

# TÁC DỤNG ỨC CHẾ VI KHUẨN *IN VITRO* CỦA CAO KHÔ DỊCH CHIẾT LÁ TRẦU KHÔNG (*Piper betle*) ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Aeromonas* SPP. VÀ *Streptococcus agalactiae* GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ RÔ PHI

Trịnh Thị Trang<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thanh Hải<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email\*: tttrang@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 28.04.2016

Ngày chấp nhận: 06.06.2016

## TÓM TẮT

Việc sử dụng thuốc kháng sinh để điều trị bệnh thủy sản mang lại nhiều kết quả khả quan nhưng lại làm dấy lên lo ngại về việc tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản cũng như làm tăng tính kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh. Thảo dược đang ngày càng chứng minh được vai trò quan trọng của chúng trong nền công nghiệp dược phẩm như là một giải pháp an toàn sinh học, thay thế cho các thuốc hóa học tổng hợp. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm kiểm tra hiệu suất chiết lá cây trầu không (*Piper betle*) trong 5 loại dung môi có độ phân cực khác nhau (nước cất, methanol 80%, ethanol 96%, n-hexan và aceton 100%) đồng thời cũng đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của các cao khô dịch chiết từ lá cây trầu không đối với 2 loài vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi. Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất chiết xuất trong 5 loại dung môi biến đổi từ 4,00% (dung môi n-hexan) đến 19,67% (dung môi ethanol 96%). Ở nồng độ 100 mg/ml các cao khô dịch chiết đều có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt đối với 2 chủng vi khuẩn. Đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp., đường kính vòng vô khuẩn bình quân giao động từ 15,00mm (dung môi nước) đến 28,00mm (với dung môi là Ethanol 96%). Đối với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* đường kính vòng vô khuẩn bình quân giao động từ 17,67mm (dung môi nước) đến 31,67mm (với dung môi là ethanol 96%). Nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết lá trầu không sử dụng dung môi ethanol 96% khi bổ sung vào lỗ thạch vẫn quan sát thấy vòng vô khuẩn là 0,39 mg/ml đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và 0,78 mg/ml đối với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*.

Từ khóa: *Aeromonas* spp., bệnh xuất huyết, cao khô dịch chiết lá cây trầu không (*Piper betle*), cá rô phi, *Streptococcus agalactiae*, ức chế vi khuẩn.

## ***In vitro* Anti-Bacterial Effect of *Piper betle* Leaf Extracts on *Aeromonas* spp. and *Streptococcus agalactiae* which Cause Hemorrhagic Disease in Tilapia**

### ABSTRACT

The use of antibiotics for treating fish diseases has several advantages but raises the concerns about antibiotic residues in fishery products and increases antibiotic resistance of pathogenic bacteria as well. Herbs have been increasingly demonstrated their important role in the pharmaceutical industry as a biosafety solution, an alternative to synthetic chemical drugs. The present study aimed to examine the efficiency of leaf extraction from *Piper betle* by five different solvents (distilled water, methanol 80%, ethanol 96%, n-hexan and aceton 100%), and evaluate the anti-bacterial effects of the extract on *Aeromonas* spp. and *Streptococcus agalactiae* which cause hemorrhagic disease in tilapia. The results showed that the extraction efficiency varied from 4,00% (n-hexan solvent) to 19,67% (ethanol 96% solvent). At the concentration of 100 mg/ml, all these extracts showed good antibacterial activity against *Aeromonas* spp. and *Streptococcus agalactiae*. For *Aeromonas* spp., the inhibition zone varied from 15,00 mm (distilled water solvent - DW) to 28,00 mm (ethanol 96% solvent). The inhibition zones of *Streptococcus agalactiae* were varied from 17,67 mm (DW solvent) to 31,67 mm (ethanol 96% solvent). The ethanol-extract solution showed highest anti-

Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá trầu không (*Piper betle*) đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi

bacterial effect. This extract remained the anti-bacterial activity to *Aeromonas* spp. and *Streptococcus agalactiae* at concentration 0,39mg/ml and 0,78 mg/ml, respectively.

Keywords: *Aeromonas* spp., anti-bacterial effect, *Piper betle* leaf extract, *Streptococcus agalactiae*, tilapia.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, bệnh ở cá rô như bệnh lồi mắt, bệnh đen thân, nhất là bệnh xuất huyết do vi khuẩn gây ra đã gây nhiều thiệt hại cho các mô hình nuôi cá rô phi thâm canh. Bệnh do vi khuẩn xuất hiện quanh năm và tập trung nhiều trong các tháng mùa hè với tỉ lệ chết cao. Trong số các vi khuẩn gây bệnh xuất huyết ở cá, *Aeromonas* spp. là vi khuẩn đã được công bố nhiều nhất có khả năng gây bệnh trên nhiều loài cá nước ngọt trên khắp thế giới với dấu hiệu bệnh lý gồm nhiễm trùng máu, xuất huyết, lở loét (Austin and Adams, 1996). Bên cạnh đó, vi khuẩn *Streptococcus* sp. gây các triệu chứng tương tự cũng được phát hiện trên cá (Evans *et al.*, 2006, Đặng Thị Mai Thy và cs., 2012). Việc sử dụng thuốc, hóa chất đóng góp không nhỏ cho sự phát triển của việc nuôi cá rô phi nói riêng và ngành thủy sản nói chung. Tuy nhiên, việc sử dụng, buôn bán thuốc, hóa chất trong nuôi trồng thủy sản (NTTS) còn nhiều bất hợp lý do hiểu biết của người nuôi còn nhiều hạn chế và nhiều hoạt động của nhà sản xuất, nhà phân phối không tuân theo quy định của Nhà nước. Điều đó dẫn đến việc sử dụng không đúng các loại thuốc kháng sinh. Theo điều tra của Mai Văn Tài và cs. (2004), có tới 138 loại kháng sinh đã được sử dụng trong các loại hình nuôi và sản xuất giống thủy sản ở Việt Nam. Khi việc sử dụng kháng sinh quá mức, không được kiểm soát để trị bệnh cho cá, tôm thì tất yếu sẽ xảy ra vấn đề kháng thuốc của các chủng vi khuẩn gây bệnh và sự tác động đến sức khỏe con người. Nói cách khác, việc phòng và xử lý bệnh cho động vật thủy sản cũng như con người sau này sẽ gặp rất nhiều khó khăn.

Thảo dược đang ngày càng chứng minh được vai trò quan trọng của mình trong nền công nghiệp dược phẩm như là một giải pháp an toàn sinh học thay thế cho các thuốc hóa học tổng hợp. Tính đến năm 2010, có ít nhất 50 loại cây thảo dược đã được nghiên cứu ứng dụng

trong nuôi trồng thủy sản (Citarasu, 2010). Chiết xuất thảo dược đã được chứng minh chúng có tác dụng trên cả hai đối tượng tôm và cá nuôi với các vai trò như kích thích tăng trưởng (Chitra, 1995; Rani, 1999; Citarasu *et al.*, 1998; 2002); kích thích miễn dịch (Minomol, 2005; Sivaram *et al.*, 2004); kháng khuẩn và nhiều tác nhân truyền nhiễm (Immanuel *et al.*, 2004; Praseetha, 2005; Adiguzel *et al.*, 2005). Cây trầu không có tên khoa học là *Piper betle* thuộc họ hồ tiêu Piperaceae, phân bố ở vùng nhiệt đới, đặc biệt ở Đông Nam Á như Việt Nam, Malaysia, Indonesia và vùng nhiệt đới Châu Mỹ được sử dụng theo dân gian để chống viêm, sát trùng đường hô hấp cho người (Đỗ Tất Lợi, 2003; Shameem and Thiruma, 2013). Thành phần trong lá trầu không có chứa betel- phenol (đồng phân của eugenol) và chavicol kèm theo nhiều hợp chất phenolic khác, chúng có tác dụng kháng sinh rất mạnh đối với các loại vi khuẩn, nấm và kí sinh trùng (Võ Văn Chi, 2000; Đỗ Thị Hòa và cs., 2004). Hiện nay, khả năng kháng khuẩn của cây trầu không đã bước đầu được nghiên cứu đối với một số tác nhân gây bệnh trên động vật thủy sản (Huỳnh Kim Diệu và Nguyễn Thành Văn, 2011; Đặng Thị Lụa và cs., 2015). Trong nghiên cứu này, bên cạnh việc tìm ra dung môi tốt nhất để chiết và đánh giá hiệu suất chiết của các dung môi, tiềm năng kháng khuẩn *in vitro* của lá cây trầu không cũng được tiến hành trên hai loại vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Lá cây trầu không được thu hái ở Yên Mỹ, Hưng Yên. Thu lá bánh tẻ, lành lặn không bị sâu. Thu lá sạch vào những ngày khô ráo, khoảng từ 7 - 10 giờ sáng. Lá tươi thu hái về được rửa dưới vòi nước sạch (2 - 3 lần) rồi rửa lại với nước cất, sau đó được phơi khô trong bóng râm hoặc được sấy ở 40°C. Mẫu khô được nghiên

thành bột mịn (< 0,5mm). Bột lá trầu không (hơi thô, màu xanh, mùi đặc trưng) đựng trong túi nilon bảo quản trong bình hút ẩm. Mỗi loại dung môi được sử dụng để tách chiết 3 mẫu bột trầu không khác nhau.

Hai chủng vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* do Bộ môn Môi trường và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Các chủng này đã được phân lập và định danh từ cá rô phi bị bệnh xuất huyết ở Nam Sách, Hải Dương năm 2015.

- Môi trường Luria-Bertani dạng lỏng (LB) được hấp khử trùng trong các bình tam giác để nuôi cấy thu dịch khuẩn.

- Môi trường Luria-Bertani dạng đặc (LA) được hấp tiệt trùng, để nguội tới 40 - 50°C, đổ vào đĩa petri có đường kính 10cm, với độ dày là  $4 \pm 0,2$  mm.

## 2.2. Phương pháp

- *Thu dịch cao khô dịch chiết lá cây trầu không*: Bột lá trầu không được chiết với 5 dung môi có độ phân cực khác nhau (nước cất, methanol 80%, ethanol 96%, n-hexan và aceton 100%) bằng phương pháp ngâm chiết lạnh ở nhiệt độ phòng với cùng một tỷ lệ (20 g bột lá khô/200 ml dung môi), mỗi ngày được lắc đảo 2 lần. Sau 72 giờ, thu dịch chiết, lọc qua vải màn và giấy lọc (hiệu Whatman No. 1). Thu dịch chiết đem cô quay hút chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Khi khối lượng của bình cô quay không đổi đem cân để tính hiệu suất tách chiết của các dung môi. Cao cô toàn phần đã loại bỏ hết dung môi bảo quản trong tủ mát 4°C để tiến hành nghiên cứu. Bột trầu không được tách chiết lặp lại 3 lần ở mỗi loại dung môi. Hiệu suất tách chiết được tính theo công thức sau:

$$h (\%) = m_c / m_M \times 100$$

Trong đó: h (%) là hiệu suất chiết,  $m_c$  là khối lượng cặn khô (sau khi cô quay) (g),  $m_M$  là khối lượng mẫu bột trầu không khô (g)

- *Pha dịch chiết nồng độ 100 mg/ml*

Lấy 1g cao cô toàn phần pha với 10ml Dimethyl Sulfoxide (DMSO), dùng đũa thủy tinh khuấy tan hoàn toàn ta được dung dịch có nồng độ 100mg/ml.

- *Nuôi cấy vi khuẩn Aeromonas spp. và Streptococcus agalactiae*

Vi khuẩn được cấy vạch trên đĩa LA, trên đĩa petri ủ 28 - 30°C/24 giờ, để chọn khuẩn lạc đơn điển hình. Khuẩn lạc đơn được nuôi lỏng trong môi trường LB, đặt trong tủ bảo ôn ở nhiệt độ 28°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 12 - 14 giờ; thu dịch khuẩn (mật độ vi khuẩn đạt  $10^8$  tế bào/ml là đạt chuẩn).

- *Xác định mật độ vi khuẩn*

Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường lỏng được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng  $\lambda = 600$ nm.

- *Kiểm tra tác dụng diệt khuẩn của các dịch chiết bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch của Kirby-Bauer.*

Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Khi mật độ vi khuẩn đạt  $10^8$  tế bào/ml, lắc đều bình chứa vi khuẩn, dùng pipet man hút 100µl canh khuẩn nhỏ vào giữa đĩa thạch, dùng que thủy tinh tráng đều cho đến khi mặt thạch khô. Sau 15 phút đục lỗ trên mặt thạch với đường kính 6mm/lỗ đục cách nhau khoảng 25mm. Mỗi lỗ thạch, nhỏ 100µl dịch chiết, đặt đĩa vào tủ ấm ở 37°C/24 giờ đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn. Mỗi loại dịch chiết được thí nghiệm lặp lại 3 lần.

- *Pha loãng dịch chiết*

Chuẩn bị 10 ống nghiệm vô trùng, cho vào mỗi ống 5ml DMSO. Lấy 5ml mẫu dịch chiết (100 mg/ml) cho vào ống nghiệm thứ nhất, làm đồng đều, được độ pha loãng 2 lần ( $2^1$ ). Lấy 5ml dung dịch ở ống nghiệm  $2^1$  cho vào ống nghiệm thứ 2, được độ pha loãng 4 lần ( $2^2$ ). Tiếp tục thực hiện tương tự để được độ pha loãng tiếp theo:  $2^3, 2^4 \dots 2^n$ .

## 2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2007.

Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá trầu không (*Piper betle*) đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi

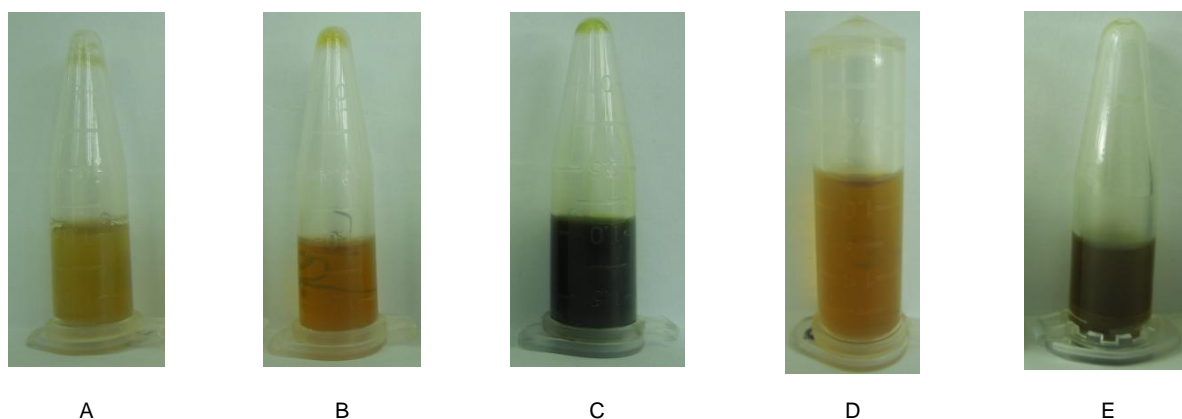
### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Hiệu suất chiết xuất các hoạt chất của lá cây trầu không bằng 5 dung môi khác nhau

Sau khi tiến hành ngâm bột lá cây trầu không trong 5 loại dung môi có độ phân cực khác nhau sau 72 giờ lọc sơ bộ qua vải màn và giấy lọc. Kết quả cho thấy, cùng một tỷ lệ pha loãng nhưng dịch chiết thu được từ các dung môi lại có các màu sắc khác nhau. Các dịch chiết lá cây trầu không thu được có màu sắc biến đổi từ vàng nhạt đến xanh đen. Khi sử dụng dung môi là nước, methanol 80% và n-hexan, dịch chiết thu được có màu vàng và nâu nhạt. Trong khi đó khi sử dụng dung môi ở nồng độ cao là ethanol 96% cho dịch chiết màu xanh đen và acetone 100% cho dịch chiết màu nâu (Hình 1).

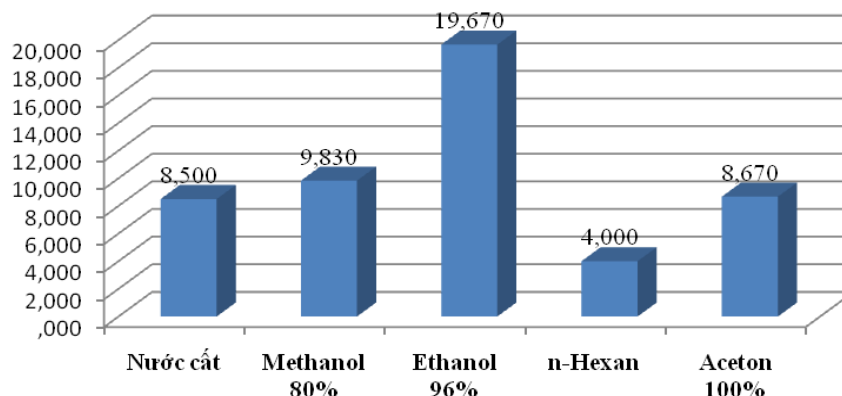
Qua màu sắc khác nhau của dịch chiết có thể sơ bộ nhận định rằng, các dung môi khác nhau có khả năng tách chiết các hoạt chất trong lá trầu không là khác nhau.

Tiến hành đánh giá hiệu suất tách chiết của cao khô dịch chiết lá trầu không qua 3 lần tách chiết cho thấy cùng một phương pháp chiết ngâm lạnh nhưng hiệu suất chiết xuất khi sử dụng các loại dung môi là khác nhau. Khối lượng cao khô dịch chiết lá trầu không từ 20g bột lá ban đầu, tùy thuộc vào từng loại dung môi có độ giao động khá lớn biến đổi từ 0,80g (dung môi n-hexan) đến 3,93g (dung môi ethanol 96%) tương đương với hiệu suất tách chiết đạt 4,00% đến 19,67% (Bảng 1, Hình 2). Như vậy, có thể nhận định rằng, các loại dung môi tách chiết khác nhau thì khả năng hòa tan các hợp chất trong thực vật khác nhau.



**Hình 1. Dịch chiết lá trầu không thu được từ các loại dung môi khác nhau**

Ghi chú: Dung môi sử dụng: A- nước cất; B- methanol 80%; C- ethanol 96%; D- n-hexan; E- acetone 100%



**Hình 2. Hiệu suất tách chiết lá cây trầu không sử dụng các dung môi khác nhau**

**Bảng 1. Khối lượng cao khô thu được của 20g bột lá trầu không trong 5 loại dung môi (g)**

Loại dung môi	Khối lượng cao khô
Nước cất	1,70 <sup>b</sup>
Methanol 80%	1,97 <sup>c</sup>
Ethanol 96%	3,93 <sup>d</sup>
n-hexan	0,80 <sup>a</sup>
Aceton 100%	1,73 <sup>b</sup>

Ghi chú: a, b, c, d trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê  $P < 0,05$

**Bảng 2. Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của các dịch chiết lá cây trầu không**

Cao khô dịch chiết sử dụng dung môi	Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn bình quân (mm)	
		<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Đ/c DMSO	0	0	0
Nước cất	100	15,00 <sup>a</sup> ± 1,00	17,67 <sup>a</sup> ± 1,53
Methanol 80%	100	24,00 <sup>c</sup> ± 1,00	29,33 <sup>c</sup> ± 0,58
Ethanol 96%	100	28,00 <sup>d</sup> ± 1,00	31,67 <sup>d</sup> ± 0,58
n-hexan	100	26,67 <sup>d</sup> ± 1,00	28,67 <sup>c</sup> ± 1,15
Aceton 100%	100	21,33 <sup>b</sup> ± 0,58	24,67 <sup>b</sup> ± 0,58

Ghi chú: a, b, c, d trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê  $P < 0,05$

Trong 5 loại dung môi sử dụng đa phần là dung môi phân cực, chỉ có n-hexan là dung môi không phân cực và lại cho hiệu suất chiết nhỏ nhất chỉ đạt 4,00%, do đó có thể sơ bộ khẳng định rằng các hoạt chất trong lá trầu không tan chủ yếu trong dung môi phân cực. Khi sử dụng dung môi nước (phân cực protic) cho hiệu suất tách chiết tương đương không có sự sai khác về mặt thống kê so với dung môi aceton (phân cực aprotic). Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng hòa tan các hoạt chất có trong lá trầu không không chỉ phụ thuộc vào độ phân cực của dung môi mà còn phụ thuộc vào bản chất của dung môi.

### 3.2. Khả năng ức chế *in vitro* vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* của các cao khô dịch chiết

Cao khô dịch chiết lá cây trầu không thu được từ thí nghiệm trên ở nồng độ 100 mg/ml, được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả thí nghiệm cho thấy cả 5 loại dịch chiết của lá cây trầu không trong các dung môi khác nhau đều có khả năng ức chế vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* (Bảng 2).

Đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp., đường kính vòng vô khuẩn bình quân dao động từ 15,00 mm (dung môi nước) đến 28,00 mm (với dung môi là ethanol 96%). Các cao khô dịch chiết lá trầu không trừ cao khô sử dụng dung môi là nước đều đạt độ mẫn cảm cao đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. với đường kính vòng vô khuẩn > 20 mm. Cao khô dịch chiết lá trầu không khi sử dụng dung môi là ethanol 96% cho khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt nhất. Cao khô dịch chiết lá trầu không sử dụng dung môi là ethanol 96% và n-hexan có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* là tương đương nhau, đường kính vòng vô khuẩn không có sự sai khác về mặt thống kê lần lượt là 28,00 ± 1,00 và 26,67 ± 1,00mm.

Đối với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* đường kính vòng vô khuẩn bình quân giao động từ 17,67 ± 1,53 mm (dung môi nước) đến 31,67 ± 0,58 mm (với dung môi là ethanol 96%). Tương tự như đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. Các cao khô dịch chiết lá trầu không trừ cao khô sử dụng dung môi là nước đều đạt độ mẫn cảm cao đối với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* với đường kính vòng vô khuẩn > 20 mm. Cao khô dịch chiết lá trầu không khi sử dụng dung môi là ethanol 96% cho khả năng ức chế vi khuẩn *Streptococcus agalactiae in vitro* tốt nhất với

Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá trầu không (*Piper betle*) đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi

đường kính vòng vô khuẩn có sự sai khác về mặt thống kê so với các cao dịch chiết khác. Cao khô dịch chiết lá trầu không sử dụng dung môi là methanol 80% và n-hexan có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* tương đương nhau, đường kính vòng vô khuẩn không có sự sai khác về mặt thống kê lần lượt là  $29,33 \pm 0,58$  mm và  $28,67 \pm 1,15$  mm.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã khẳng định khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của lá trầu không. Tarun *et al.* (2012) nhận thấy dịch chiết lá trầu không sử dụng dung môi ethanol, methanol có tác dụng diệt khuẩn rất tốt đối với vi khuẩn *E. coli*. Đỗ Huy Bích và cs. (2004) khẳng định, cao lá trầu không có hoạt tính ức chế *in vitro* các chủng vi khuẩn: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp.,... Fawad *et al.* (2012) nhận thấy cao dịch chiết lá trầu không sử dụng dung môi ethanol đối với cả vi khuẩn gram âm và gram dương cho đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 13 mm đến 58 mm. Theo nghiên cứu của Najiah *et al.* (2011), cao dịch chiết methanol cây trầu không ở nồng độ 200 mg/ml có khả năng ức chế *in vitro* 6/9 vi khuẩn như *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*... gây bệnh cho động vật thủy sản với đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 17,00 - 20,00mm và thấp hơn so với kết quả của chúng tôi. Theo nhận xét chủ quan của chúng tôi sở dĩ có sự sai khác này nguyên nhân chủ yếu là do được liệu được trồng ở những vùng có điều kiện thổ nhưỡng khí hậu khác nhau.

### 3.3. Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá cây trầu không sau khi pha loãng

Theo kết quả nghiên cứu khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của các cao khô dịch chiết sử dụng dung môi khác nhau ở nồng độ 100 mg/ml cho thấy, cao khô dịch chiết sử dụng dung môi ethanol 96% và methanol 80% cho hiệu quả ức chế vi khuẩn tốt nhất đối với cả 2 chủng vi khuẩn thí nghiệm. Để đánh giá chính xác khả năng ức chế vi khuẩn và xác định nồng độ cao khô dịch chiết nhỏ nhất vẫn còn khả năng ức

chế vi khuẩn chúng tôi tiến hành sử dụng 2 loại cao khô sử dụng 2 dung môi nói trên để tiến hành đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn khi pha loãng.

Kết quả đánh giá tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá cây trầu không sử dụng dung môi ethanol 96% và methanol 80% với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* bằng phương pháp hệ nồng độ pha loãng được tóm tắt ở bảng 3. Đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp., nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết khi cho vào lỗ thạch vẫn còn quan sát thấy vòng vô khuẩn dao động từ 0,39 mg/ml (với dung môi là ethanol 96%) đến 1,56 mg/ml (với dung môi là methanol 80%). Đối với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết khi cho vào lỗ thạch vẫn còn quan sát thấy vòng vô khuẩn là 0,78 mg/ml đối với cả hai loại cao khô dịch chiết lá trầu không (Bảng 3, Hình 3). Cao khô dịch chiết lá trầu không sử dụng dung môi ethanol 96% có tác dụng ức chế vi khuẩn tốt hơn cao khô dịch chiết sử dụng dung môi methanol 80% khi pha loãng.

Theo nghiên cứu của Najiah *et al.* (2011), nồng độ nhỏ nhất của dịch chiết sử dụng dung môi ethanol còn có tác dụng ức chế vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus* sp. *in vitro* lần lượt là 1,56 mg/ml và 3,13 mg/ml cao hơn so với cao khô dịch chiết của chúng tôi, chứng tỏ cao khô dịch chiết của chúng tôi có tính kháng khuẩn tốt hơn. Ngoài ra, kết quả của nghiên cứu trên cũng có tương đồng với kết quả của chúng tôi khi cao khô dịch chiết lá trầu không pha loãng có tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. tốt hơn so với *Streptococcus agalactiae*.

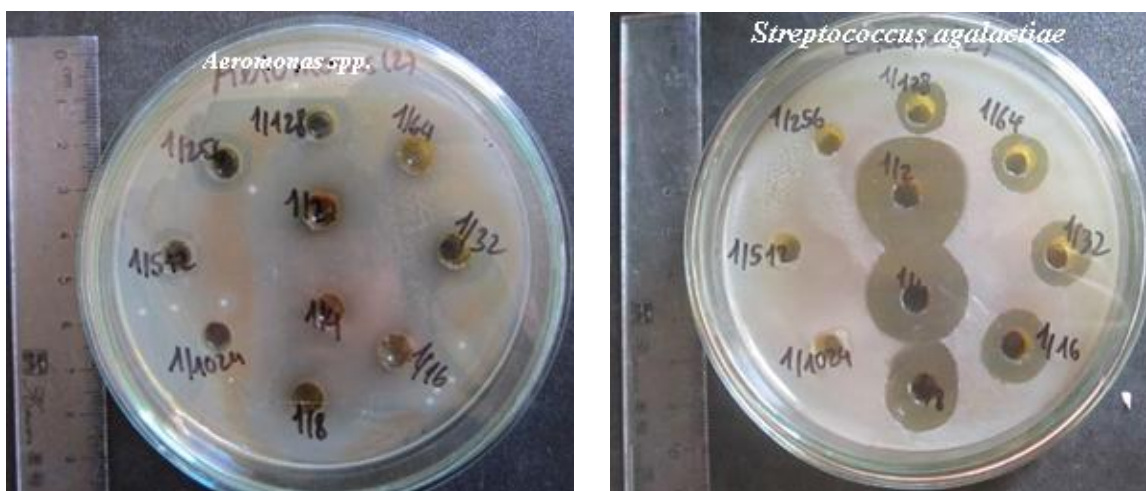
## 4. KẾT LUẬN

Hiệu suất tách chiết thu cao khô dịch chiết lá trầu không (bằng phương pháp ngâm lạnh sau đó cô chân không) biến đổi từ 4,00% (n-hexan) đến 19,67% (ethanol 96%) khi sử dụng 5 loại dung môi khác nhau. Dịch chiết lá cây trầu không (*Piper betle*) trong 5 loại dung môi khác nhau đều có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* trên hai chủng vi khuẩn gây bệnh xuất huyết trên

**Bảng 3. Kết quả ức chế vi khuẩn *in-vitro* của dịch chiết lá cây trầu không được tách chiết bằng 2 dung môi ở các hệ số pha loãng khác nhau**

	Hệ số pha loãng dịch chiết từ nồng độ gốc 100 mg/ml									
	2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>
	Nồng độ dịch chiết (mg/ml)									
	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,195	0,10
<i>Aeromonas</i> spp.										
Ethanol 96%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Methanol 80%	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>										
Ethanol 96%	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Methanol 80%	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: + Quan sát thấy vòng vô khuẩn; - Không quan sát thấy vòng vô khuẩn



**Hình 3. Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá cây trầu không sử dụng dung môi ethanol 96% khi pha loãng**

trên cá rô phi (*Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae*). Cao khô dịch chiết lá cây trầu không sử dụng dung môi ethanol 96% (ở nồng độ 100 mg/ml) có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt nhất với đường kính vòng vô khuẩn đạt  $28,00 \pm 1,00$  mm (*Aeromonas* spp.) và  $31,67 \pm 0,58$  mm (*Streptococcus agalactiae*). Nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết lá trầu không sử dụng dung môi ethanol 96% khi bổ sung vào lỗ thạch vẫn quan sát thấy vòng vô khuẩn là 0,39 mg/ml (*Aeromonas* spp.) và 0,78 mg/ml (*Streptococcus agalactiae*).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adiguzel A., Medine G., Meryem B., Hatice U. T. C., Fikrettin A., Usa K. (2005). Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (*Labiatae*) extract. *Turk J Biol.*, 29: 155-160
- Austin, B. and C. Adam (1996). Fish pathogen: The genus *Aeromonas*. John Wiley and Sons, pp.197-243.
- Chitra S. (1995). Effect of feeding supplemented stresstol bioencapsulated *Artemia franciscana* on growth and stress tolerance - in *Penaeus indicus* postlarvae. M.Phil Dissertation, M.S University, Tirunelveli.

Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá trầu không (*Piper betle*) đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi

- Citarasu T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult Int.*, 18: 403-414
- Citarasu T., Immanuel G., Marian M. P. (1998). Effects of feeding Artemia enriched with stresstol and cod liver oil on growth and stress resistance in the Indian white shrimp *Penaeus indicus* postlarvae. *Asian Fish Sci.*, 12: 65-75
- Citarasu T., Sekar R. R., Babu M. M., Marian M. P. (2002). Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*. *Asian Fish Sci.*, 15: 21-32
- Đặng Thị Lua, Nguyễn Thị Hạnh, Hoàng Hải Hà, Trương Thị Mỹ Hạnh, Phan Thị Vân (2015). Tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của dịch chiết lá trầu không (*Piper betle* L.) và dịch chiết lá ôi (*Psidium guajava*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi nước lợ. *Tạp chí khoa học và công nghệ*, 11: 106-113
- Đặng Thị Mai Thy, Trần Thị Thủy Cúc, Nguyễn Châu Phương Lam, Nguyễn Đức Hiền và Đặng Thị Hoàng Oanh (2012). Đặc điểm mô bệnh học cá rô (*Anabas testudineus*) nhiễm vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Streptococcus* sp. trong điều kiện thực nghiệm. *Tạp chí Khoa học*, 22: 183-193.
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thương 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, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Đỗ Tất Lợi (2003). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học.
- Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng và Nguyễn Thị Muội (2004). Bệnh học thủy sản, Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Evans, J., P. H. Klesius and C. A. Shoemaker (2006). *Streptococcus* in warm-water fish. *Aquaculture Health International*, 7: 10-14.
- Fawad A. B., Hashmi A.N., Mahboob A., Zahid M., Hamid B., Muhammad S.A., Shah Z.U., Afzaal H. (2012). *In-vitro* antibacterial activity of *Piper betle* leaf extracts. *J. App Pharm.*, 03(04): 639-646.
- Huỳnh Kim Diệu và Nguyễn Thành Văn (2011). Sự thuần chủng và hoạt tính kháng khuẩn của cây trầu không (*Piper betle*) và cây Lót (*Piper lolot*) ở đồng bằng sông cửu long. *Tạp chí khoa học*, 17b: 282-288
- Immanuel, G., Vincy Bai V. C., Palavesam A., Peter Marian M. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236: 53-65.
- Minomol M. (2005). Culture of Gold fish *Carassius auratus* using medicinal plants having immune stimulant characteristics. M.Phil Dissertation, MS University, India
- Najiah M., Nadirah M. and Zahrol M. A. S. (2011). Antibacterial activity of edible herbs against fish pathogenic bacteria. *International Journal of Current Research*, 3(12): 84-86.
- Praseetha (2005). Enrichment of brine shrimp *Artemia franciscana* with commercial probiotics and herbal extracts and their resistance against shrimp pathogen *Vibrio* sp. (*Vibrio parahaemolyticus* and *V. damsela*), M.Phil Dissertation, Manonmaiam Sundaranar University, India
- Rani T. V. J. (1999). Fourth year annual report (CSIR Research Associate ship) submitted to Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi
- Shameem P. M. D., Thirumal M. B. (2013). A preliminary antimicrobial screening on leaves of *Piper betle* Linn. *Contemporary Investigations and Observations in Pharmacy*, 2(1): 22-26.
- Sivaram V., Babu M. M., Citarasu T., Immanuel G., Murugadass S., Marian M. P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harvey* I infections. *Aquaculture*, 237: 9-20.
- Tarun A., Rachana S., Amar D. S., Imran W. and Ankita G. (2012). Comparative analysis of antibacterial activity of four *Piper betle* varieties. Amity Institute of Biotechnology, Amity University, Lucknow.
- Võ Văn Chi (2000). Cây thuốc trị bệnh thông dụng, Nhà xuất bản Thanh Hóa.