

Khảo sát hoạt tính kháng *Candida* spp. của cao Tràu riêng rẽ và phối hợp với miconazol

Lê Văn Kim Anh, Phạm Bền Chí*

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

*pbchi@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Hiện nay, tỉ lệ *Candida* spp. đề kháng với miconazol ngày càng cao. Để đạt được hiệu quả điều trị, cần tăng liều hoặc tăng số lần dùng của miconazol trong ngày, tuy nhiên lại gây nhiều tác dụng phụ trên gan, thận. Do đó, xu thế phát triển hiện nay là sử dụng dược liệu dạng riêng rẽ hoặc phối hợp với các thuốc hóa dược nhằm cải thiện vấn đề này. Đề tài này được thực hiện nhằm chứng minh hiệu quả phối hợp của cao lá Tràu (*Piper betle* L. Piperaceae) với miconazol trên các chủng *Candida* spp. Lá Tràu được nghiên cứu qui trình chiết xuất và tinh chế với các dung môi rơ, thân thiện (cồn, nước). Bằng phương pháp khuếch tán giếng, vi pha loãng trong môi trường MHA bổ sung glucose 2 % theo hình bàn cờ, cao Tràu tinh chế kháng *C. albicans* ATCC 10231 và các chủng phân lập từ mẫu bệnh phẩm (*C. albicans* 01, *C. krusei* 8TX, *C. tropicalis* 58) với MIC là 2000 µg/mL. Phối hợp cao Tràu tinh chế và miconazol cho tương tác cộng lực trên 2 chủng *C. albicans*, và tác động riêng rẽ trên 2 chủng còn lại.

Nhận 24.11.2020
Được duyệt 30.11.2020
Công bố 30.12.2020

Từ khóa
Candida spp.,
miconazol, Tràu, *Piper betle*, cộng lực

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Mở đầu

Từ lâu, lá Tràu (*Piper betle* L. Piperaceae) đã được dân gian sử dụng để điều trị bệnh đẹn miệng do *Candida* spp gây ra. Miconazol là thuốc kháng nấm thuộc nhóm azol được chỉ định rất thường xuyên tại Việt Nam để điều trị bệnh nhiễm *Candida* nhưng hiện nay bị đề kháng rất nhiều. Với mong muốn phát triển nguồn dược liệu tự nhiên tại Việt Nam cũng như giảm bớt tình trạng lạm dụng miconazol, nghiên cứu này được thực hiện để chứng minh tác dụng kháng *Candida* spp *in vitro* của phối hợp cao Tràu và miconazol để làm cơ sở khoa học cho việc xây dựng các dạng bào chế dùng ngoài như kem đánh răng, nước súc miệng, kem bôi da để điều trị các bệnh lí do *Candida* spp. gây ra.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu:

Lá Tràu được thu mua tại Hóc Môn, Tp. Hồ Chí Minh vào tháng 5/2019

Nguyên liệu miconazol nitrat, xuất xứ Ấn Độ

Vi nấm thử nghiệm: *C. albicans* ATCC 10231, các chủng *C. albicans* 01, *C. tropicalis* 58, *C. krusei* 8TX được phân lập từ mẫu niêm mạc miệng bệnh nhân ung thư [1]

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Sơ bộ định danh dược liệu thu mua

Lá Tràu được định danh sơ bộ bằng cách khảo sát các đặc điểm hình thái, giải phẫu và so sánh với tài liệu tham khảo [2].

2.2.2 Khảo sát qui trình chiết xuất và tinh chế cao Tràu

Với định hướng sử dụng cao dược liệu để bào chế các dạng chế phẩm nên nghiên cứu này chỉ sử dụng các dung môi có sẵn, rẻ tiền, không độc hại là cồn 96 % và nước.

Đun hồi lưu lá Tràu tươi với nước trong 3 giờ, tỉ lệ dược liệu : nước (1 g : 5 mL), để thu được dịch chiết nước nóng. Sau đó cô dịch chiết nước nóng đến khoảng 1/10 thể tích, thu được dịch C₀ [3]. Tiến hành khảo sát thể tích cồn 96 % ở mức (1, 3, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 120, 140) mL thêm vào 5 mL dịch C₀ để thu được các dịch C_i và tủa T_i. Rửa tủa T_i với nước 3 lần, sấy khô ở 70 °C. Dịch C_i được cô cạn trên bếp cách thủy ở 70 °C, thu được cao C_i.

Tiến hành theo dõi khối lượng, hoạt tính kháng *C. albicans* ATCC 10231 của các tủa T_i, cao C₀ và C_i bằng phương pháp khuếch tán để tìm ra phân đoạn tối ưu nhất. Phân đoạn này là cao Tràu tinh chế.

2.2.3 Khảo sát hoạt tính kháng *Candida* spp. của cao Tràu và miconazol

2.2.3.1 Phương pháp khuếch tán giếng [4]



Môi trường thử nghiệm: Môi trường MHA bổ sung 2 % glucose. Vi nấm sau khi hoạt hóa và phân lập trên môi trường SDA ở 37 °C trong 48 giờ, được phân tán trong nước muối sinh lí bổ sung 0,05 % tween 80 để đạt mật độ $(1 - 5) \times 10^6$ CFU/mL. Dùng que bông vô trùng thấm huyền dịch vi nấm và trải đều trên bề mặt thạch. Dùng dụng cụ chuyên dụng đục các giếng. Mẫu thử gồm các cao và tủa được pha trong dung môi DMSO 10 % (hoặc nước) để đạt nồng độ 100 mg/mL, chứng âm DMSO 10 %. Tiến hành nhỏ 60 µL mẫu thử vào các giếng. Ủ ở 37 °C trong 48 giờ, ghi nhận đường kính vùng ức chế. Lặp lại 3 lần để lấy giá trị trung bình.

2.2.3.2 Phương pháp vi pha loãng trong môi trường thạch nấu chảy [5].

Phương pháp này dùng để xác định nồng độ tối thiểu ức chế sự phát triển *Candida* spp. của cao Tràu tinh chế, miconazol.

Môi trường thử nghiệm: MHA bổ sung 2 % glucose
 Mẫu thử: cao Tràu tinh chế, miconazol pha dung dịch mẹ trong DMSO, sau đó tiến hành pha loãng với môi trường thành dãy nồng độ thử nghiệm giảm dần theo cấp số 2 trong bảng nhựa 96 giếng:

- + Cao Tràu tinh chế: dung dịch mẹ 80.000 µg/mL. Dãy nồng độ thử nghiệm: (7,8125 - 8.000) µg/mL
- + Miconazol: dung dịch mẹ 12.800 µg/mL. Dãy nồng độ thử nghiệm: (0,125 – 128) µg/mL

Vi nấm thử nghiệm được chuẩn bị như 2.2.3.1, sau đó hút 10 µL huyền dịch vi nấm lên trên bề mặt mỗi giếng để đạt được số lượng 10^4 CFU.

Giá trị MIC là nồng độ thấp nhất tại đó ức chế vi nấm mọc trên bề mặt thạch. Lặp lại thí nghiệm 3 lần để lấy giá trị trung bình.

2.2.3.4 Phương pháp vi pha loãng theo hình bàn cờ [6].

Phương pháp này dùng để xác định hiệu quả của phối hợp cao Tràu tinh chế và miconazol. Mẫu thử nghiệm được pha loãng liên tục 1/2 trong môi trường thử nghiệm (hoặc bổ sung DMSO sao cho nồng độ trong giếng không quá 1 %) thành 2 dãy nồng độ từ cao đến thấp trong bảng nhựa 96 giếng:

- + Miconazol: 128 µg/mL – 0,25 µg/mL (từ ô A2 đến ô A11)
- + Cao Tràu tinh chế: từ 8.000 µg/mL – 250 µg/mL (từ ô B1 đến G1)

Tiến hành phối hợp lần lượt từng nồng độ miconazol và cao Tràu tinh chế trong các giếng từ B2 đến G11. Mỗi giếng chứa 100 µL gồm 50 µL cao Tràu tinh chế, 1 µL miconazol và 49 µL môi trường thử nghiệm.

Vi nấm thử nghiệm được chuẩn bị giống mục 2.2.3.2. Sau 48 giờ ủ ở 37 °C, xác định MIC riêng rẽ, MIC phối hợp để tính hệ số FIC:

$$FIC = \frac{MIC_A \text{ trong phối hợp}}{MIC_A} + \frac{MIC_B \text{ trong phối hợp}}{MIC_B}$$

$FIC \leq 0,5$: hiệp lực bội tăng

$0,5 < FIC \leq 1$: cộng lực

$1 < FIC \leq 4$: tác dụng riêng rẽ

$4 < FIC$: đối kháng

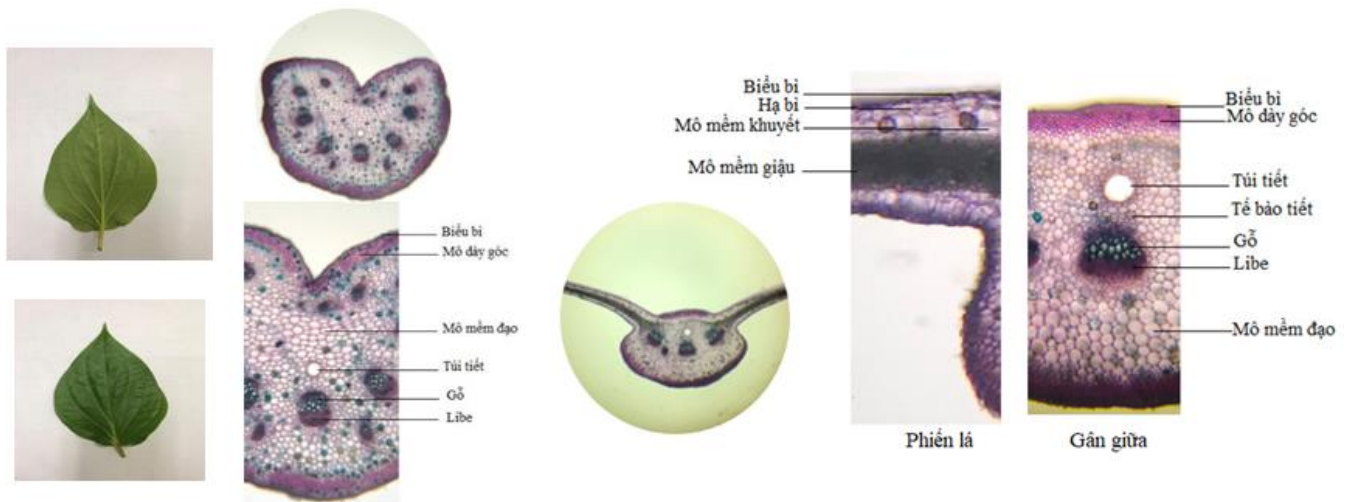
		Miconazol											
Cao Tràu tinh chế		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A		MIC 128 – 0,25 µg/mL										
	B	MIC 8000 – 250 µg/mL	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	Chứng âm
	C		C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	
	D		D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	
	E		E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	
	F		F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	
	G		G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	

Hình 1 Bảng nhựa 96 giếng trong phương pháp vi pha loãng theo hình bàn cờ

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Sơ bộ định danh dược liệu thu mua

Các đặc điểm hình thái và giải phẫu ghi nhận phù hợp với các nghiên cứu của Pradhan D và cộng sự, chứng tỏ dược liệu thu mua được là lá Tràu [7].



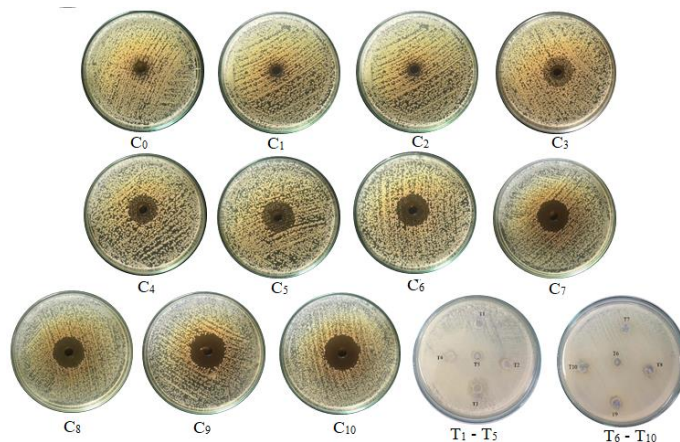
Hình 2 Đặc điểm hình thái và giải phẫu lá Trà thu mua được

3.2 Quy trình chiết xuất và tinh chế cao Trà

Để tìm ra quy trình chiết xuất và tinh chế cao Trà, cần theo dõi khối lượng và hoạt tính kháng *C. albicans* ATCC 10231 của các cao C_0 , C_i và tủa T_i . Kết quả được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 3.

Bảng 1 Khối lượng và đường kính vùng ức chế trung bình của tủa và cao phân đoạn Trà

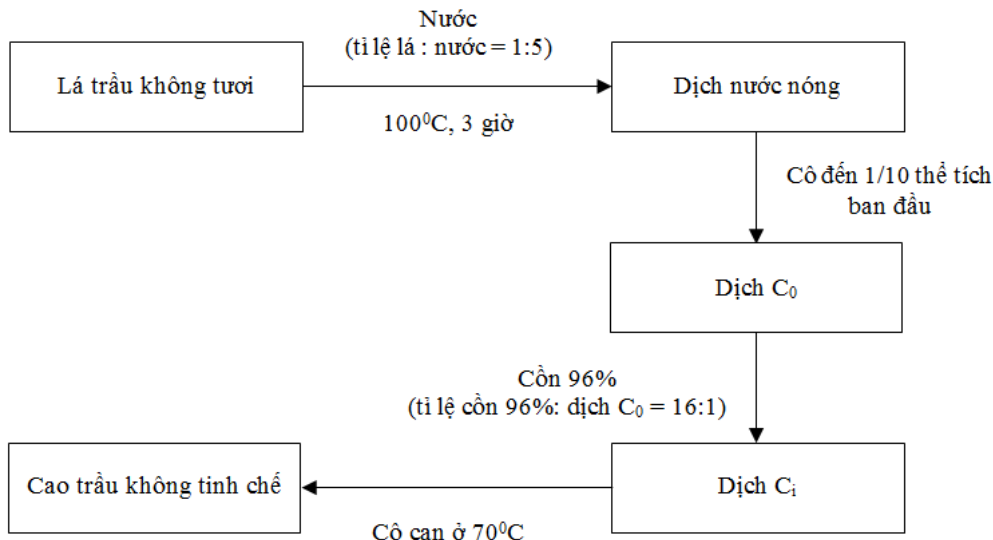
Thể tích cồn 96 % thêm vào (mL)	Tủa T_i		Cao C_i	
	Khối lượng (g)	Đường kính vùng ức chế trung bình (mm)	Khối lượng (g)	Đường kính vùng ức chế trung bình (mm)
0	0	0	$C_0 = 0,6439$	11
1	$T_1 = 0,0147$	0	$C_1 = 0,6379$	10,83
3	$T_2 = 0,0426$	0	$C_2 = 0,6156$	11
5	$T_3 = 0,0508$	0	$C_3 = 0,6033$	11,5
10	$T_4 = 0,1034$	0	$C_4 = 0,555$	11,33
20	$T_5 = 0,1401$	0	$C_5 = 0,4379$	12,33
40	$T_6 = 0,1822$	0	$C_6 = 0,4029$	13,17
80	$T_7 = 0,1829$	0	$C_7 = 0,3681$	21,83
100	$T_8 = 0,1819$	0	$C_8 = 0,4136$	23,83
120	$T_9 = 0,1831$	0	$C_9 = 0,3996$	23,67
140	$T_{10} = 0,1847$	0	$C_{10} = 0,4197$	25,33



Hình 3 Vùng ức chế *C. albicans* ATCC 10231 của cao, tủa Trà

Nhìn chung, thể tích còn 96 % thêm vào càng nhiều thì lượng tủa càng tăng. Các tủa T_i không cho vùng ức chế, chúng tỏ chúng không có hoạt tính. Các cao C_0 và C_i cho vùng ức chế với đường kính vùng ức chế trung bình tăng dần từ C_0 đến C_{10} . Đường kính vùng ức chế cao C_7 (tỉ lệ còn 96 % : dịch chiết đậm đặc = 16 : 1) lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với các cao $C_0 - C_6$ ($p < 0,05$). Mặc dù các cao C_8, C_9 có đường kính vùng ức chế lớn hơn nhưng sự khác biệt

không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Cao C_{10} có đường kính vùng ức chế lớn hơn C_7 có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) nhưng để có được cao C_{10} , thể tích còn 96 % thêm vào 5 mL dịch chiết đậm đặc là 140 mL (tỉ lệ 28 : 1), là một lượng rất lớn, gây tốn kém khi nâng cấp qui mô tinh chế sau này. Qui trình chiết xuất và tinh chế cao Trà được mô tả ở Hình 4.



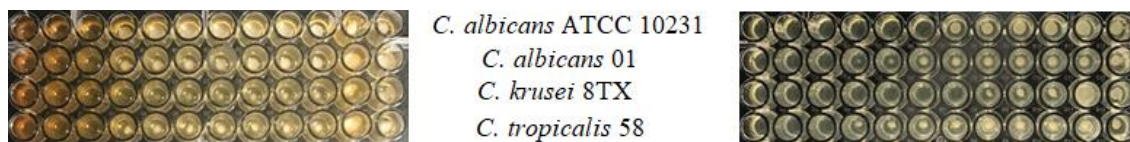
Hình 4 Qui trình chiết xuất và tinh chế cao Trà

3.3 Hoạt tính kháng *Candida* spp. của cao Trà tinh chế và miconazol

Hoạt tính kháng *Candida* spp. của cao Trà tinh chế và miconazol riêng rẽ được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 5.

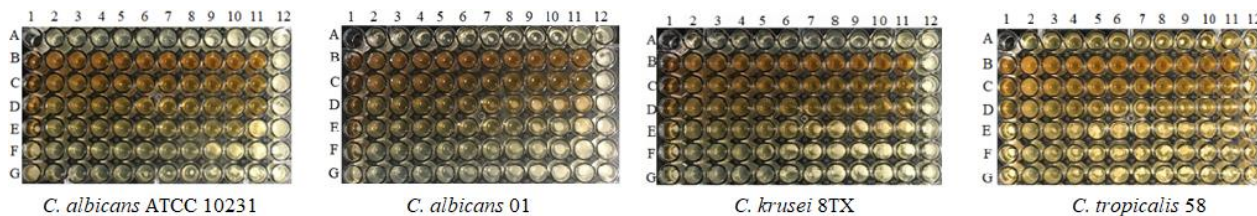
Bảng 2 Giá trị MIC của cao Trà tinh chế và miconazol ($\mu\text{g/mL}$)

	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> 01	<i>C. krusei</i> 8TX	<i>C. tropicalis</i> 58
Cao TK tinh chế	2000	2000	2000	2000
Miconazol	4	32	2	32



Hình 5 Bảng nhựa 96 giếng trong thử nghiệm MIC cao Trà tinh chế và miconazol

Hoạt tính kháng *Candida* spp. của phối hợp cao Trà tinh chế và miconazol được thể hiện ở các Bảng 3 và Hình 6.



Hình 6 Bảng nhựa 96 giếng trong thử nghiệm xác định MIC cao Trà tinh chế và MCZ trong phối hợp

Bảng 3 Tác động kháng *Candida* spp. của phối hợp cao Trầu tinh chế và miconazol

Chủng	Giếng xác định MIC	MIC trong phối hợp ($\mu\text{g/mL}$) (Cao TK : MCZ)	FIC	Tác động	Tỉ lệ nồng độ cao TK - MCZ
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	E10	1000 : 0,5	0,625	Cộng lực	2000 : 1
	E9	1000 : 1	0,75		1000 : 1
	E8	1000 : 2	1		500 : 1
	F8	500 : 2	0,75		250 : 1
<i>C. albicans</i> 01	E5	1000 : 16	1	Cộng lực	62,5 : 1
	E6	1000 : 8	0,75		125 : 1
	E7	1000 : 4	0,625		250 : 1
	E8	1000 : 2	0,562		500 : 1
	F6	500 : 8	0,5	Hiệp lực	62,5 : 1
<i>C. krusei</i> 8TX	B9	8000 : 1	4,5	Đối kháng	8000 : 1
	B10	8000 : 0,5	4,25		16000 : 1
	C9	4000 : 1	2,5	Riêng rẽ	4000 : 1
	C10	4000 : 0,5	2,25		8000 : 1
<i>C. tropicalis</i> 58	B5	8000 : 16	4,5	Đối kháng	8000 : 1
	B6	8000 : 8	4,25		16000 : 1
	C5	4000 : 16	2,5	Riêng rẽ	4000 : 1
	C6	4000 : 8	2,25		8000 : 1

Căn cứ vào các giá trị FIC cho thấy:

Trên chủng *C. albicans* ATCC 10231, cao Trầu tinh chế tương tác cộng lực với miconazol ở các tỉ lệ nồng độ 2.000 : 1, 1.000 : 1, 500 : 1 và 250 : 1. Trong phối hợp, cao Trầu tinh chế làm giảm MIC riêng rẽ của miconazol xuống (2 – 8) lần, miconazol làm giảm MIC của cao Trầu tinh chế riêng rẽ xuống (2 – 4) lần.

Trên chủng *C. albicans* 01, cao Trầu tinh chế tương tác cộng lực với miconazol ở các tỉ lệ nồng độ 125 : 1, 250 : 1, 500 : 1. Mặc dù có cùng tỉ lệ nồng độ cao Trầu tinh chế - miconazol (62,5 : 1), nhưng ở những nồng độ cao Trầu 500 $\mu\text{g/mL}$, miconazol 8 $\mu\text{g/mL}$ lại cho tương tác hiệp lực. Trong phối hợp, cao Trầu tinh chế làm giảm MIC riêng rẽ của miconazol xuống (2 – 16) lần, miconazol làm giảm MIC của cao Trầu tinh chế riêng rẽ xuống (2 – 4) lần.

Cao Trầu tinh chế tương tác riêng rẽ hoặc đối kháng với miconazol trên *C. krusei* 8TX và *C. tropicalis* 58.

4 Kết luận

Tóm lại, nghiên cứu này đã tìm được qui trình chiết xuất và tinh chế cao Trầu định hướng hoạt tính kháng *C. albicans* ATCC 10231. Mặc dù cao Trầu tinh chế thu được có MIC

lớn gấp 7,8 lần so với cao DCM (MIC = 256 $\mu\text{g/mL}$) [3] nhưng ở nghiên cứu này, chỉ sử dụng các dung môi an toàn, rẻ tiền, thân thiện với môi trường (cồn, nước) nên sẽ tiện lợi, tiết kiệm và dễ áp dụng hơn khi nâng cấp qui mô. Hơn thế nữa, cao Trầu tinh chế thu được sẽ không cần khảo sát chỉ tiêu dư lượng dung môi tồn dư khi xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, giúp đơn giản hóa hơn trong công tác tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm.

Đề tài này cũng đã chứng minh được hoạt tính kháng *Candida* spp. của cao Trầu tinh chế (MIC = 2.000 $\mu\text{g/mL}$), đồng thời cũng tìm ra được tỉ lệ phối hợp cho tương tác cộng lực của cao Trầu tinh chế và miconazol trên chủng *C. albicans* – chủng gây bệnh phổ biến nhất. Các kết quả này là tiền đề để tiếp tục thực hiện các nghiên cứu trên mô hình *in vivo* cũng như khảo sát các độc tính của chúng trước khi ứng dụng bào chế các sản phẩm điều trị các bệnh lí do *C. albicans* gây ra.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công Nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành trong đề tài mã số 2020.01.092

Tài liệu tham khảo

1. Đinh Quang Long, Phạm Bền Chí (2020), "*Khảo sát tính nhạy cảm của một số chủng Candida spp. phân lập từ miệng bệnh nhân ung thư với một số thuốc kháng nấm*", Tạp chí khoa học và công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành.(10), tr.52-57.
2. Trần Hùng (2004), "*Phương pháp nghiên cứu dược liệu*", Đại học Y Dược Tp. HCM.
3. Phan Thị Thanh Thủy, Nguyễn Đình Nga (2012), "*Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao chiết nước lá Trầu không (Piper betle L. Piperaceae)*", Luận văn Thạc sĩ Dược học, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh.
4. Balouiri M. et al. (2016), "*Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*", Journal of Pharmaceutical Analysis. 6 (2), pp. 71-79.
5. Golus J. et al. (2016), "*The agar microdilution method—a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts*", Journal of Applied Microbiology. 121 (5), pp. 1291-1299.
6. Ernst E. J. et al. (2005), *Antifungal agents: methods and protocols*, Vol. 118, Springer Science & Business Media.
7. Pradhan D. et al. (2013), "*Golden Heart of the Nature: Piper betle L*", Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 1 (6).

The study on anti – *Candida* activities of Piper betle's extract in dependence and combination with miconazole

Le Van Kim Anh, Pham Ben Chi*

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

*pbchi@ntt.edu.vn

Abstract In recent years, *Candida* spp. has a high rate of resistance against miconazole. To achieve a therapeutic effect, it is necessary to increase either the dose or the frequency of administration of miconazole, but it can cause many side effects on the liver and kidneys. Therefore, studies have tended to focus on natural medicinal products to replace or combine with chemical medicines to solve this problem. This study was conducted to assess the antifungal activity of the betle - extract in independence and combination with miconazole on *Candida* spp. The process of extraction and purification from betle leaves were studied using cheap, and safe solvents (alcohol, water). Via agar microdilution method in MHA added with 2 % glucose, the purified extract had an MIC value of 2000 µg/m: on the 4 strains of *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* 01, *C. krusei* 8TX and *C. tropicalis* 58. With checkerboard assay, the combination of purified betel extract and miconazole demonstrated synergistic effect and additive effect on 2 strains of *C. albicans*, and separated effect on the other 2 strains.

Keywords *Candida* spp., *Piper betle*, additive effect, miconazole, betle leave