

TÁC DỤNG DIỆT KHUẨN *IN VITRO* CỦA CAO KHÔ DỊCH CHIẾT THẢO DƯỢC TRÊN VI KHUẨN *Staphylococcus* spp. VÀ *Streptococcus* spp. PHÂN LẬP TỪ DỊCH VIÊM TỬ CUNG BÒ

Nguyễn Thanh Hà¹, Nguyễn Thanh Hải², Nguyễn Nam Phương³, Nguyễn Văn Thanh^{2*}

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Trung học Phổ thông Chu Văn An, Hà Nội

Email*: nvthanh54@gmail.com

Ngày gửi bài: 18.04.2017

Ngày chấp nhận: 26.07.2017

TÓM TẮT

Việc sử dụng thuốc có nguồn gốc hóa dược để điều trị bệnh viêm tử cung cho bò tuy có nhiều kết quả khả quan nhưng lại làm dấy lên lo ngại về tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thịt và sữa bò 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 đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô 8 loại thảo dược (Huyền diệp, Tô mộc, Đơn đỏ, Mò hoa trắng, Sài đất, Mỏ quạ, Bồ công anh, Xuân hoa) đối với 2 chủng vi khuẩn (*Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp.) phân lập từ dịch viêm tử cung của bò. Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất chiết xuất của bột 8 loại thảo dược sử dụng dung môi thông dụng ethanol 70% biến đổi từ 9,60% (Tô mộc) đến 14,32% (Sài đất). 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 loài vi khuẩn. Đối với vi khuẩn *Streptococcus* spp., đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 11,80 mm (Mỏ quạ) đến 25,00 mm (Mò hoa trắng). Đối với vi khuẩn *Staphylococcus* spp. đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 10,28 mm (Mỏ quạ) đến 25,30 mm (Sài đất). Nồng độ nhỏ nhất của các cao khô dịch chiết được liệu khi pha loãng vẫn còn khả năng ức chế *in vitro* vi khuẩn biến đổi từ 6,25 mg/ml đến 0,20 mg/l tùy thuộc từng loại dược liệu. Sài đất và Mò hoa trắng có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt nhất, ở nồng độ 0,20 mg/ml khi bổ sung vào lỗ thạch vẫn quan sát thấy vòng vô khuẩn đối với cả 2 chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Từ khóa: Cao dịch chiết dược liệu, ức chế vi khuẩn, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., viêm tử cung bò.

In Vitro Anti-Bacterial Activity of Herbal Extracts against *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. Isolated from the Metritis in Cows

ABSTRACT

The use of antibiotics for the cow metritis treatment has many advantages, however, raises concerns about antibiotic residues in the meat and dairy products as well as increasing antibiotic resistance of pathogenic bacteria. Herbs have been increasingly demonstrated their significant role in the pharmaceutical industry as a biosafety solution and an alternative to synthetic chemical drugs. The present study aimed to examine the anti-bacterial activity of herbal extracts (*Polyalthia longifolia* var. *Pendula*, *Lignum Caesalpiniae sappari*, *Excoecaria cochinchinensis* Lour., *Clerodendron fragrans* Vent, *Wedelia calendulaceae* Less, *Cudrania tricuspidata*, *Pseuderanthemum* (Ness) Radik, *Lactuca indica* L) against *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. isolated from cow metritis. The results showed that the extraction efficiency varied from 9.60% (*Lignum Caesalpiniae sappari*) to 14.32% (*Wedelia calendulaceae* Less). At the concentration of 100 mg/ml, all the extracts showed good anti-bacterial activity against *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. For *Streptococcus* spp., the bacterial inhibition zone varied from 11.80 mm (*Cudrania tricuspidata* Carr) to 25.00 mm (*Clerodendron fragrans* Vent). The diameter of the bacterial inhibition zone of *Staphylococcus* spp. varied from 10.28 mm (*Cudrania tricuspidata* Carr) to 25.30 mm (*Wedelia calendulaceae* Less). The extract solution of *Clerodendron fragrans* Vent and *Wedelia calendulaceae* Less showed

the highest anti-bacterial activity. This extract remained its anti-bacterial activity against *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. at concentration of 0.20 mg/ml.

Keywords: Extract of herbs, Anti - bacterial effect, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., cows metritis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm tử cung ở bò là một trong những bệnh thường gặp, gây thiệt hại lớn về mặt kinh tế trong chăn nuôi bò sữa. Bệnh làm kéo dài thời gian động dục lại sau đẻ, tăng số lần phối giống có chữa, tăng tỉ lệ loại thải, giảm sản lượng sữa, giảm số con sinh ra trong một đời bò mẹ, từ đó làm giảm năng suất sinh sản (Gilbert *et al.*, 2005, Dubuc *et al.*, 2011). Nhiều công trình nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra biện pháp phòng và điều trị bệnh viêm tử cung ở bò sữa bằng việc sử dụng các kháng sinh và các hóa dược khác nhau (Meziane *et al.*, 2013; Duricic *et al.*, 2014). Tuy mang lại nhiều kết quả khả quan nhưng phương pháp này lại gây ra sự tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thịt và sữa bò cũng như làm tăng tính kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh viêm tử cung. Hiện tượng vi khuẩn kháng lại kháng sinh hiện đang trở thành vấn đề lớn trên toàn thế giới (WHO, 2014). Các nhà nghiên cứu khẳng định việc nỗ lực tìm ra các chất kháng khuẩn mới nhằm thay thế kháng sinh là yêu cầu cấp thiết hiện nay. Tổ chức Y tế thế giới đã nhận định rằng các thực vật bản địa sẵn có là một nguồn cung hiệu quả nhằm thay thế thuốc kháng sinh. Những nghiên cứu về thảo dược ngày càng được tăng cường và trao đổi thông tin rộng rãi (Amadou, 1998). 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 thay thế cho các thuốc hóa học tổng hợp. Thảo dược được ưa chuộng bởi tính an toàn sinh học, không có hay ít có tác dụng phụ (Mahesh and Satish, 2008; Nguyễn Thanh Hải và Bùi Thị Tho, 2013). Đã có nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng thảo dược trong điều trị bệnh viêm tử cung bò, sử dụng cây Sầu đông (*Aradirachta indica*), bông Cạn đông (*Gossypium berbaseum*), Bạch hoa xà (*Plumbago zeylanica*) và Keo (*Aacacia catechu*) (Ahmed *et al.*, 2014); củ Tỏi (Sarkar *et al.*, 2006); cây Sim (*Montanoa tomentosa*) (Marquez

et al., 2007); cây Ích mẫu (*Herba Leonuri*), Dương qui (*Angelicae Sinensis Radix*), Hồng hoa (*Flos Carthami*), củ Gấu (*Rhizoma Cyperi*) và Mộc dược (*Myrrha*) (Cui *et al.*, 2014). Kết quả so sánh giữa nhóm dùng dịch chiết thảo dược và nhóm dùng oxytetracyclin cho thấy bò ở nhóm dùng thảo dược có thời gian động dục lại sau đẻ ngắn hơn và tỉ lệ thụ thai cao hơn so với nhóm dùng kháng sinh.

Trong khi các nhà khoa học ở các nước phát triển trên thế giới đang có xu hướng đầu tư nghiên cứu các thảo dược truyền thống thì tại các nước đang phát triển, nơi vốn có thể mạnh về thuốc cổ truyền lại chưa được tập trung khai thác, việc sử dụng chủ yếu chỉ dựa trên kinh nghiệm dân gian mang tính chất truyền miệng. Hơn nữa, các nhà nghiên cứu mới chú trọng đến lĩnh vực nhân y, sự ứng dụng trong thú y còn rất hạn chế. Do đó việc tiến hành sàng lọc các thảo dược có tiềm năng để ứng dụng trong điều trị bệnh viêm tử cung bò là một trong những hướng đi đúng và cần thiết. Trong nghiên cứu này, khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của 8 loại thảo dược truyền thống của Việt Nam được đánh giá trên hai loại vi khuẩn *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Lá cây Huyền diệp (*Polyalthia longifolia* var. *pendula*): Thu hái lá bánh tẻ ở những cây trên 5 năm tuổi cách mặt đất hơn 1,5 m. Lá có hình mác dài, nhọn đầu, mặt lá trơn bóng, mặt trên đậm hơn mặt dưới và 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), sau đó được phơi, sấy ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,5 mm). Bột lá đựng trong túi ni lông và bảo quản trong bình hút ẩm.

Tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết thảo dược trên vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò

- Gỗ tô mộc (*Lignum Caesalpiniae sappari*): Chẻ nhỏ gỗ với kích thước < 0,5 cm, rửa dưới vòi nước sạch (2 - 3 lần) rồi rửa lại bằng nước cất, sau đó sấy ở 40°C. Gỗ tô mộc sau khi được sơ chế, nghiền thành bột mịn (< 0,5 mm). Bột gỗ đựng trong túi ni lông và bảo quản trong bình hút ẩm.

- Cây đơn đỏ (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.): Thu lá lành lặn, bánh tẻ, không bị sâu 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), sau đó phơi khô trong bóng râm hoặc sấy ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,5 mm). Bột lá đơn đỏ (hơi thô, màu xanh nâu, mùi hắc nhẹ) được đựng trong túi ni lông và bảo quản trong bình hút ẩm.

- Cây mò hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent): Thời điểm thu hái là lúc cây sắp ra hoa; thu hái vào những ngày khô ráo, khoảng từ 7 - 10 giờ sáng. Cây tươi được rửa nước sạch (2 - 3 lần) rồi rửa với nước cất, sấy hoặc phơi khô ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,5 mm) sau đó đựng trong túi ni lông và bảo quản trong bình hút ẩm.

- Thân lá cây sài đất (*Wedelia calendulaceae* Less): Cây tươi thu hái về được rửa dưới vòi nước sạch (2 - 3 lần) sau đó được sấy hoặc phơi khô ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,5 mm), đựng trong túi ni lông và bảo quản trong bình hút ẩm.

- Lá cây mỏ quạ (*Cudrania tricuspidata* (Carr)): Thu lá lành lặn, bánh tẻ, không bị sâu, thu vào sáng sớm khi trời còn mát. Lá cây tươi thu hái về được rửa dưới vòi nước sạch (2 - 3 lần) sau đó được sấy hoặc phơi khô ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,5 mm), đựng trong túi ni lông và bảo quản trong bình hút ẩm.

- Cây xuân hoa (*Pseuderanthemum* (Ness) Radik): Thu lá lành lặn, bánh tẻ, không bị sâu. Lá cây tươi thu hái về được rửa dưới vòi nước sạch (2 - 3 lần) sau đó được sấy hoặc phơi khô ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,5 mm), đựng trong túi ni lông và bảo quản trong bình hút ẩm.

- Cây bồ công anh (*Lactuca indica* L.): Cây tươi thu hái về được rửa dưới vòi nước sạch (2 - 3 lần) sau đó được sấy hoặc phơi khô ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (< 0,5 mm), đựng trong túi ni lông và bảo quản trong bình hút ẩm.

- Vi khuẩn *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò

- Kháng sinh Ampicillin do Công ty cổ phần thuốc Thú y TW5 (FiveVet) cung cấp.

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

- Môi trường LB đặc được hấp diệt trùng, để nguội tới 40 - 50°C, đổ vào đĩa petri có đường kính 10 cm với độ dày $4 \pm 0,2$ mm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thu dịch chiết lá cây thực vật: Bột lá được liệu được chiết với các dung môi có độ phân cực khác nhau bằng phương pháp ngâm chiết lạnh ở nhiệt độ phòng với cùng một tỷ lệ (1:10), mỗi ngày được lắc đảo 2 lần. Sau 72 giờ, thu dịch chiết, lọc qua vải màn và giấy lọc Whatman No. 1. Thu dịch chiết đem cô quay hút chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi tới 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.

- Pha dịch chiết nồng độ 100 mg/ml: Lấy 1 g cao cô toàn phần pha với 10 ml dimethyl sulfoxide (DMSO), dùng thìa thủy tinh khuấy tan hoàn toàn thu được dung dịch có nồng độ 100 mg/ml.

- Nuôi cấy vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. trên môi trường đặc và lỏng: Vi khuẩn được cấy vạch trong môi trường LB đặc, trên đĩa petri ủ 37°C/24 h, chọn khuẩn lạc đơn điển hình. Khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trong bình tam giác với môi trường LB lỏng, đặt trong tủ bảo ôn ở 37°C, với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 12 - 14 h; thu canh khuẩn (mật độ vi khuẩn phải đạt 10⁸ tế bào/ml là đạt chuẩn).

- Xác định mật độ vi khuẩn: Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường LB 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 100 μ l 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 6 mm/lỗ đục cách nhau khoảng 25 mm. Mỗi lỗ thạch, nhỏ 100 μ l dịch chiết, đặt đĩa vào tủ ấm ở $37^\circ\text{C}/24$ h đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn, rồi tính số bình quân.

- Pha loãng dịch chiết: Chuẩn bị 10 ống nghiệm vô trùng, cho vào mỗi ống 5 ml DMSO. Lấy 5 ml mẫu dịch chiết (100 mg/ml) cho vào ống nghiệm thứ nhất, làm đồng đều thu được độ pha loãng 2 lần (21). Lấy 5 ml dung dịch ở ống nghiệm 21 cho vào ống nghiệm thứ 2, được độ pha loãng 4 lần (22). Cứ làm như vậy để thu được các độ pha loãng tiếp theo: 23, 24... 2n.

2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và lặp lại 3 lần. Xử lý thống kê sinh học số liệu bằng phần mềm Excel 2007.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu suất thu cao khô dịch chiết được liệu từ 8 loại thảo dược sử dụng dung môi ethanol 70%

Nhằm lựa chọn thực vật mục tiêu từ 8 loại thực vật ban đầu, chúng tôi tiến hành tách chiết và đánh giá hiệu suất thu cao khô dịch chiết sử dụng dung môi ethanol 70%. Dung môi ethanol là một trong những dung môi thông dụng, thường được sử dụng trong việc ngâm tách chiết các hoạt chất từ động vật, thực vật. Dung môi ethanol không làm trương nở dược liệu như nước, là dung môi phân cực protic, hòa tan được

alkaloid, tinh dầu, glycosid, ít hòa tan tạp chất nên dịch chiết dễ bảo quản hơn. Theo nghiên cứu của Tiwari *et al.* (2011), dung môi ethanol có khả năng hòa tan chọn lọc được các nhóm hợp chất như flavonoid, polyphenol, polyacetylene, tannin, terpenoid, sterol, alkaloid.

Sau khi tiến hành ngâm bột dược liệu trong dung môi ethanol 70% 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. Tiến hành cô đuổi dung môi bằng máy cất quay chân không cho đến khi được cao có khối lượng không đổi. Khối lượng cao khô và hiệu suất chiết được thể hiện ở bảng 1 và hình 1.

Kết quả thu được cho thấy, màu sắc của cao khô dịch chiết có sự tương đồng với màu sắc của bột dược liệu.

Dược liệu sài đất cho khối lượng cao khô trung bình lớn nhất với hiệu suất 14,32%. Tô mộc cho khối lượng cao khô trung bình là nhỏ nhất với hiệu suất tách chiết là 9,60%. Theo Nguyễn Thanh Hải và cs. (2014), hiệu suất tách chiết thu cao khô dịch chiết của bột lá cây huyền diệp phụ thuộc từng loại dung môi tách chiết, biến đổi từ 8,47% đến 15,95%, trong đó khi sử dụng dung môi ethanol cho kết quả là 11,62%, tương đồng với kết quả nghiên cứu này.

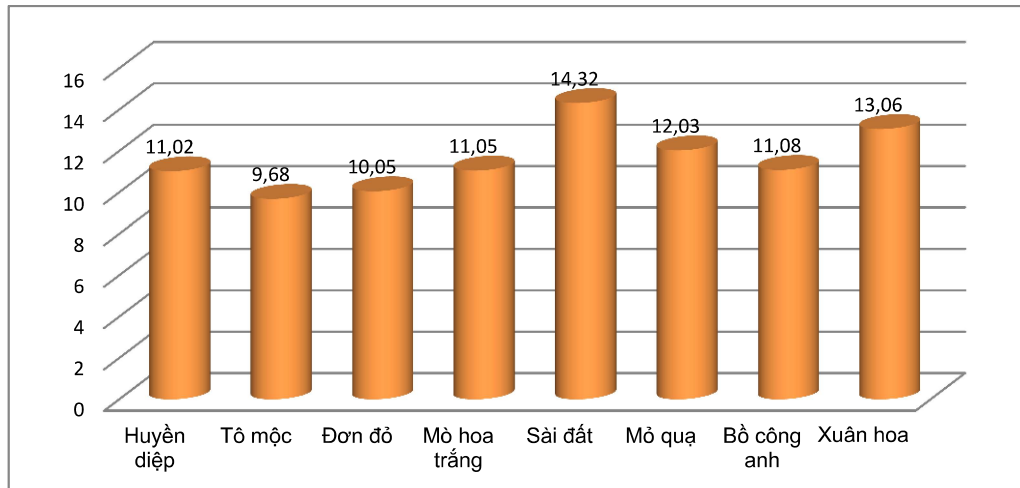
Bộ phận dùng của dược liệu tô mộc là lõi gỗ sấy khô ở 40°C , do đó hiệu suất tách chiết nhỏ hơn các dược liệu sử dụng lá và thân. Hiệu suất tách chiết của lõi gỗ tô mộc chỉ đạt 9,60%. Kết quả nghiên cứu này thấp hơn không nhiều so với công bố của Nguyễn Thanh Hải và Nguyễn Văn Thanh (2016) khi sử dụng dung môi ethanol và phương pháp Soxhlets/ethanol 70% (hiệu suất thu cao khô dịch chiết cây tô mộc đạt 11,14%). Cũng theo hai tác giả này, hiệu suất tách chiết thu cao khô dịch chiết cây đơn đỏ là 13,68%, cũng cao hơn không nhiều so với nghiên cứu của chúng tôi (10,05%). Có sự khác nhau về hiệu suất chiết xuất, theo chúng tôi có thể do bộ phận dùng của dược liệu khác là thân và lá nên dung môi Ethanol 70% dễ thấm vào trong tế bào hơn so với dược liệu lõi gỗ Tô mộc. Khi dung môi thấm vào trong tế bào dược liệu nó sẽ hòa tan

Tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết thảo dược trên vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò

Bảng 1. Khối lượng cao khô thu được của 20 g bột dược liệu trong dung môi ethanol 70%

	Dược liệu							
	Huyền diệp	Tô mộc	Đơn đỏ	Mỏ hoa trắng	Sài đất	Mỏ quạ	Bồ công anh	Xuân hoa
Khối lượng cao khô (g)	2,204 ^d	1,936 ^e	2,010 ^{de}	2,210 ^d	2,864 ^a	2,406 ^{bc}	2,216 ^{cd}	2,612 ^b

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



Hình 1. Hiệu suất tách chiết thu cao khô từ bột dược liệu khi sử dụng dung môi ethanol 70%

các chất có trong dược liệu và đồng thời quá trình khuếch tán các chất hòa tan từ trong tế bào ra bên ngoài dung môi ở các tế bào lá dễ dàng hơn tế bào lõi gỗ, do tế bào lõi gỗ có thành cellulose dày hơn.

3.2. Đánh giá khả năng ức chế *in vitro* của cao khô dịch chiết dược liệu đối với vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp.

Sau khi thu được 8 loại cao khô dược liệu sử dụng dung môi thông dụng ethanol 70%, với mục đích lựa chọn được dược liệu mục tiêu để tiến hành nghiên cứu sâu hơn từ 8 loại dược liệu ban đầu, chúng tôi tiến hành thí nghiệm khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của các loại cao khô dược liệu đối với 2 chủng vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò. Mẫu cao khô dịch chiết dược liệu thu được từ thí nghiệm trên ở nồng độ 100 mg/ml, được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. bằng phương pháp khuếch

tán trên thạch. Đối chứng so sánh với kháng sinh chuẩn là ampicillin (50 mg/ml). Kết quả thí nghiệm cho thấy, cao khô 8 loại dược liệu đều có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* đối với cả hai chủng vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. nghiên cứu với đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 10,08 mm (cao khô dịch chiết Mỏ quạ đối với chủng vi khuẩn *Staphylococcus* spp.) đến 25,33 mm (cao khô dịch chiết Sài đất đối với chủng vi khuẩn *Staphylococcus* spp.) (Bảng 2). Cao khô dịch chiết các loại dược liệu đều cho đường kính vòng vô khuẩn tương đương hoặc cao hơn khi so sánh với Ampicillin, trừ cao khô dịch chiết mỏ quạ. Kết quả này cho thấy việc lựa chọn các thực vật mục tiêu của chúng tôi là phù hợp.

Nhìn chung, khả năng ức chế *in vitro* của cao khô dược liệu với 2 chủng vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò là tương đương nhau trừ cao khô dịch chiết tô mộc, không quan sát thấy sự sai khác về mặt thống kê giữa đường

Bảng 2. Khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao dịch chiết thảo dược ở các nồng độ 100 mg/ml với vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò

Dược liệu	Vi khuẩn	
	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
Đ/c DMSO	0	0
Ampicillin (50 mg/ml)	21,67 ± 1,53	23,67 ± 1,53
Huyền diệp	22,67 ± 1,53	22,00 ± 1,00
Tô mộc	23,00 ± 1,73	18,33 ± 1,53
Đơn đỏ	21,67 ± 1,15	21,67 ± 0,58
Mò hoa trắng	23,00 ± 1,00	25,00 ± 1,15
Sài đất	25,3 ± 1,52	24,3 ± 1,52
Mỏ quạ	10,08 ± 1,52	11,80 ± 1,73
Bồ công anh	22,67 ± 1,73	23,67 ± 1,52
Xuân hoa	20,67 ± 1,15	21,67 ± 1,15

kính vòng vô khuẩn. Cao khô dịch chiết tô mộc cho khả năng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus* spp. cao hơn so với vi khuẩn *Streptococcus* spp. với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 23,00 ± 1,73 mm và 18,33 ± 1,53 mm

Đối với cả 2 chủng vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. cao khô dịch chiết dược liệu mỏ quạ đều cho khả năng ức chế *in vitro* thấp nhất với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 10,08 ± 1,52 mm và 11,80 ± 1,73 mm. Đường kính vòng vô khuẩn sai khác hoàn toàn so với cao khô dịch chiết của các loại dược liệu khác, đường kính vòng vô khuẩn trung bình chỉ khoảng bằng 1/2 so với các dược liệu khác. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả đã công bố của Nguyễn Thanh Hải và Nguyễn Văn Thanh (2016) khi nghiên cứu khả năng ức chế vi khuẩn của cao khô dịch chiết đơn đỏ và tô mộc đối với vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. gây bệnh viêm tử cung trên chó.

3.3. Khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dược liệu khi pha loãng

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 pha loãng 8 loại cao khô đã thu được ở trên để tiếp tục làm thí nghiệm. Kết quả đánh

giá tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết dược liệu với vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. bằng phương pháp hệ nồng độ pha loãng được tóm tắt ở bảng 3 và 4.

Đối với vi khuẩn *Staphylococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò, kết quả thí nghiệm cho thấy tùy từng loại cao khô dịch chiết cho nồng độ pha loãng nhỏ nhất vẫn còn khả năng ức chế vi khuẩn là khác nhau. Nồng độ nhỏ nhất biến đổi từ 0,2 mg/ml (sài đất, mò hoa trắng) đến 12,5 mg/ml (mỏ quạ). Dược liệu mỏ quạ và xuân hoa cho khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* thấp nhất khi pha loãng. Nồng độ ức chế tối thiểu chỉ đạt lần lượt là 12,5 mg/ml và 6,25 mg/ml. Dược liệu sài đất, mò hoa trắng cho kết quả tốt nhất, tiếp theo đó là dược liệu đơn đỏ, huyền diệp và bồ công anh (Bảng 3).

Đối với vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò, kết quả thí nghiệm cũng tương tự. Nồng độ nhỏ nhất biến đổi từ 0,2 mg/ml (sài đất, mò hoa trắng) đến 6,25 mg/ml (mỏ quạ, xuân hoa). Dược liệu mỏ quạ và xuân hoa cho khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* thấp nhất khi pha loãng. Nồng độ ức chế tối thiểu chỉ đạt 6,25 mg/ml. Dược liệu sài đất, mò hoa trắng cho kết quả tốt nhất, tiếp theo đó là dược liệu đơn đỏ, huyền diệp và bồ công anh (Bảng 4).

Tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết thảo dược trên vi khuẩn *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò

Theo Leelapornpisid *et al.* (2011), đối với cây đơn đỏ, nồng độ nhỏ nhất của dịch chiết sử dụng dung môi ethanol còn có tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* là 1,56 mg/ml và nồng độ nhỏ nhất có tác dụng diệt khuẩn là 3,13 mg/ml cao hơn so với cao khô dịch chiết trong nghiên cứu này, chứng tỏ cao khô dịch chiết của chúng tôi có tính kháng khuẩn

tốt hơn. Kết quả này cũng phù hợp với thí nghiệm trên khi cao khô dịch chiết ở nồng độ 100 mg/ml của chúng tôi cho đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn so với nghiên cứu này. Nghiên cứu này cũng đã chỉ ra trong dịch chiết lá cây đơn đỏ có tannin và phenol, đây chính là hai nhóm chất có khả năng ức chế vi khuẩn.

Bảng 3. Khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao dịch chiết thảo dược ở các nồng độ khác nhau đối với vi khuẩn *Staphylococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò

Dược liệu	Hệ số pha loãng dịch chiết từ nồng độ gốc 100 mg/ml									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	210
	Nồng độ dịch chiết (mg/ml)									
	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
Huyền diệp	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tô mộc	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Đơn đỏ	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mò hoa trắng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sài đất	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mỏ quạ	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Bồ công anh	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Xuân hoa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

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

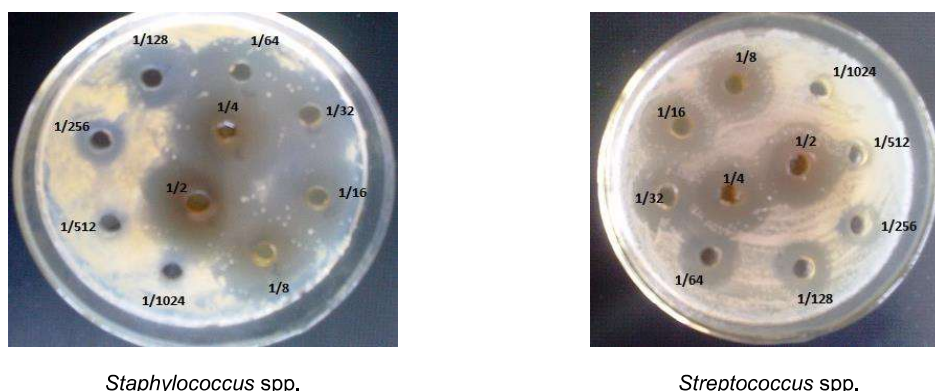
Bảng 4. Khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao dịch chiết thảo dược ở các nồng độ khác nhau đối với vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung bò

Dược liệu	Hệ số pha loãng dịch chiết từ nồng độ gốc 100 mg/ml									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	210
	Nồng độ dịch chiết (mg/ml)									
	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
Huyền diệp	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tô mộc	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Đơn đỏ	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mò hoa trắng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sài đất	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mỏ quạ	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Bồ công anh	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Xuân hoa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

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



Hình 2. Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá cây đơn đỏ khi pha loãng



Hình 3. Tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết lá cây huyền diệp khi pha loãng

Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của các loại dược liệu đối với 2 loại vi khuẩn phân lập từ dịch viêm tử cung bò là khá đồng đều. Không thấy có sự sai khác rõ rệt về nồng độ nhỏ nhất vẫn còn khả năng ức chế vi khuẩn khi pha loãng. Mức độ chênh lệch chỉ là một hệ số pha loãng. Cao khô dịch chiết 5 loại dược liệu bồ công anh, đơn đỏ, huyền diệp, mò hoa trắng và sài đất cho khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt đối với cả hai chủng vi khuẩn *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

4. KẾT LUẬN

Hiệu suất chiết xuất của bột 8 loại thảo dược sử dụng dung môi thông dụng ethanol 70% biến đổi từ 9,68% (Tô mộc) đến 14,32% (Sài đất). Ở nồng độ 100 mg/ml các cao khô dịch chiết đều có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt đối với 02 loài vi khuẩn. Đối với vi khuẩn *Streptococcus*

spp., đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 11,80 mm (Mỏ quạ) đến 25,00 mm (Mò hoa trắng). Đối với vi khuẩn *Staphylococcus* spp., đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 10,28 mm (Mỏ quạ) đến 25,30 mm (Sài đất). Nồng độ nhỏ nhất của các cao khô dịch chiết dược liệu khi pha loãng vẫn còn khả năng ức chế *in vitro* vi khuẩn biến đổi từ 6,25 mg/ml cho đến 0,20 mg/l tùy thuộc từng loại dược liệu. Sài đất và Mò hoa trắng có khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt nhất, ở nồng độ 0,20 mg/ml khi bổ sung vào lỗ thạch vẫn quan sát thấy vòng vô khuẩn đối với cả 2 chủng vi khuẩn nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm có nguồn gốc thảo dược phòng và trị bệnh viêm tử cung bò”, mã số: ĐTDL CN - 52/15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed F., Saxena M., Maini S. (2014). A herbal intrauterine infusion “Arasksha liquid” for treatment of reproductive disorders in cows. IJPRBS, 3(2): 42 - 48.
- Amadou C. K. (1998). Promoting Alternative Medicine. Africa Health Journal, 2: 20 - 25.
- Cui D., Li J., Wang X., Xie J., Zhang K., Wang X., Zhang J., Wang L., Qin Z., and Yang Z. (2014). Efficacy of herbal tincture as treatment option for retained placenta in dairy cows. Anim Reprod Sci., 145: 23 - 28.
- Dubuc J., Duffield T. F., Leslie K. E., Walton J. S., and LeBlanc S. J. (2011). Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. Journal of Dairy Science, 94: 1339 - 1346.
- Duricic D. M., Lipar M., Samardžija M. (2014). Ozone treatment of metritis and Ozone treatment of metritis and endometritis in Holstein cows endometritis in Holstein cows. Vet. Arhiv., 84: 103 - 110.
- Gilbert R. O., Shin S. T., Guard C. L., Erb H. N., and Frajblat M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. Theriogenology, 64: 1879 - 1888.
- Leelapornpisid P., Chansakao S., Ittiwittayawat T., Pruksakorn S. (2011). Antimicrobial activity of herbal extracts on *Staphylococcus Aureus* and *Propionibacterium Acnes*. ISHS Acta Horticulturae 679: III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants - Volume 5: Quality, Efficacy, Safety, Processing and Trade in Medicinal and Aromatic Plants.
- Mahesh B., Satish S. (2008). Antimicrobial activity of some important medicinal plants against animal and human pathogens. World J Agric Sci., 4(S): 839 - 843.
- Marquez A., Gonzalez M., Bonges H. (2007). Effects of intrauterine administration *Montanoa tomentosa* extracts upon postpartum metritis in dairy cows. AJOL, 3(1).
- Meziane R., Abdellatif Niar, Mustapha Adnane Smadi, Bakir Mamache (2013). A clinical study of metritis in dairy cows in the region of Batna (east of Algeria) and their treatments using different therapeutic protocols. Veterinary World, Vet World, 6(1): 45 - 48.
- Nguyễn Thanh Hải, Bùi Thị Tho (2013). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với vi khuẩn *E. coli* gây bệnh và *E. coli* kháng Ampicillin, Kanamycin. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 11(6): 804 - 808.
- Nguyễn Thanh Hải, Bùi Thị Tho, Miyamoto Atsushi (2014). Nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất chiết và tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của lá cây huyền diệp đối với *E. coli* và *Salmonella* phân lập từ phân vịt tiêu chảy. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, XXI(3): 74 - 81.
- Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Văn Thanh (2016). Nghiên cứu tác dụng ức chế *in vitro* của cao khô dịch chiết dược liệu trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp và *E. coli* phân lập từ dịch viêm tử cung chó và thử nghiệm điều trị. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, XXIII(4): 26 - 36.
- Prashant Tiwari, Bimlesh Kumar, Mandeep Kaur, Gurpreet Kaur, Harleen Kaur (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. Internationale pharmaceutica sciencia, 1(1): 98 - 106.
- Sarkar H., Kumar M., Rawat V. P., Varshney T. K., Goswami M. C., Yadav and Srivastava S. K. (2006). Effect of Administration of Garlic Extract and PGF 2α on Hormonal Changes and Recovery in Endometritis Cows. Asian - Aust. J. Anim. Sci., 19(7): 964 - 969.
- World Health Organization (WHO) (2014). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. WHO Library Cataloguing - in - Publication Data.