúng với sự khác biệt chỉ số MIC. Kết quả điện di giúp chọn lọc dòng có hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên vi khuẩn thử nghiệm.

Theo kinh nghiệm dân gian đã sử dụng CĐTĐ để trị liên cầu, tụ cầu khuẩn vàng, trực khuẩn bạch hầu, (Đỗ Huy Bích et al., 2004); dùng Cỏ Mực phòng trị nhiễm khuẩn, làm chóng lành vết mổ trong phẫu thuật, tác dụng tốt trong nhiễm khuẩn đường hô hấp, trị mụn nhọt, viêm da, dùng ngoài làm thuốc sát trùng vết thương và vết loét ở gia súc. Như vậy kết quả MIC đã giải thích được sử dụng hiệu quả các cây CĐTĐ và Cỏ Mực trong trị bệnh của dân gian. Bên cạnh đây còn phát hiện các cây thuốc này có khả năng tác động rất tốt trên vi khuẩn gây bệnh trên cá là *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 vôi trứng, áp xe vùng chậu; gây nhiễm khuẩn dạ dày ruột, viêm ruột già, áp xe ở gan và bệnh kiết lỵ ở người (Janda et al., 1991). *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh nhiễm trùng máu, bệnh gan thận mủ ở cá tra và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh đốm đỏ trên cá. Các mầm bệnh này đã kháng rất nhiều kháng sinh mạnh và gây thiệt hại đáng kể cho các nhà nuôi trồng thủy sản (Tu Thanh Dung et al., 2008). Mặt khác, việc sử dụng kháng sinh điều trị đã gây chi phí cao và sự tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản ảnh hưởng đến sức khỏe con người, còn là rào cản các doanh nghiệp Việt Nam trong xuất khẩu. Do đó, phát hiện khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh trên cá của cây CĐTĐ và Cỏ Mực sẽ góp phần không nhỏ trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản.

Thông qua kết quả điện di protein cũng đã giúp chọn lọc dòng CĐT-X và Cỏ Mực 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

Chó đẻ thân xanh và Cỏ Mực đều không thuần chủng, chúng có nhiều dòng (Chó đẻ thân xanh 8 dòng và Cỏ Mực có 11 dòng) và các dòng này có sự khác biệt về hoạt tính kháng khuẩn, các dòng Chó đẻ thân xanh và Cỏ Mực đều có khả năng tác động trên vi khuẩn thử nghiệm, đặc biệt tác động rất mạnh trên vi khuẩn gây bệnh động vật thủy sinh (Chó đẻ thân xanh mạnh nhất trên *Edwardsiella tarda*, Cỏ Mực tác động mạnh nhất trên *Edwardsiella ictaluri*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 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 Mãn, 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.
- 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* 9th ser.
- Laemmli U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680 - 685.
- Nguyễn Văn Đàn 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.
- Rao R., Vaglio M.D., Paino D'Urzo M. and Monti L. (1992), Identification of *Vigna* spp. through specific seed storage polypeptides, *Euphytica* 62:39-43.
- Thanh V.C., Nguyen T.N., Hirata Y. and Thuong N.V. (2003), Antenna protein diversity of prawns (*Macrobrachium*) in the Mekong Delta, *Biosphere Conservation* 5:11-17.
- Trần Xuân Thuyết (2003), "Cây diệp hạ châu và bệnh gan", Tạp chí Sức Khỏe và Đời Sống, (9):12.
- Trương Công Quyền *et al.* (1986), *Thực hành dược khoa*, NXB Y học.
- Từ Minh Koóng *et al.* (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.