

## HOẠT TÍNH SINH HỌC Ở LOÀI *ARTOCARPUS NIGRIFOLIUS* C. Y. Wu

TRẦN MINH HỘI, PHẠM VĂN THẾ, TRẦN THANH AN, HÀ THỊ VÂN ANH

*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*

NGUYỄN THANH TRÀ, BÁ THỊ CHÂM, LÊ THỊ TÚ ANH

*Viện Hóa học*

Chi Mít (*Artocarpus* Forst. & Forst.f.) là một chi lớn thuộc họ Dâu tằm (Moraceae). Trên thế giới chi này có khoảng 60 loài, phần lớn là cây gỗ, có xuất xứ từ Đông Nam châu Á và Thái Bình Dương. Các loài trong chi là những cây gỗ có nhựa mủ màu trắng.

Ở Việt Nam, theo Phạm Hoàng Hộ, chi *Artocarpus* có 15 loài và phân loài. Trong số 15 loài và phân loài kể trên, hầu hết là cây gỗ lớn đến cây gỗ nhỏ. Có 4 loài thường được trồng để lấy quả ăn. Theo Nguyễn Tiến Hiệp, chi *Artocarpus* Forst. & Forst. f., ở Việt Nam có 13 loài. Về công dụng làm thuốc, theo Võ Văn Chi (1997) đã nêu trong cuốn Từ điển cây thuốc Việt Nam, chi *Artocarpus* có 9 loài được sử dụng làm thuốc ở các mức độ khác nhau.

Trong bài báo này, chúng tôi khảo sát hoạt tính sinh học của loài *Artocarpus nigrifolius* C. Y. Wu, một loài mới bổ sung cho hệ thực vật Việt Nam.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

Tiêu bản thực vật loài *Artocarpus nigrifolius* C. Y. Wu thu tại Khu Bảo tồn thiên nhiên Cópia, huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La vào tháng 6 năm 2010. Số hiệu mẫu PVT 419. Tiêu bản do TS. Nguyễn Tiến Hiệp định tên và được lưu giữ tại Phòng Tiêu bản thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. Mẫu lá, cành, rễ và vỏ thân sau khi thu được phơi trong bóng râm và xử lý sơ bộ trước khi tách chiết dịch.

#### 2. Thử hoạt tính kháng sinh

##### 2.1. Các chủng vi sinh vật kiểm định

Bao gồm những vi khuẩn và nấm kiểm định gây bệnh ở người do ATCC cung cấp:

- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633): là trực khuẩn Gram (+), sinh bào tử, thường không gây bệnh.
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709): cầu khuẩn Gram (+), gây mủ các vết thương, vết bỏng, gây viêm họng, nhiễm trùng có mủ trên da và các cơ quan nội tạng.
- *Escherichia coli* (ATCC 25922): Gram (-), gây một số bệnh về đường tiêu hoá như viêm dạ dày, viêm đại tràng, viêm ruột, viêm ly trực khuẩn.
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442): Gram (-), trực khuẩn mủ xanh, gây nhiễm trùng huyết, các nhiễm trùng ở da và niêm mạc, gây viêm đường tiết niệu, viêm màng não, màng trong tim, viêm ruột.
- *Candida albicans* (ATCC 10231): là nấm men, thường gây bệnh tưa lưỡi ở trẻ em và các bệnh phụ khoa.
- *Lactobacillus fermentum*: Gram (+), là loại vi khuẩn đường ruột lên men có ích, thường có mặt trong hệ tiêu hoá của người và động vật.
- *Enterococcus faecium*: Gram (+), vi khuẩn gây bệnh viêm đường tiết niệu, viêm ruột thừa, viêm màng trong tim, viêm màng não.

## 2.2. Môi trường nuôi cấy

MHB (Mueller-Hinton Broth), MHA (Mueller-Hinton Agar); TSB (Tryptic Soy Broth), TSA (Tryptic Soy Agar) cho vi khuẩn; SAB, SA cho nấm.

## 2.3. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ. Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu), IC<sub>50</sub> (nồng độ ức chế 50%), MBC (nồng độ diệt khuẩn tối thiểu).

*Pha loãng mẫu thử:* Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO và nước cất vô trùng thành một dãy 05 nồng độ thích hợp theo yêu cầu và mục đích thử. Nồng độ thử cao nhất là 128 µg/ml, tiếp theo là 32 µg/ml, 8 µg/ml, 2 µg/ml, 0,5 µg/ml.

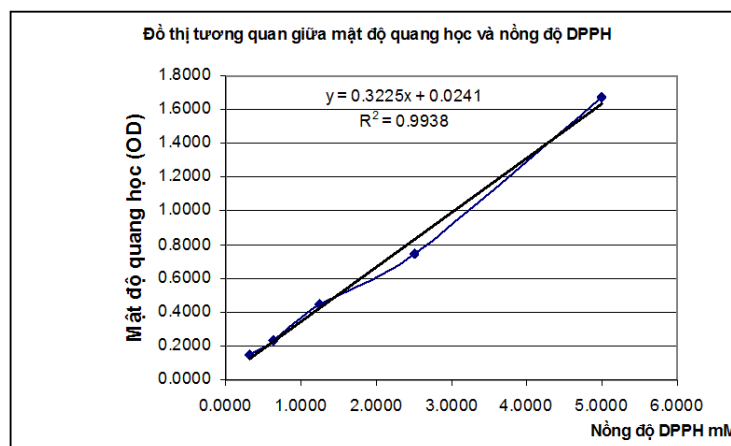
*Thử hoạt tính:* Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ  $5.10^5$  CFU/ml khi tiến hành thử. Lấy 10 µl dung dịch mẫu thử theo các nồng độ đã được pha loãng, thêm 200 µl dung dịch vi khuẩn và nấm, ủ ở 37°C. Sau 24h, đọc giá trị MIC bằng mắt thường. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật. Giá trị IC<sub>50</sub> được tính toán dựa trên số liệu đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ TECAN và phần mềm raw data.

### Chất đối chứng:

- Kháng sinh Ampicillin cho các chủng vi khuẩn gram (+) và chủng E.c với giá trị IC<sub>50</sub> trong khoảng 0,05-2 µg/ml.
- Kháng sinh Pen/Step cho chủng Pa với giá trị IC<sub>50</sub> trong khoảng 4-5 µg/ml.
- Amphotericin B cho nấm với giá trị IC<sub>50</sub> trong khoảng 0,5-1 µg/ml.

## 3. Phương pháp thử hoạt tính chống oxy hoá DPPH

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là chất tạo ra gốc tự do được dùng để sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng  $\lambda = 517$  nm.



Hình 1: Tương quan nồng độ DPPH và mật độ quang học

Cách tiến hành: Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1 mM trong Methanol (MeOH). Chất thử được pha trong DMSO 100% sao cho nồng độ cuối cùng đạt được một dãy các nồng độ 256; 64; 16; 4; 1  $\mu\text{g/ml}$ . Để thời gian phản ứng 30 phút ở 37°C, đọc mật độ hấp thụ của DPPH chưa phản ứng bằng máy đọc Genios Tecan ở bước sóng 517 nm. % quét gốc tự do DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:  $SC\% = (OD_{\text{trắng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) / OD_{\text{trắng}} (\%)$ .  $EC_{50}$  được tính theo giá trị SC tương quan với các nồng độ khác nhau của chất thử, thí nghiệm được lặp lại với  $n = 3$ . Đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ DPPH và mật độ quang học thể hiện trong Hình 1.

#### 4. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

##### 4.1. Thiết bị nghiên cứu

Tủ ấm CO<sub>2</sub> (INNOVA CO-170); Tủ cấy sinh học an toàn cấp II; Máy li tâm (Universal 320R); Kính hiển vi ngược (Zeiss); Tủ lạnh sâu -25°C, -80°C; Bồng đếm tế bào (Fisher, Hoa Kỳ); Máy quang phổ (Genios Tecan); Bình nitơ lỏng bảo quản tế bào và các dụng cụ thí nghiệm thông thường khác.

##### 4.2. Các dòng tế bào

Các dòng tế bào ung thư ở người được cung cấp bởi ATCC gồm: KB (*Human epidermic carcinoma*), ung thư bì ều mô, là dòng luôn luôn được sử dụng trong các phép thử độ độc tế bào; Hep G2 (*Hepatocellular carcinoma*) - ung thư gan; LU (*Human lung carcinoma*) - ung thư phổi và MCF-7 (*Human breast carcinoma*) - ung thư vú.

##### 4.3. Phương pháp

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*.

Các dòng tế bào ung thư nghiên cứu được nuôi cấy trong các môi trường nuôi cấy phù hợp có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (FBS) và các thành phần cần thiết khác ở điều kiện tiêu chuẩn (5% CO<sub>2</sub>; 37°C; độ ẩm 98%; vô trùng tuyệt đối). Tùy thuộc vào đặc tính của từng dòng tế bào khác nhau, thời gian cấy chuyển cũng khác nhau. Tế bào phát triển ở pha log sẽ được sử dụng để thử độc tính.

Thử độ độc tế bào: 200  $\mu\text{l}$  dung dịch tế bào ở pha log nồng độ  $3 \times 10^4$  tế bào/ml vào mỗi giếng (đĩa 96 giếng) trong môi trường RPMI 1640 cho các dòng tế bào HepG2, MCF7, KB; môi trường DMEM cho LU-1, mẫu thử được xử lý với tế bào ở các nồng độ pha loãng khác nhau sao cho đạt đến nồng độ cuối cùng là 12,8  $\mu\text{g/ml}$ ; 32  $\mu\text{g/ml}$ ; 8  $\mu\text{g/ml}$ ; 2  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Ủ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 3 ngày, giếng đối chứng gồm 200  $\mu\text{l}$  dung dịch tế bào  $3 \times 10^4$  tế bào/ml ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 3 ngày, thêm 50  $\mu\text{l}$  MTT (1 mg/ml pha trong môi trường nuôi cấy không huyết thanh), ủ 37°C trong 4 giờ. Loại bỏ môi trường, thêm 100  $\mu\text{l}$  DMSO lắc đều đọc kết quả ở bước sóng 540 nm trên máy spectrophotometer Genios TECAN.

Phần trăm kìm hãm sự phát triển của tế bào (Growth inhibition) =  $(OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu}}) / OD_{\text{đối chứng}}$ . Giá trị IC<sub>50</sub> được tính dựa trên kết quả số liệu phần trăm kìm hãm sự phát triển của tế bào bằng phần mềm máy tính table curve.

## II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Thử hoạt tính kháng sinh

Kết quả thử hoạt tính kháng sinh của các mẫu lá, vỏ thân, cành và rễ với các chủng vi sinh vật Gram (+), Gram (-) và nấm được trình bày ở Bảng 1 cho thấy lá, vỏ thân, cành và rễ có hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật gram (+), trong đó mẫu lá có hoạt tính mạnh nhất, giá trị IC<sub>50</sub> với chủng *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* lần lượt là 4,25; 3,65; 5,49 µg/ml.

Cặn chiết tổng methanol của các mẫu lá, vỏ thân, rễ và cành được thử hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật kiểm định đại diện cho các chủng vi khuẩn gram (-), gram (+) và nấm bằng phương pháp đã trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu. Kết quả được chỉ ra ở Bảng 1.

Bảng 1

**Kết quả thử hoạt tính kháng sinh của *Artocarpus nigrifolius***

Tên mẫu		Lá 388	Vỏ thân 388	Cành 388	Rễ 304	
Nồng độ ức chế 50% sự phát triển của vi sinh vật và nấm kiểm định, IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Gram (+)	<i>Lactobacillus fermentum</i>	4,25	91,43	>128	95,09
		<i>Bacillus subtilis</i>	3,65	71,62	>128	64,32
		<i>Staphylococcus aureus</i>	5,49	20,97	88,80	74,13
	Gram (-)	<i>Salmonella enterica</i>	>128	>128	>128	>128
		<i>Escherichia coli</i>	>128	>128	>128	>128
		<i>Pseudomonas</i>	>128	>128	>128	>128
	Nấm	<i>Candida albican</i>	>128	>128	>128	>128

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy các cặn chiết đều thể hiện hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn Gram (+), nhưng không kháng các chủng vi khuẩn Gram (-) và nấm. Đặc biệt cặn chiết lá mít có hoạt tính mạnh nhất với các giá trị ức chế 50% sự phát triển của vi khuẩn (IC<sub>50</sub>) *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus fermentum* lần lượt là 3,65; 5,49; 4,25 µg/ml. Kết quả này gợi ý cho việc sử dụng lá cây này như một kháng sinh thực vật kháng các chủng vi khuẩn Gram (+) gây bệnh.

### 2. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hoá DPPH

Theo tài liệu đã công bố thì thành phần hóa học của các loài trong chi này rất giàu nhóm polyphenol. Nhóm này có hoạt tính chống oxy hóa cao, do vậy chúng tôi đã tiến hành thử hoạt tính bẫy gốc tự do DPPH của các cặn chiết tổng methanol của lá, vỏ thân, rễ và cành. Kết quả đã được chỉ ra ở Bảng 2.

Bảng 2

**Hoạt tính chống oxy hoá của *Artocarpus nigrifolius***

TT	Ký hiệu mẫu	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
1.	Vỏ thân 308	42,08
2.	Lá 388	80,09
3.	Rễ 304	61,05
4.	Cành 388	>128
Đối chứng dương		Resveratrol
		8,50

Theo kết quả ở Bảng 2 cho thấy, cặn chiết methanol của mẫu vỏ thân, lá, rễ có hoạt tính chống oxy hóa bởi có mặt của các chất polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Đặc biệt

là mẫu vỏ mít có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất thể hiện ở nồng độ có hiệu quả bẫy gốc tự do DPPH ( $EC_{50}$ ) là 42,08  $\mu\text{g/ml}$ . Kết quả này gấp 5 lần so với chất tham khảo là resveratrol (chất này được sử dụng như là một chất chống oxy hóa hiệu quả). Do đó có thể tiến tới nghiên cứu sâu hơn để tìm kiếm hoạt chất có tác dụng chống oxy hóa có giá trị như resveratrol đã được tìm thấy trong quả nho.

### 3. Thử hoạt tính gây độc tế bào

Kết quả Bảng 3 chỉ ra rằng 4 cặn chiết methanol từ vỏ thân, lá, cành và rễ của *Artocarpus nigrifolius* đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 4 dòng ung thư thực nghiệm KB, HepG2, Lu và MCF7 sau 72 h nuôi cấy với các giá trị  $IC_{50}$  trong khoảng 10-86  $\mu\text{g/ml}$ . Trong đó, cặn chiết methanol từ cành thể hiện hoạt tính tốt nhất so với các cặn chiết khác với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 10,06 và 19,21  $\mu\text{g/ml}$  trên dòng tế bào HepG 2 và KB. Cặn chiết methanol từ rễ cho hoạt tính yếu với giá trị  $IC_{50}$  là 55,62-86,64  $\mu\text{g/ml}$ . Kết quả này là gợi mở cho những nghiên cứu tiếp theo về thành phần hoá học cũng như hoạt tính sinh học của loài này.

Bảng 3

Hoạt tính gây độc tế bào của các cặn dịch chiết các bộ phận loài *Artocarpus nigrifolius*

TT	Mẫu sử dụng	Dịch chiết	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )			
			KB	HepG2	Lu	MCF7
1.	Vỏ thân	methanol	21,03	52,45	56,20	20,10
2.	Lá	methanol	24,20	50,28	35,84	22,68
3.	Rễ	methanol	55,62	54,48	86,64	75,46
4.	Cành	methanol	19,21	10,06	71,66	46,03
Chất đối chứng <i>Ellipticine</i>			0,51-1,25			

### III. KẾT LUẬN

Kết quả thử hoạt tính kháng sinh của cặn chiết các mẫu lá, vỏ thân, cành và rễ đều thể hiện hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn Gram (+), nhưng không kháng các chủng vi khuẩn Gram (-) và nấm. Đặc biệt cặn chiết lá mít có hoạt tính mạnh nhất với các giá trị ức chế 50% sự phát triển của vi khuẩn ( $IC_{50}$ ) *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus fermentum* lần lượt là 3,65; 5,49; 4,25  $\mu\text{g/ml}$ .

Kết quả thử hoạt tính chống oxy hoá DPPH cho thấy, cặn chiết methanol của mẫu vỏ thân, lá, rễ có hoạt tính chống oxy hóa bởi có mặt của các chất polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Đặc biệt là mẫu vỏ mít có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất thể hiện ở nồng độ có hiệu quả bẫy gốc tự do DPPH ( $EC_{50}$ ) là 42,08  $\mu\text{g/ml}$ . Kết quả này gấp 5 lần so với chất tham khảo là resveratrol. Do đó có thể tiến tới nghiên cứu sâu hơn để tìm kiếm hoạt chất có tác dụng chống oxy hóa có giá trị như resveratrol đã được tìm thấy trong quả nho.

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào từ bốn cặn chiết methanol từ vỏ thân, lá, cành và rễ của *Artocarpus nigrifolius* đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 4 dòng ung thư thực nghiệm KB, HepG2, Lu và MCF7 sau 72 h nuôi cấy với các giá trị  $IC_{50}$  trong khoảng 10-86  $\mu\text{g/ml}$ . Trong đó, cặn chiết methanol từ cành thể hiện hoạt tính tốt nhất so với các cặn chiết khác với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 10,06 và 19,21  $\mu\text{g/ml}$  trên dòng tế bào HepG 2 và KB. Cặn chiết methanol từ rễ cho hoạt tính yếu với giá trị  $IC_{50}$  là 55,62-86,64  $\mu\text{g/ml}$ .

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Burits M., F. Bucar**, 2000: *Phytotherapy Research*, 14: 323-328.
2. **Cos P., L. Maes, J.B. Sindambiwe, A.J. Vlietinck, D.V. Berghe**, 2005: Bioassay for antibacterial and antifungal activities. University of Antwerp, Belgium, pp. 1-13.
3. **Cuendet M., K. Hostettmann, O. Potterat**, 1997: *Helvetica Chimica Acta*. 80: 1144-1152.
4. **Fresney R.I.**, 1993: Culture of animal Cells. A manual of basis techniques, 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley & Sons Inc., New York.
5. **Hadacek F., H. Greger**, 2000: *Phytochem. Anal.*, 90: 137-147.
6. **Nguyễn Tiên Bản (chủ biên)**, 2003: Danh lục các loài thực vật Việt Nam, tập 2: 176-179. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.
7. **Scudiero D.A., R.H. Shoemaker, D.P. Kenneth, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D. Seniff, M.R. Boyd**, 1988: *Cancer Reseach*, 48: 4827-4833.

### BIOLOGICAL ACTIVITY OF *ARTOCARPUS NIGRIFOLIUS* C. Y. Wu

TRAN MINH HOI, PHAM VAN THE, TRAN THANH AN, HA THI VAN ANH,  
NGUYEN THANH TRA, BA THI CHAM, LE THI TU ANH

#### SUMMARY

The present paper refers to some biological activities of *Artocarpus nigrifolius* C. Y. Wu found in Copia Nature Reserve, Son La province. The result of Bioassay for anti-biotic activity of the extract from leaf, stem bark, branch and root of *Artocarpus nigrifolius* C. Y. Wu which exhibit an anti-biotic activity with the inhibition value 50% of the development (IC<sub>50</sub>) *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus fermentum*: 3.65; 5.49; 4.25 µg/ml, respectively but not with *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The result of Bioassay for anti-oxidant DPPH shows that, the methanol extracted from stem bark, leaf, root exhibit an anti-oxidant activity. Especially, extract from stem bark shows a higher anti-oxidant activity (42.08 µg/ml). This result is five times in comparison with reservation. Four methanol extracts from leaf, stem bark, branch and root of *Artocarpus nigrifolius* C. Y. Wu exhibit an anti-oxidant activity with four strains KB, HepG2, Lu and MCF7 after 72 hours in culture with IC<sub>50</sub> value between 10 µg/ml - 86 µg/ml. Among them, the extract from branch shows a better activity in comparison with other extracts IC<sub>50</sub> value 10.06 µg/ml and 19.21 µg/ml in HepG2 and KB, respectively. The methanol extract from root shows a low activity with IC<sub>50</sub> value 55.62 µg/ml (in KB) and 86.64 µg/ml (in Lu).

Based on these bio-assay results, the subsequent studies on the chemical composition of this species will be opened.