

ĐÁNH GIÁ HIỆU SUẤT CHIẾT VÀ TÁC DỤNG CỦA CAO CHIẾT TỪ GỖ TÔ MỘC (*Caesalpinia sappan* L.) TRONG DUNG MÔI ETHANOL VỚI VI KHUẨN *Escherichia coli*

Nguyễn Tấn Đạt, Nguyễn Bá Tiếp*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: nbtiep@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 30.05.2016

Ngày chấp nhận: 16.10.2016

TÓM TẮT

Chiết xuất thử nghiệm gỗ Tô mộc chế nhỏ bằng phương pháp ngâm kiệt với dung môi ethanol 96% và cất thu hồi còn ở nhiệt độ 80 - 90°C cho hiệu suất chiết trung bình 6,80%. Dung dịch chiết pha loãng của cao Tô mộc 5 µg và 10 µg đều có tác dụng ức chế vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) nhưng kém hơn so với các kháng sinh: Doxycycline, Ciprofloxacin và Colistin. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cao Tô mộc và các kháng sinh Doxycycline, Ciprofloxacin và Colistin với chủng *E. coli* chuẩn cao hơn so với chủng *E. coli* phân lập từ gà bệnh. Tác dụng kháng khuẩn phụ thuộc vào hàm lượng cao chiết. Chế phẩm cao Tô mộc 10% có tác dụng phòng và trị bệnh do *E. coli* trên gà Lương Phượng gây nhiễm thực nghiệm. Kết quả này là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng phòng và trị bệnh của các chất chiết từ Tô mộc.

Từ khóa: *E. coli*, gà Lương Phượng, hiệu suất chiết, kháng khuẩn, Tô mộc.

Assessment of Extraction Efficacy and Antibacterial Activity of Ethanol Extract of *Caesalpinia sappan* L. against *Escherichia coli*

ABSTRACT

Maceration extraction of *Caesalpinia sappan* L. (CS) in ethanol solvent (96%) followed by steam distillation at 80 - 90°C resulted in an average extract efficacy of 6.80%. Ten percent extract solution showed inhibitory effects on *E. coli*. The effects were concentration-dependent and higher on standard *E. coli* strain in comparison to those on chicken-derived isolates. The strain dependent inhibition was similarly observed for doxycycline, ciprofloxacin and colistin. The 10% solution of CS extract exerted preventive and treatment effects on experimental infection with *E. coli* in Yellow-feather chickens. The results can be considered as scientific basis for further studies on prevention and treatment potential of CS extracts.

Keywords: Antibacterial effect, *Caesalpinia sappan* L., *E. coli*, extract efficacy, Yellow-feather chickens.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đa số kháng sinh được sử dụng đều nhằm điều trị nhiễm trùng do vi khuẩn. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh không đúng cách đã dẫn đến tình trạng kháng kháng sinh và làm giảm, thậm chí mất hiệu quả điều trị của chúng. Ngoài ra, sử dụng kháng sinh còn gây ra các tác dụng không mong muốn như quá mẫn, suy giảm miễn dịch, tồn dư trong sản phẩm động vật gây ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng (Iram *et al.*,

2016; Fortman và Mukhopadhyay, 2016). Trong khi đó, sử dụng các kháng sinh mới, kháng sinh phổ rộng lại có chi phí cao. Từ những nhược điểm trên cho thấy cần tìm kiếm các chế phẩm phối hợp hoặc thay thế kháng sinh trong điều trị. Kháng sinh nguồn gốc thực vật là một trong những nhóm chế phẩm đáp ứng yêu cầu này (Wisatre, 2005; Hemalatha *et al.*, 2016). Sử dụng thảo dược là một phần trong nền y học Việt Nam, vừa mang tính tự phát và đại chúng vừa mang tính hệ thống (Wahlberg, 2006;

Woerdenbag *et al.*, 2012). Với xu hướng chủ động nguồn nguyên liệu dược liệu trong nước, đã có nhiều nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của những cây thuốc Việt Nam (Woerdenbag *et al.*, 2012; Vu *et al.*, 2015).

Vị thuốc Tô mộc là gỗ phơi khô của cây Gỗ vang hay cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.; hình 1), có nhiều ở các tỉnh phía Bắc (Đỗ Tất Lợi, 2015). Sau khi thu hoạch, phần gỗ giác trắng được gọt bỏ, lấy phần gỗ đỏ bên trong, chia thành khúc và chẻ ra thành mảnh nhỏ, phơi hoặc sấy khô (Dược điển Việt Nam IV, 2009). Tô mộc vị ngọt, bình, không độc, tác dụng vào 3 kinh tâm, can và tì, tác dụng hoạt huyết, thông kinh hoạt lạc, khử ú, chỉ thống, tán phong hòa huyết, được dùng làm thuốc săn da và cầm máu trong các trường hợp xuất huyết tử cung, mất máu sau sinh, choáng váng, hoa mắt. Theo Phòng Đông y thực nghiệm, Viện Vi trùng Việt Nam (trích theo Đỗ Tất Lợi, 2015), nước sắc Tô mộc có tác dụng kháng với vi trùng *Staphylococcus* 209P (vòng vô khuẩn 1,2cm), *Salmonella typhi* (0,4 cm), *Shiga flexneri* (0,7 cm), *Shigella sonnei* (0,2 cm), *Shigella dysenteria shiga* (1 cm) và *Bacillus subtilis* (1 cm). Tác dụng kháng sinh của Tô mộc lại không mất đi dưới tác dụng của dịch vị và dịch tụy. Đến nay, chưa có nhiều kết quả nghiên cứu về tác dụng của Tô mộc trong thú y. Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá hiệu quả của phương pháp ngâm kiệt để chiết xuất cao Tô mộc và dùng dung dịch cao Tô mộc phòng và trị bệnh do *E. coli* trên gà Lương Phượng.



Hình 1. Lá và quả Tô mộc

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu cho chiết xuất Tô mộc

- Dược liệu tô mộc: 200 kg (tiêu chuẩn Dược Điển Việt Nam IV) với các đặc điểm: thanh gỗ Tô mộc hình trụ hay nửa trụ tròn có đường kính từ 3 - 12 cm, dài khoảng 10 cm, màu đỏ vàng đến đỏ nâu, thường có khe nứt dọc; mặt cắt ngang hơi bóng, vòng tuổi thấy rõ rệt với màu da cam, có thể thấy màu nâu tối, có các lỗ mạch gỗ nhỏ; dễ tách thành từng mảnh theo thớ gỗ, tủy có lỗ rõ, có thể có những chỗ có màu nhạt hay đậm hơn; chất gỗ cứng, nặng, không mùi, vị hơi se (Hình 2).

- Ethanol 96%

- Thiết bị: Bồn ngâm chiết; thiết bị chiết suất, thiết bị cô cao và thu hồi dung môi bằng nồi cất 3 lớp chất liệu Inox Sus316.

2.1.2. Vật liệu thực hiện kháng sinh đồ

- Cao chiết Tô mộc thành phẩm.

- *E. coli* giống gốc (*E. coli* ATCC 25922) do công ty TNHH TM - SX Nu Pha cung cấp.

- Vi khuẩn *E. coli* phân lập từ gà mắc bệnh do *E. coli* được Trường đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

- Môi trường thực hiện kháng sinh đồ: MHA (Mueller - Hinton Agar) do TITAN BIOTECH LTD sản xuất.

- Đĩa giấy tẩm kháng sinh (Công ty TNHH Nam Khoa cung cấp) gồm: Amoxicillin (Ax), Ciprofloxacin (Ci), Colistin (Co), Doxycycline (Dx).



Hình 2. Dược liệu Tô mộc

Đánh giá hiệu suất chiết và tác dụng của cao chiết từ gỗ tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) trong dung môi ethanol với vi khuẩn *Escherichia coli*

- Đĩa giấy tẩm dung dịch cao Tô mộc ở các nồng độ khác nhau (sau khi có sản phẩm chiết) có đường kính bằng đường kính của các đĩa kháng sinh.

2.1.3. Gà thí nghiệm

Gà Lương Phượng 1 - 37 ngày tuổi do trại chăn nuôi An Đô cung cấp. Gà được nuôi bằng thức ăn tự trộn, không chứa kháng sinh, được chủng ngừa bệnh Newcastle và viêm phế quản truyền nhiễm (IB) vào 7 và 14 ngày tuổi; phòng Gumboro vào 10 và 21 ngày tuổi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết ngâm kiệt và bào chế cao Tô mộc

Mỗi mẻ được liệu Tô mộc (20 kg) được ngâm trong 80 kg ethanol 96% (tương đương 101,4 lít) trong 72 giờ ở nhiệt độ 70°C, sau đó tách dịch phân chiết (bước này được lặp lại 6 lần). Gộp tất cả dịch chiết của 6 lần đem chưng cất thu hồi dung môi ở nhiệt độ 80 - 90°C thu được cao chiết Tô mộc. Trong thí nghiệm này, 200 kg Tô mộc được ngâm chiết và chưng cất sau 10 mẻ. Cô đặc dịch chiết của 10 mẻ sẽ thu được cao Tô mộc khô toàn phần. Hoàn tất sản phẩm cao Tô mộc khô toàn phần thành dạng dung dịch 10% cao chiết theo công thức phối hợp (Bảng 1) với các bước: (i) Cho 500 g propylene glycol vào 400g nước cất; (ii) Gia nhiệt hỗn hợp dung môi đến 80°C; (iii) Hòa tan lượng cao chiết vào hỗn hợp dung môi cho đến khi tan hết; (iv) Làm mát dung dịch về nhiệt độ phòng; (v) Bổ sung lượng propylene glycol đến 1.000 ml và (vi) Đóng chai HDPE có dung tích 500 ml.

Bảng 1. Công thức bào chế cao Tô mộc 10%

Thành phần	Lượng
Cao chiết Tô mộc toàn phần	105 gam
Propylen glycol	500 gam
Nước cất	400 gam
Propylen glycol	Vừa đủ, đến 1.000 ml

2.2.2. Đánh giá tác dụng của cao chiết xuất Tô mộc với *E. coli*

Dùng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (môi trường Mueller - Hinton Agar,

MHA), theo hướng dẫn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). Đĩa giấy có đường kính 6 mm được hấp tiệt trùng (121°C trong 15 phút) và sấy khô. Sau đó, đĩa giấy được tẩm dung dịch cao chiết ở hai hàm lượng (i) 5 µl dung dịch cao chiết tương đương với 5 µg được liệu và (ii) 10 µl dung dịch cao chiết tương đương với 10 µg được liệu (sử dụng micropipette để hút dịch chiết đã pha loãng ở nồng độ thích hợp nhỏ trên đĩa giấy). Vòng vô khuẩn do dung dịch cao chiết được so sánh với vòng vô khuẩn của các kháng sinh Amoxicillin (10 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Colistin (10 µg) và Doxycycline (30 µg).

2.2.3. Đánh giá hiệu quả phòng và trị bệnh của chế phẩm cao Tô mộc 10% trên gà

Gà thí nghiệm nuôi đến 28 ngày tuổi sẽ phân lô thí nghiệm. Gà lô thí nghiệm cho uống dịch chiết tô mộc ở ngày thứ 28, sau đó đến ngày 30 cho cả 3 lô uống dung dịch vi khuẩn *E. coli* gây dung huyết phân lập từ gà bệnh với liều 3 ml/con. Mỗi 1 ml dung dịch vi khuẩn *E. coli* chứa khoảng $1 - 3 \times 10^8$ tế bào vi khuẩn (chọn 3 khuẩn lạc có kích thước đồng đều trên đĩa NA cho vào ống nghiệm vô trùng có chứa 3 ml nước sinh lý vô trùng, trộn bằng vortex. Sau đó đo độ đục với ống Mc Farland 0,5 trên nền tờ giấy trắng có vạch đen và điều chỉnh với nước muối sinh lý). Sử dụng syringe 5ml vô trùng bơm 3ml dung dịch chứa vi khuẩn *E. coli* vào vùng sau hầu từng con gà. Theo dõi tỷ lệ bệnh, tỷ lệ chết của gà sau 7 ngày gây bệnh; mổ khám và phân lập vi khuẩn *E. coli* những gà chết.

Bố trí thí nghiệm: Bốn lô gà 28 ngày tuổi (10 con/lô) bao gồm: Lô TN1 uống chế phẩm Tô mộc 10% với liều 1 ml/10kg/ngày, bắt đầu từ ngày 28 cho đến ngày 30 (hòa tan trong nước uống, với lượng nước uống vừa đủ uống trong hai tiếng đối với gà thí nghiệm). Sau 2 giờ, cho uống vi khuẩn *E. coli* với liều 3 ml/con. Lô TN2 uống liều 3 ml vi khuẩn *E. coli*/con; cho uống chế phẩm cao Tô mộc 10% với liều 1 ml/10kg 6 giờ sau khi gây nhiễm. Lô chứng dương cho uống vi khuẩn *E. coli* với liều 3 ml/con (uống 1 lần duy nhất). Lô chứng âm không cho uống vi khuẩn *E. coli* hay dịch cao Tô mộc 10%. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần (Bảng 2).

Bảng 2. Bố trí phòng và trị bệnh bằng chế phẩm Tô mộc 10% trên gà

Tuổi gà (ngày)	Can thiệp	Lô TN1 (n = 10)	Lô TN2 (n = 10)	Đối chứng dương (n = 10)	Đối chứng âm (n = 10)
28	Tô mộc 10% (1 ml/10kg)	Có	Không	Không	Không
30	Uống vi khuẩn <i>E. coli</i> (1 - 3x10 ⁸ tế bào/ml)	Có	Có	Có	Không
30 - 37	Chế phẩm Tô mộc 10% (1 ml/10kg)	Không	Có	Không	Không

2.2.4. Phân tích số liệu

Số liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0 San Diego CA. Sai khác có ý nghĩa được xác định ở mức tin cậy ≥ 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chiết xuất cao dược liệu Tô mộc (cao toàn phần)

3.1.1. Hiệu suất chiết xuất dược liệu

Khối lượng sản phẩm của 10 lần chiết xuất từ dược liệu Tô mộc (20 kg dược liệu/lần) được trình bày qua bảng 3.

Khối lượng cao chiết thu được thấp nhất là 1,23 kg (lần chiết thứ 8), cao nhất ở lần chiết 2 (1,47 kg) với hiệu suất chiết tương ứng là 6,40% và 7,35%. Không có biến động lớn của hiệu suất chiết. Như vậy, qui trình chiết xuất có tính ổn định.

Tổng khối lượng cao chiết thu được qua 10 lần chiết xuất là 13,5 kg. Vậy, hiệu suất chiết

trung bình đạt được 6,8%. Kết quả này thấp hơn chỉ số tối thiểu (không dưới 8,5% tính theo dược liệu khô kiệt theo qui định của Dược điển Việt Nam IV, 2009). Hiệu suất chiết thấp hơn so với tiêu chuẩn có thể do dược liệu Tô mộc không đạt tính khô kiệt. Đây là điểm cần chú ý trong các lần chiết xuất tiếp theo nhằm nâng cao hiệu suất chiết và giảm chi phí sản xuất.

Đặc điểm cảm quan của sản phẩm (cao khô toàn phần): Màu nâu đỏ ánh vàng, để lâu ngoài không khí khi còn nóng sẽ chuyển sang màu nâu đậm. Cao nóng có tính dẻo, để nguội kết rắn có thể tán bột (Hình 3). Dung dịch cao 10% với nước cất, lọc nóng ở 80°C có chỉ số cặn không hòa tan < 0,1%.

3.1.2. Sản xuất chế phẩm cao Tô mộc 10%

Sản phẩm thử nghiệm được bao chế dạng dung dịch chứa 10% cao chiết. Sản phẩm được đóng gói bảo quản trong chai nhựa chất liệu HDPE với dung tích 500 ml. Chế phẩm đạt được tính ổn định theo công thức bào chế. Chế phẩm

Bảng 3. Kết quả chiết dược liệu Tô mộc tới cao toàn phần

Lần chiết	Khối lượng dược liệu (kg)	Khối lượng cao thu được (kg)	Hiệu suất chiết (%)
1	20,0	1,34	6,70
2	20,0	1,47	7,35
3	20,0	1,31	6,55
4	20,0	1,31	6,55
5	20,0	1,26	6,30
6	20,0	1,42	7,10
7	20,0	1,30	6,50
8	20,0	1,28	6,40
9	20,0	1,38	6,90
10	20,0	1,43	7,15
Tổng khối lượng cao toàn phần thu được (kg)		13,5 ± 0,7	
Hiệu suất chiết (%)		6,75 ± 0,36	

Đánh giá hiệu suất chiết và tác dụng của cao chiết từ gỗ tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) trong dung môi ethanol với vi khuẩn *Escherichia coli*

này được sử dụng nghiên cứu khả năng phòng và trị bệnh do vi khuẩn *E. coli* trên gà thí nghiệm (Hình 4 và 5).

3.2. Kết quả kháng sinh đồ của cao chiết Tô mộc đối với vi khuẩn *E. coli*

3.2.1. Tính kháng khuẩn của cao chiết và 4 loại kháng sinh với *E. coli* chuẩn (ATCC 25922)

Kết quả đánh giá vòng vô khuẩn của chế phẩm và một số kháng sinh với *E. coli* ATCC 25922 (Bảng 4) cho thấy đường kính vòng vô khuẩn nhỏ nhất với cao chiết nồng độ 5 µg/đĩa đạt 10 mm; với cao chiết nồng độ 10 µg/đĩa là 12 mm. Đường kính vòng vô khuẩn trung bình của Tô mộc nồng độ 5 µg/đĩa là 10,02 mm; với Tô mộc nồng độ 10 µg/đĩa là 12,02 mm. Đường kính vòng vô khuẩn của Tô mộc thấp hơn 3 kháng sinh: Amoxicillin, Ciprofloxacin và Doxycycline. Một điều thú vị là đường kính vòng vô khuẩn của chất chiết Tô mộc 10 µg/đĩa có giá trị tương đương với giá trị này của kháng sinh Colistin.

So sánh với chỉ số kháng khuẩn tiêu chuẩn (CLSI, 2008) thì khả năng kháng khuẩn của cả bốn loại kháng sinh đều có tác dụng diệt khuẩn trên vi khuẩn *E. coli* chuẩn (ATCC 25922).

3.2.2. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết và 4 loại kháng sinh với vi khuẩn *E. coli* phân lập từ gà Lương Phượng bị bệnh

Các chủng vi khuẩn chuẩn thường được dùng để đánh giá tác dụng kháng khuẩn của kháng sinh, đặc biệt là kháng sinh thử nghiệm. Tuy nhiên, không phải kháng sinh có tác dụng tốt trên chủng vi khuẩn chuẩn đều có tác dụng đối với vi khuẩn gây bệnh trên động vật. Chính vì vậy, tác dụng của cao chiết Tô mộc với vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên gà được xác định cùng với một số kháng sinh khác (Bảng 5).

Kết quả kháng sinh đồ bảng 5 cho thấy vi khuẩn *E. coli* phân lập từ gà bệnh đã đề kháng với Amoxicillin và Colistin (đường kính vòng vô khuẩn thấp nhất của Amoxicillin lần lượt là 13 mm và 10 mm). Vi khuẩn nhạy cảm cao với Ciprofloxacin (với đường kính vòng vô khuẩn thấp nhất là 23 mm) và với Doxycycline (đường kính vòng vô khuẩn thấp nhất là 11 mm). Khả năng đề kháng thuốc này có thể do tình trạng sử dụng kháng sinh trong điều trị không đúng liệu trình, thời gian sử dụng kháng sinh quá ngắn, cũng như việc bổ sung kháng sinh với liều thấp thường xuyên trong thức ăn nhằm mục đích phòng bệnh đã tạo ra các chủng vi khuẩn có sức đề kháng cao.

Cũng trong thí nghiệm này, đường kính vòng vô khuẩn ở hai hàm lượng cao chiết Tô mộc chỉ đạt 7,04 mm với hàm lượng 5 µg và đạt mức 8,02 với hàm lượng 10 µg. Như vậy, có thể cho rằng tác dụng kháng sinh của cao chiết tô mộc thấp hơn của các loại kháng sinh kiểm tra.



Hình 3. Cao chiết Tô mộc trong hộp thủy tinh



Hình 4. Cao chiết Tô mộc thành phẩm trong chai nhựa HDPE 500 ml



Hình 5. Dịch Tô mộc 10% dùng cho thí nghiệm

Bảng 4. Đường kính vòng vô khuẩn của cao chiết Tô mộc và một số kháng sinh với *E. coli* ATCC 25922 (đơn vị: mm)

Lần thứ	Tô mộc 5µg	Tô mộc 10 µg	Amoxicillin	Ciprofloxacin	Colistin	Doxycycline
1	10,0	12,0	20,0	40,0	12,0	25,0
2	10,0	12,0	21,0	40,0	12,0	25,0
3	10,0	12,0	20,0	40,0	12,0	25,0
4	10,0	12,0	20,0	40,5	12,2	25,0
5	10,0	12,0	20,4	40,0	12,0	25,0
6	10,0	12,2	20,0	40,2	12,0	25,0
7	10,0	12,0	20,0	40,0	12,0	25,0
8	10,0	12,0	20,2	40,0	12,0	25,0
9	10,2	12,0	20,0	40,2	12,0	25,0
10	10,0	12,0	20,0	40,2	12,0	25,0
Trung bình	10,02 ± 0,06	12,02 ± 0,06	20,16 ± 0,32	40,11 ± 0,17	12,02 ± 0,06	25,0 ± 0,00

Theo hiểu biết của chúng tôi, chất chiết xuất từ cây Tô mộc chưa được sử dụng rộng rãi trong điều trị nhiễm khuẩn mà chỉ nghiên cứu trong phòng thí nghiệm nên về lý thuyết đường kính trung bình vòng vô khuẩn của chất chiết từ Tô mộc trên vi khuẩn *E. coli* chuẩn ATCC 25922 và vi khuẩn *E. coli* được phân lập từ gà bệnh sẽ không khác nhau vì vi khuẩn chưa kháng với các chất chứa trong Tô mộc. Tuy nhiên, kết quả (Bảng 6) cho thấy đường kính trung bình vòng vô khuẩn của chất chiết trên vi khuẩn *E. coli* chuẩn ATCC 25922 và vi khuẩn *E. coli* được

phân lập từ gà bệnh có sự khác biệt. Như vậy, sự khác nhau về các đặc tính sinh học khác giữa chủng *E. coli* chuẩn và chủng gây bệnh thực địa có thể dẫn đến sự khác nhau về tính miễn cảm của vi khuẩn với các kháng sinh, các chất chiết và các hóa chất. Hạn chế của nghiên cứu này là chưa xác định được nồng độ ức chế tối thiểu của chất chiết Tô mộc đến vi khuẩn *E. coli*.

Sự khác nhau giữa đường kính vòng vô khuẩn của cao chiết Tô mộc và các loại kháng sinh kiểm tra đối với chủng *E. coli* gây bệnh và chủng *E. coli* chuẩn được tóm tắt ở bảng 6.

Bảng 5. Đường kính vòng vô khuẩn của cao chiết Tô mộc và một số kháng sinh với *E. coli* phân lập từ gà bệnh (đơn vị: mm)

Lần thứ	Tô mộc 5 µg	Tô mộc 10 µg	Amoxicillin	Ciprofloxacin	Colistin	Doxycycline
1	7,20	8,00	13,00	23,00	10,00	11,00
2	7,00	8,00	13,00	23,40	10,00	11,00
3	7,20	8,00	13,50	23,00	10,20	11,00
4	7,00	8,00	13,00	23,20	10,00	11,00
5	7,00	8,00	13,00	23,00	10,00	11,00
6	7,00	8,00	13,20	23,00	10,00	11,00
7	7,00	8,20	13,00	23,00	10,00	11,00
8	7,00	8,00	13,00	23,00	10,00	11,20
9	7,00	8,00	13,00	23,00	10,00	11,00
10	7,00	8,00	13,00	23,00	10,00	11,00
Trung bình	7,04 ± 0,08	8,02 ± 0,06	13,07 ± 0,16	23,06 ± 0,13	10,02 ± 0,06	11,02 ± 0,06

Bảng 6. Đường kính trung bình vòng vô khuẩn của cao chiết Tô mộc và kháng sinh với vi khuẩn *E. coli* (đơn vị: mm)

Chất chiết/kháng sinh	<i>E. coli</i> chuẩn (ATCC 25922)	<i>E. coli</i> phân lập từ gà bệnh
Tô mộc 5 µg	10,02 ± 0,06	7,04 ± 0,08
Tô mộc 10 µg	12,02 ± 0,06	8,02 ± 0,06
Amoxicillin	20,16 ± 0,32	13,07 ± 0,16
Ciprofloxacin	40,11 ± 0,17	23,06 ± 0,13
Colistin	12,02 ± 0,06	10,02 ± 0,06
Doxycycline	25,00 ± 0,00	11,02 ± 0,06

Theo Srinivasan *et al.* (2012), hàm lượng 5 µg cao chiết trong dung môi ethanol, Tô mộc cho đường kính vòng vô khuẩn 6,0 ± 0,3 mm đến 15,0 ± 1,4 mm. Kết quả đánh giá của chúng tôi cũng đạt mức kháng khuẩn trong thí nghiệm của Senthilkumar *et al.* (2011) với vòng vô khuẩn là 6 mm ở hàm lượng cao chiết 50 ppm và 8 mm ở hàm lượng cao chiết 100 ppm (dung môi chiết methanol). Có thể cho thấy rằng không có sự khác nhau về hoạt tính kháng *E. coli* của chất chiết Tô mộc bằng các dung môi ethanol và methanol.

Nghiên cứu của Srinivasan *et al.* (2012) cũng cho rằng chất chiết Tô mộc có hoạt tính kháng sinh mạnh hơn trên các vi khuẩn gram dương như *Streptococcus feacalis* và *Staphylococcus aureus* so với tác dụng trên vi khuẩn gram âm như *E. coli*, *Salmonella typhi*.

Trong thí nghiệm này, đường kính vòng vô khuẩn của cả 4 loại kháng sinh kiểm tra trên chủng vi khuẩn gây bệnh đều thấp hơn so với chủng vi khuẩn chuẩn. Chênh lệch cao nhất đối với Doxycycline (từ 25 mm với chủng *E. coli* chuẩn so với 11,02 mm với chủng *E. coli* gây bệnh); tiếp theo là Ciprofloxacin, Amoxicillin và Colistin. Như vậy, để đánh giá khả năng kháng

khuẩn của một chất hay nhóm chất có nguồn gốc thực vật như cao chiết Tô mộc, đường kính vô khuẩn cũng chỉ được xem như một tiêu chuẩn xác định.

3.3. Tác dụng của chế phẩm cao Tô mộc 10% trên gà gây nhiễm *E. coli* thực nghiệm

Để đánh giá tính an toàn của chế phẩm trước thí nghiệm, cho 3 con gà 28 ngày tuổi uống chế phẩm cao Tô mộc 10% với liều 1 ml/10kg thể trọng và theo dõi gà sau 7 ngày. Thí nghiệm chính thức được thực hiện khi cả 3 gà này đều khỏe mạnh. Kết quả 3 lần lặp lại thí nghiệm được trình bày ở bảng 7.

Sau 24 giờ gây bệnh, gà có biểu hiện ủ rũ, xù lông, bỏ ăn. Gà đầu tiên chết sau 72 giờ. Bệnh tích chủ yếu là xoang bao tim tích dịch vàng, màng bao tim dày đục hoặc viêm màng bao tim. Sau khi kết thúc thí nghiệm, tỷ lệ gà bệnh của các lô TN1, TN2, đối chứng dương của cả 3 đợt thí nghiệm lần lượt là 23,33%; 23,33% và 73,33%. Sai có ý nghĩa giữa tỉ lệ mắc bệnh của lô TN1 và lô TN2 so với hai lô đối chứng dương và đối chứng âm được xác định ($P < 0,01$).

Bảng 7. Kết quả theo dõi gà thí nghiệm sau 7 ngày gây nhiễm

Đợt TN	Số gà/lô /đợt (con)	Lô TN1		Lô TN2		Đối chứng dương		Đối chứng âm	
		Số gà bệnh	Tỷ lệ (%)	Số gà bệnh	Tỷ lệ (%)	Số gà bệnh	Tỷ lệ (%)	Số gà bệnh	Tỷ lệ (%)
1	10	4	40	4	40	8	80	0	0
2	10	2	20	1	10	7	70	0	0
3	10	1	10	2	20	7	70	0	0
Tổng	30	7	23,33	7	23,33	22	73,33	0	00,00

Bảng 8. Tỷ lệ gà chết sau 7 ngày gây bệnh

Đợt TN	Lô TN1(n=10) x 3		Lô TN2 (n = 10) x 3		Chứng dương (n = 10) x 3		Chứng âm (n = 10) x 3	
	Gà chết	Gà chết do <i>E. coli</i>	Gà chết	Gà chết do <i>E. coli</i>	Gà chết	Gà chết do <i>E. coli</i>	Gà chết	Gà chết do <i>E. coli</i>
1	4 (40%)	3 (30%)	3 (30%)	3 (30%)	6 (60%)	6 (60%)	0 (0%)	0 (0%)
2	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	1(10%) 10,00	4 (40%)	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
3	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	2(20%)	4 (40%)	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
Tổng	6 (20%)	5 (16,66%)	6 (20%)	6 (20%)	14 (46,66%)	14 (46,66%)	0 (0%)	0 (0%)

Ghi chú: Chữ số trong mỗi ô chỉ số gà chết (con); tỷ lệ chết được ghi trong ()

Có thể nhận xét rằng cho uống chế phẩm cao Tô mộc 10% trước và sau gây nhiễm *E. coli* đều có tác dụng với vi khuẩn này. Tác dụng phòng bệnh của chế phẩm với liều 1 ml/10kg/ngày (lô 1) tương đương tác dụng trị bệnh (lô 2). Sau 7 ngày gây nhiễm, mổ khám và lấy mẫu phân lập vi khuẩn *E. coli*. Kết luận gà bệnh do *E. coli* khi gà mắc bệnh có triệu chứng lâm sàng, bệnh tích điển hình và kết quả phân lập *E. coli* dương tính từ các bệnh phẩm.

Gà chết do *E. coli* được xác định khi có các triệu chứng, bệnh tích điển hình của bệnh và mẫu phân lập dương tính với *E. coli* (Bảng 8). Sau 7 ngày thí nghiệm, tỷ lệ gà chết cả 3 đợt của lô TN1 và TN2 là 20%. Tỷ lệ gà chết cả 3 đợt của lô chứng dương là 46,66%, cao hơn tỉ lệ chết của các lô gà được uống chế phẩm Tô mộc 10% ($P < 0,05$).

Kết quả mổ khám gà chết và phân lập vi khuẩn *E. coli*. Bệnh tích chủ yếu là xoang bao tim tích dịch vàng, viêm bao tim. Gà chết do *E. coli* ở lô TN1 của 3 đợt thí nghiệm chiếm tỷ lệ thấp nhất (16,66%) và tỷ lệ cao nhất ở lô chứng dương (46,66%) ($P < 0,05$). Qua đó có thể nhận xét rằng chế phẩm cao Tô mộc 10% có tác dụng làm giảm khả năng xâm nhập và gây bệnh của *E. coli*.

Hoạt tính sinh học của chất chiết Tô mộc đã được một số tác giả chứng minh như chống oxy hóa (Badami *et al.*, 2003); kháng một số tác nhân kích thích phát triển khối u (Benabadji *et al.*, 2004); kháng khuẩn (Xu *et al.*, 2004; Saravanakuma *et al.*, 2013); bảo vệ và tăng cường chức năng gan (Sathya Srilakshmi *et al.*, 2010) và tác động đến bộ thể (Sarumathy *et al.*, 2011). Tuy nhiên, nghiên cứu này lần đầu tiên

xác định khả năng phòng và trị bệnh do *E. coli* trên gà thí nghiệm.

Hiện nay chăn nuôi “xanh”, hạn chế kháng sinh trong phòng bệnh và trị bệnh cho vật nuôi đang ngày được khuyến khích vì những mặt trái của sử dụng kháng sinh. Vấn đề này được đặc biệt quan tâm ở các nước đang phát triển, nơi kháng sinh đã và đang bị lạm dụng vì lợi nhuận trước mắt của một số nhà sản xuất. Sử dụng các chất có nguồn gốc thực vật là một trong những biện pháp hữu hiệu để hạn chế những tác động không tốt của tình trạng này. Sử dụng các chất có nguồn gốc thực vật trong đó có cây Tô mộc nhằm phòng và trị bệnh là một trong các biện pháp đó. Những kết quả này mới sàng lọc, định tính, chưa xác định được nồng độ ức chế tối thiểu và khả năng kết hợp với kháng sinh. Kết quả nghiên cứu này có thể coi là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo ra các chế phẩm từ Tô mộc sử dụng phòng và điều trị bệnh do *E. coli* nói chung và một số bệnh do vi khuẩn khác trong chăn nuôi. Thí nghiệm tiếp theo đánh giá hiệu quả kinh tế của phương pháp dùng cao chiết Tô mộc trong phòng và điều trị bệnh do *E. coli* trên gà cũng cần được thực hiện.

4. KẾT LUẬN

Qui trình chiết xuất dược liệu Tô mộc với dung môi ethanol 96% sau đó tiến hành cất thu hồi dung môi ở nhiệt độ 80 - 90°C. Hiệu suất chiết xuất đạt trung bình 6,75%.

Cao chiết Tô mộc có tác dụng trên vi khuẩn *E. coli*. Hoạt tính kháng khuẩn phụ thuộc vào hàm lượng cao chiết và chủng vi khuẩn. Hoạt

tính kháng khuẩn của cao Tô mộc trên chủng *E. coli* chuẩn cao hơn trên chủng *E. coli* phân lập từ gà bệnh. Sự sai khác này cũng tương tự đối với các kháng sinh Doxycycline, Ciprofloxacin và Colistin.

Chế phẩm cao Tô mộc 10% có tác dụng phòng và trị bệnh do *E. coli* gây nhiễm trên gà với liều gây nhiễm 3 ml/con.

Kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu phân tích đánh giá khả năng kháng khuẩn của cao chiết Tô mộc khi dùng kết hợp với một số dược liệu khác và đánh giá tác dụng phòng trị bệnh do *E. coli* của cao chiết Tô mộc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2009). Dược điển Việt Nam IV. Nhà xuất bản Y học.
- Badami S., Moorkoth S, Rai S.R, Kannan E. and Bhojraj S. (2003). Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. *Biol Pharm Bull.*, 26: 1534 - 1537.
- Benabadi S.H, Wen R., Zheng J.B., Dong X.C. and Yuan S.G. (2004). Anticarcinogenic and antioxidant activity of di indolylmethane derivatives. *Acta pharmacol Sci.*, 25.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100 - S18, Eighteenth Informational Supplement, pp. 666 - 667.
- Fortman J.L and Mukhopadhyay A. (2016). The Future of Antibiotics: Emerging Technologies and Stewardship. *Trends in Microbiology* pii: S0966 - 842X(16)30016 - 6. doi: 10.1016/j.tim.2016.04.003. [Epub ahead of print]
- Hemalatha R., Nivetha P., Mohanapriya C., Sharmila G., Muthukumar C. and Gopinath M. (2016). Phytochemical composition, GC - MS analysis, *in vitro* antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2): 1189 - 1198.
- Iram S., Akbar Khan J., Aman N., Nadhman A., Zulfiqar Z. and Arfat Yameen M. (2016). Enhancing the Anti - Enterococci Activity of Different Antibiotics by Combining With Metal Oxide Nanoparticles. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 12; 9(3):e31302. doi: 10.5812/jjm.31302.
- Đỗ Tất Lợi (2015). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học
- Saraya S., Tamsirirkkul R., Manamuti C., Wongkrajang Y. and Cheewansirisuk C. (2009). *Sappan wood extract used as preservative in chili paste*. *Mahidol university journal of pharmaceutical science*, 36(1 - 4): 13 - 21.
- Saravanakumar S and Elan C. J (2013). Screening of antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Caesalpinia sappan* L. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(2): 171 - 175.
- Sarumathy K, Vijay T, Palani S, Sakthivel K. and Dhana Rajan M.S. (2011). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Caesalpinia sappan* against acetaminophen - induced hepatotoxicity in rats. *Int J Pharmacol Therape*, 1: 19 - 31.
- Sathya S.V, Vijayan P, Vasantha Raj P, Dhanaraj S.A. and Chandrashekar R. H. (2010). Hepatoprotective properties of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood on carbon tetrachloride induced toxicity. *Ind J Exe Biol.*, 48: 905 - 910.
- Sridhar rao P.N.. (2009). Antibiotic susceptibility testing. www.microrao.com. Accession date Sept. 20th 2009.
- Srinivasan R., Ganapathy selwam G., Karthik S., Mathivanan K., Baskaran R., Karthikeyan F. M. and Gopi M. (2012). *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L., *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S136 - S139.
- Vu T.T., Kim H., Tran V.K., Dang Q.L., Nguyen H.T., Kim H., Kim I.S., Choi G.J., and Kim J. C. (2015). *In vitro* antibacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Vietnam against human pathogenic bacteria. *BMC Complement Altern Med.*, 16: 32. Published online 2016 Jan 27. doi: 10.1186/s12906 - 016 - 1007 - 2.
- Wahlberg A. (2006). Bio - politics and the promotion of traditional herbal medicine in Vietnam. *Health (London)*, 10(2): 123 - 147.
- Wisatre K. (2005). Screening of some Thai medicinal plants for antimicrobial activity and antioxidant activity against microorganisms. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology.
- Woerdenbag H.J. Nguyen T.M., Vu D.V., Tran H., Nguyen D.T., Tran T.V., De Smet. PA. and Brouwers J.R. (2012). Vietnamese traditional medicine from a pharmacist's perspective. *Expert Rev Clin Pharmacol.*, 5(4): 459 - 77
- Xu H.X. and Lee. SF. (2004). The antibacterial principle of *Caesalpinia sappan*. *Phytother Res.*, 18: 647 - 651.