

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ TĂNG SINH VI KHUẨN *Propionibacterium acnes* CỦA GEL MỒNG TOI (*Basella alba* L.) VÀ DIẾP CÁ (*Houttuynia cordata* Thunb.)

Phạm Thị Kiều Oanh*, Phan Nữ Hoàng Oanh, Hoàng Xuân Thế

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: phamoanh283@gmail.com

Ngày nhận bài: 12/10/2020; Ngày chấp nhận đăng: 22/12/2020

TÓM TẮT

Mụn trứng cá là một chứng rối loạn mãn tính phổ biến của đơn vị tiết chất nhờn. Vi khuẩn *Propionibacterium acnes* được xem là thủ phạm chính gây mụn trứng cá. Hai vấn đề chính thường gặp của điều trị mụn trứng cá là tình trạng kháng thuốc và tác dụng phụ tại chỗ. Vì thế, sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật có thể được xem là một lựa chọn phù hợp để điều trị mụn trứng cá. Cây mồng toi (*Basella alba* L.) và cây diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb) được sử dụng rộng rãi trong các bài thuốc dân gian để chữa bệnh mụn nhọt, viêm nhiễm trên da. Tuy nhiên, các nghiên cứu về tác dụng ức chế *Propionibacterium acnes* của hai loại cây này còn rất hạn chế. Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *Propionibacterium acnes* của gel mồng toi - diếp cá. Kết quả nghiên cứu cho thấy, giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) của cao mồng toi và cao diếp cá lần lượt là 125 mg/mL và 62,5 mg/mL. Gel từ hỗn hợp cao mồng toi - diếp cá ức chế vi khuẩn *Propionibacterium acnes* với đường kính vòng vô khuẩn là $15,3 \pm 0,58$ mm.

Từ khóa: Mồng toi, diếp cá, *Propionibacterium acnes*, mụn trứng cá.

1. GIỚI THIỆU

Mụn trứng cá là một chứng rối loạn mãn tính phổ biến của đơn vị tiết chất nhờn. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), một loại vi khuẩn kỵ khí, gram dương, được xem là một trong các nguyên nhân chính gây mụn trứng cá. Hai vấn đề chính của các phương pháp điều trị mụn trứng cá thông thường là tình trạng kháng thuốc kháng sinh và tác dụng phụ tại chỗ... Có rất nhiều phương pháp điều trị mụn hiệu quả. Liệu pháp tại chỗ được coi là phương pháp điều trị tiêu chuẩn cho mụn trứng cá nhẹ và trung bình. Một số loại thuốc phổ biến bao gồm benzoyl peroxide, kháng sinh, retinoid và axit salicylic. Thuốc kháng sinh uống thích hợp để điều trị mụn trứng cá vừa và nặng. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc kháng sinh trị mụn khiến vi khuẩn kháng thuốc. Tỷ lệ *P. acnes* kháng với clindamycin, tetracycline, doxycycline và erythromycin đã xảy ra ở nhiều nước trên thế giới. Isotretinoin, một nhóm retinoid, là một phương pháp điều trị hiệu quả cho mụn trứng cá nặng; tuy nhiên, phải tránh áp dụng phương pháp điều trị này khi có thai vì có thể gây sảy thai và dị tật bẩm sinh [1]. Về vấn đề này, được liệu có thể được xem là một lựa chọn thay thế để phát triển các sản phẩm mới với ít tác dụng phụ hơn.

Cây mồng toi có tên khoa học là *Basella alba* L. thuộc họ Basellaceae [2]. Theo đông y, mồng toi có tác dụng giải độc, thanh nhiệt, hoạt tràng, chữa đại tiện bí kết, đại tiện xuất huyết, tiểu tiện khó, chữa kiết lỵ hiệu quả. Ngoài ra, một số nghiên cứu còn cho biết mồng toi còn có tác dụng kháng khuẩn, chống viêm,...[3]. Đặc biệt nhiều nghiên cứu cho thấy mồng toi chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như alkaloid, glycoside, saponin, tanin, terpenoids,

flavonoid,...[4]. Cây diếp cá, tên khoa học là *Houttuynia cordata* Thunb. thuộc họ Lá giấp - Saururaceae. Trong đông y, diếp cá được dùng trị mụn nhọt, trẻ con lên sởi, viêm phổi hoặc phổi có mủ,... Ngoài ra, diếp cá có tác dụng quan trọng về mặt y học như chống bệnh bạch cầu, chống ung thư, chống oxy hóa và tác dụng ức chế phản ứng phản vệ và kích hoạt tế bào mast [5].

Cây mỏng toi và cây diếp cá có ý nghĩa rất quan trọng về mặt y học nói chung và tác dụng thẩm mỹ nói riêng, tuy nhiên các nghiên cứu về tác dụng thẩm mỹ của hai loài cây này vẫn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành nghiên cứu khả năng ức chế tăng sinh vi khuẩn *P. acnes* của hỗn hợp gel làm từ cao chiết mỏng toi - diếp cá.

2. NGUYÊN/VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên/vật liệu

Các hóa chất và môi trường được sử dụng trong thí nghiệm: ethanol 99,5° (Việt Nam), quercetin (QE), penicillin (Việt Nam), DMSO (dimethyl sulfoxide - Đức) dùng để pha loãng cao chiết và môi trường Tryptic Soy Broth (Ấn Độ) được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn.

Vi sinh vật được sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn là *Propionibacterium acnes* do Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Khu Công nghệ cao (Quận 9) cung cấp. Vi khuẩn được nuôi cấy kỵ khí 24 giờ trên môi trường Tryptic Soy Agar (TSA) ở 37 °C.

Mỏng toi và diếp cá được mua tại nơi trồng ở xã Phạm Văn Hai, huyện Bình Chánh, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu nhận cao chiết mỏng toi, diếp cá

Lá và thân mỏng toi cùng với lá diếp cá sau thu hoạch được rửa sạch, để ráo nước, sấy khô ở nhiệt độ 55-60 °C và xay thành bột. Sau đó, 100 gram bột khô được ngâm chiết 10 ngày ở nhiệt độ phòng với ethanol 99,5° theo tỷ lệ 1:10 (w/v), dịch chiết được cô chân không ở 45-50 °C để đuổi cồn thu cao đặc. Cao được bảo quản ở 4 °C.

2.2.2. Đánh giá cao chiết mỏng toi, diếp cá

2.2.2.1. Phát hiện nhóm các chất thứ cấp dựa vào các phản ứng tạo màu (Bảng 1).

Bảng 1. Định tính các hợp chất trong cao chiết mỏng toi, diếp cá [6]

Hợp chất được định tính	Thực hiện phản ứng định tính	Kết quả phản ứng
Phenolic	2 mL cao chiết + 2 mL H ₂ O + 2-3 giọt FeCl ₃ (5%)	Tủa xanh đen
Alkaloid	2 mL cao chiết + 3-4 giọt thuốc thử mayer	Tủa vàng
Flavonoid	1 mL + 1 mL Pb(CH ₃ COOH) ₂ (10%)	Màu vàng

2.2.2.2. Định lượng flavonoid tổng theo Chang *et al*, 2002 [7].

Flavonoid là hợp chất có khả năng kìm hãm và ngăn sự phân chia của vi khuẩn, ức chế enzym transpeptidase ngăn chặn quá trình thành lập vách tế bào. Diếp cá có chứa thành phần flavonoid hết sức phong phú, các flavonoid đáng chú ý trong diếp cá có thể kể đến như quercetin, quercitrin, isoquercitrin.

Dụng cụ chuẩn Quercetin:

- Dung dịch các cao chiết nồng độ 1mg/mL methanol.
- Dung dịch flavonoid chuẩn quercetin - đạt nồng độ 20; 40; 60; 80 và 100 µg/mL.
- Các dung dịch khác: AlCl₃ 10% và CHCOOK 1M được pha với nước.

Cách tiến hành:

Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch quercetin (nồng độ 20; 40; 60; 80 và 100 µg/mL) vào 1,5 mL MeOH, để phản ứng trong 5 phút. Sau đó, thêm tiếp 0,1 ml AlCl₃ 10% và để phản ứng 6 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm vào 0,1 mL CH₃COOK 1M và 2,8 mL nước cất, lắc đều rồi để ổn định trong 45 phút ở nhiệt độ phòng. Sau 45 phút, tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 415 nm trên máy quang phổ UV-VIS.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả đo OD (mật độ quang học của dung dịch) được ghi nhận và tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn để xác định hàm lượng flavonoid trong các mẫu cao chiết. Các mẫu cao chiết được tiến hành tương tự như với quercetin [6].

Hàm lượng flavonoid tổng được tính theo công thức: $F = (c \times V)/m$

Trong đó: F: hàm lượng flavonoid tổng (mg quercetin/g cao chiết)

c: giá trị x từ đường chuẩn với quercetin (µg/mL)

V: thể tích dịch chiết (mL)

m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

2.2.2.3. Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* của cao chiết mông toi, diếp cá

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

Cao chiết mông toi lần lượt được pha loãng trong DMSO theo dãy nồng độ 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 mg/mL. Cao chiết diếp cá lần lượt được pha loãng trong DMSO theo dãy nồng độ 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906 mg/mL. Cả hai mẫu cao chiết được khử trùng bằng màng lọc milipore 0,22 µm. Đối chứng âm là DMSO, đối chứng dương là penicillin 10 µg/mL.

Hút 200 µL môi trường TSB lỏng cho vào mỗi tube eppendorf (1,5 mL). Bổ sung thêm 250 µL dịch huyền phù vi khuẩn đạt mật số tương đương 10⁴ CFU/mL. Cuối cùng, bơm 50 µL cao chiết ở các nồng độ khác nhau, đối chứng âm (DMSO) và đối chứng dương (penicillin 10 µg/mL). Ủ kỵ khí 24 giờ các tube mẫu ở 37 °C. Tiến hành đếm mật số vi khuẩn ở mỗi nồng độ khảo sát bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường đĩa thạch [6].

MIC là giá trị mà ở đó nồng độ cao chiết thấp nhất có khả năng ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn.

MBC là giá trị mà ở đó nồng độ cao chiết thấp nhất có khả năng tiêu diệt vi khuẩn.

*Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* của cao chiết mông toi, diếp cá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch*

Cao chiết mông toi, diếp cá được pha trong dung dịch DMSO vô trùng với các nồng độ 250 mg/mL; 125 mg/mL; 62,5 mg/mL.

Khả năng ức chế dòng vi khuẩn *P. acnes* được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có hiệu chỉnh theo Mounyr Balouiri, 2016 [8]. Trải 100 µL dịch huyền phù vi khuẩn *P. acnes* (10⁶ CFU/mL) trên đĩa môi trường TSA, sau đó đục 5 giếng (đường kính 8 mm), bơm lần lượt 50 µL cao chiết mông toi, diếp cá ở các nồng độ khác nhau vào mỗi giếng. Đối chứng dương là kháng sinh penicillin (10 µg/mL), đối chứng âm là DMSO. Sau đó, ủ kỵ khí 24 giờ ở 37 °C.

Mỗi nồng độ cao chiết được thí nghiệm lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình. Đường kính vòng vô khuẩn được tính theo công thức ĐK (mm) = D - d với D là đường kính vòng tròn vô khuẩn (mm) và d là đường kính của giếng (d = 8 mm) [8].

2.2.3. Đánh giá cao chiết hỗn hợp mỏng toi - diếp cá

Tạo cao hỗn hợp mỏng toi - diếp cá: chọn nồng độ thích hợp của cao diếp cá, mỏng toi dựa vào kết quả ở mục 2.2.2.3. Tạo cao hỗn hợp theo 3 tỷ lệ khác nhau.

Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* của cao hỗn hợp mỏng toi - diếp cá được thực hiện tương tự mục 2.2.2.3

2.2.4. Tạo gel chiết xuất từ cao hỗn hợp mỏng toi - diếp cá

Dựa trên kết quả ở mục 2.2.3, tạo gel từ cao hỗn hợp có khả năng ức chế dòng vi khuẩn *P. acnes* tốt nhất, theo 4 tỷ lệ khác nhau.

Bảng 2. Bảng thành phần tạo gel

Thành phần	Tỷ lệ (%)			
	M.A	M.B	M.C	M.D
Cao hỗn hợp	1	4	7	0
Carbome 940	0,4	0,4	0,4	0,4
Propylene glycol	3	3	3	3
Triethanolamine	1	1	1	1
Nước vô trùng	94,6	91,6	88,6	95,6
Tổng	100%	100%	100%	100%

Hàm lượng các thành phần tạo gel: propylene glycol, carbome 940, triethanolamine theo phụ lục số 03-MP của Hội đồng mỹ phẩm ASEAN [9].

Quy trình tạo gel: lần lượt cho nước vô trùng, cao chiết, carbome 940 vào ống flacon, vortex 2 phút, bổ sung propylene glycol, vortex 2 phút, sau đó thêm triethanolamine vào dung dịch để tạo gel [10].

2.2.5. Đánh giá các mẫu gel chiết xuất từ cao hỗn hợp mỏng toi - diếp cá

2.2.5.1. Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* của các mẫu gel chiết xuất từ cao hỗn hợp mỏng toi - diếp cá

Khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, thực hiện tương tự mục 2.2.2.3

2.2.5.2. Đánh giá tính chất hóa lý, độ an toàn cho da của gel chiết xuất từ cao hỗn hợp mỏng toi - diếp cá

Tính chất hóa lý

Các công thức gel có chứa chất chiết từ cao hỗn hợp mỏng toi - diếp cá được kiểm tra về màu sắc, mùi, độ đồng nhất và pH. Kết quả đánh giá dựa vào cảm quan của 20 tình nguyện viên. Độ pH được xác định bằng cách hoà tan 2 g gel trong 20 mL nước cất, tiến hành đo pH bằng máy đo pH [1].

Đánh giá độ an toàn cho da

Đánh giá độ kích ứng da được áp dụng theo quy định tại Quyết định số 3113/1999/QĐ-BYT.

Đối tượng thử nghiệm: chọn 20 tình nguyện viên có da bình thường, khỏe mạnh, không bị dị ứng da, không bị bệnh về da. Vùng thử là mặt trong cánh tay.

Thực hiện: làm sạch vùng da thử nghiệm bằng nước thường, phết sản phẩm gel lên vùng da thử nghiệm khoảng 3 x 3 cm. Dùng bút đánh dấu loại sản phẩm thử nghiệm.

Sau 30 phút thử nghiệm, mức độ kích ứng da của sản phẩm được tính theo thang điểm ở Bảng 3, trong đó *khung điểm từ 0 - 0,5 được xem là không gây kích ứng da (kích ứng không đáng kể)*.

Bảng 3. Bảng điểm phản ứng da

Mức độ kích ứng	Loại kích ứng	Điểm đánh giá
Mức độ 1	Kích ứng không đáng kể	0 - 0,5
Mức độ 2	Kích ứng nhẹ	0,5 - 2,5
Mức độ 3	Kích ứng vừa phải	2,5 - 5
Mức độ 4	Kích ứng nghiêm trọng	5 - 8

2.2.5.3. Đánh giá mức độ ổn định của gel từ cao hỗn hợp mỏng toi - diếp cá

Các công thức gel được kiểm tra mức độ ổn định bằng cách sử dụng chu trình đóng băng và tan băng trong sáu chu kỳ. Đối với mỗi chu kỳ, các mẫu được đóng gói trong ống nhựa, bảo quản ở 4 °C trong 24 giờ, sau đó được lưu trữ ở 30 °C trong 24 giờ. Sau khi hoàn thành sáu chu kỳ, các công thức gel được đánh giá về các tính chất hóa lý [1].

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel, Statgraphics XV.I được phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu nhận cao chiết mỏng toi, diếp cá

Nồng độ cao chiết được dùng để định tính: 100 mg/mL. Hiệu suất chiết được tính toán và trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Hiệu suất chiết cao tổng

Loài	Lượng dược liệu khô đem chiết (g)	Lượng cao tổng (g)	Hiệu suất chiết (%)
Mỏng toi	120	7,142	5,95
Diếp cá	170	11,657	6,87

Kết quả trong Bảng 4 cho thấy hiệu suất chiết cao tổng cây diếp cá (6,87%) cao hơn so với cao tổng mỏng toi (5,95%). Kết quả hiệu suất chiết cao tổng diếp cá thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Hoàng Văn Tuấn và cộng sự (2013), với hiệu suất chiết cao sử dụng dung môi ethanol 70% là 19,21% và hiệu suất chiết cao tổng nước là 13,7% [11]. Kết quả hiệu suất chiết cao tổng mỏng toi thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Indranath Ghosal và cộng sự

(2015), với hiệu suất chiết cao sử dụng dung môi ethanol thu được cao tổng là 7,2% từ lá cây mỏng toi [12].

3.2. Đánh giá cao chiết mỏng toi, diếp cá

3.2.1. Định tính các hợp chất tự nhiên

Từ kết quả định tính ở Bảng 5, nhận thấy cao chiết mỏng toi, diếp cá có chứa các hợp chất alkaloid, flavonoid, phenolic. Đây là các hợp chất quan trọng có khả năng kháng khuẩn. Trong đó cao diếp cá có chứa các hợp chất alkaloid, flavonoid, phenolic; cao mỏng toi có chứa các hợp chất alkaloid và flavonoid, không thấy sự hiện diện của phenolic, có thể do hàm lượng chất này trong cao chiết thấp.

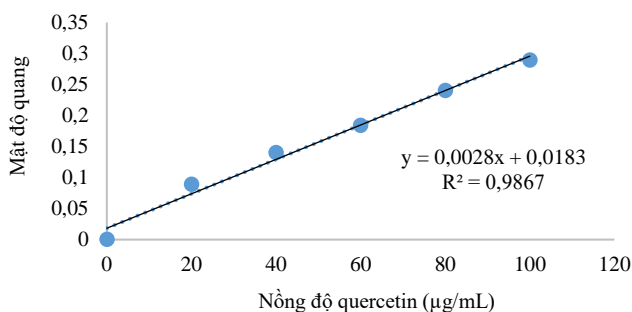
Bảng 5. Kết quả định tính các hợp chất tự nhiên

Loài	Alkaloid	Flavonoid	Phenolic
Mỏng toi	+	+	-
Diếp cá	+	+	+

Ghi chú: (+) có, (-) không

3.2.2. Định lượng flavonoid

Dựa vào đường chuẩn của quercetin: $y = 0,0028x + 0,0183$ để tính ra hàm lượng flavonoid tổng theo công thức: $F = (c \times V)/m$



Hình 1. Đồ thị đường chuẩn quercetin

Bảng 6. Hàm lượng flavonoid tổng của cao mỏng toi và diếp cá

Cao chiết	Flavonoid tổng (mg QE/g cao chiết)
Mỏng toi	468,7 ± 1,15
Diếp cá	306,2 ± 1,15

Kết quả hàm lượng flavonoid tổng của cao mỏng toi và diếp cá lần lượt là 468,7 mg QE/g cao chiết và 306,2 mg QE/g cao chiết. Theo kết quả nghiên cứu của Võ Thị Kiều Ngân và cộng sự về xác định hàm lượng flavonoid trong lá và thân rễ cây cỏ tranh, hàm lượng flavonoid tổng đạt 78,38 mg quercetin/g cao chiết, thấp hơn so với hàm lượng flavonoid của cao diếp cá và cao mỏng toi [13].

3.2.3. Khảo sát khả năng ức chế dòng vi khuẩn *P. acnes* của cao chiết mỏng toi - điệp cá

3.2.3.1. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

Xác định nồng độ MIC, MBC của cao mỏng toi

Nồng độ cao chiết được chọn để khảo sát lần lượt là 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 mg/mL bằng phương pháp pha loãng trong môi trường thạch. Đối chứng âm là DMSO. Đối chứng dương là penicillin 10 µg/mL.

Bảng 7. Khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* của cao chiết mỏng toi

STT	Nồng độ (mg/mL)	Khuẩn lạc vi khuẩn <i>P. acnes</i>		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
1	250	-	-	-
2	125	-	+	+
3	62,5	+	+	+
4	31,25	+	+	+
5	15,625	+	+	+
6	DMSO	+	+	+
7	Penicillin (10 µg/mL)	-	-	-

Ghi chú: (+) có sự phát triển của vi khuẩn *P. acnes*, (-) không có sự phát triển của vi khuẩn *P. acnes*

Kết quả khảo sát cho thấy giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết mỏng toi lần lượt là 125 mg/mL và 250 mg/mL.

Xác định nồng độ MIC, MBC của cao điệp cá

Nồng độ cao chiết được chọn để khảo sát lần lượt là 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906 mg/mL bằng phương pháp pha loãng trong môi trường thạch. Đối chứng âm là DMSO. Đối chứng dương là penicillin 10 µg/mL.

Bảng 8. Khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* của cao chiết điệp cá

STT	Nồng độ (mg/mL)	Khuẩn lạc vi khuẩn <i>P. acnes</i>		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
1	250	-	-	-
2	125	-	-	-
3	62,5	+	-	+
4	31,25	+	+	+
5	15,625	+	+	+
6	7,813	+	+	+
7	3,906	+	+	+
8	DMSO	+	+	+
9	Penicillin (10 µg/mL)	-	-	-

Ghi chú: (+) có sự phát triển của vi khuẩn *P. acnes*, (-) không có sự phát triển của vi khuẩn *P. acnes*

Kết quả khảo sát cho thấy giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết lần lượt là 62,5 mg/mL và 125 mg/mL.

3.2.3.2. Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* của cao mỏng toi - điệp cá

Hoạt tính ức chế dòng vi khuẩn *P. acnes* của cao chiết mỏng toi, điệp cá được khảo sát ở dãy nồng độ (250; 125; 62,5 mg/mL) trên vi khuẩn *P. acnes*.

Khả năng ức chế dòng vi khuẩn *P. acnes* được xác định dựa trên đường kính vòng vô khuẩn được tạo ra trên đĩa Petri.

*Bảng 9. Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế dòng vi khuẩn *P. Acnes* của cao chiết mỏng toi, điệp cá*

Loài	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
	Cao chiết (mg/mL)			DMSO	Penicillin (10µg/mL)
	250	125	62,5		
Mỏng toi	7,7 ^b ± 0,58	4,0 ^b ± 1,00	0,0 ^a ± 0,00	0,0 ^a ± 0,00	28,7 ^c ± 0,58
Điệp cá	16,3 ^d ± 0,58	11,0 ^c ± 1,00	4,7 ^b ± 0,58	0,0 ^a ± 0,00	29,3 ^c ± 1,15

Trong cùng một hàng, các số có chữ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,01$

Kết quả từ Bảng 9 cho thấy cao chiết điệp cá có khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* tốt hơn so với cao chiết mỏng toi. Trong đó, cao mỏng toi có khả năng ức chế *P. acnes* ở nồng độ 250 mg/mL và 125 mg/mL, kết quả đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là $7,7 \pm 0,58$ mm và $4,0 \pm 1,00$ mm. Ở nồng độ 62,5 mg/mL không có khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes*. Trong khi đó, cao điệp cá có khả năng ức chế *P. acnes* ở cả 3 nồng độ khảo sát, trong đó có khả năng ức chế mạnh ở nồng độ 250 mg/mL và 125 mg/mL, kết quả đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là $16,3 \pm 0,58$ mm và $11,0 \pm 1,00$ mm. Kết quả cho thấy cao điệp cá có khả năng ức chế *P. acnes* tốt hơn so với cao mỏng toi.

Khả năng ức chế vi khuẩn của cao mỏng toi và cao điệp cá tỷ lệ thuận với nồng độ. So sánh với những nghiên cứu khác về hoạt tính kháng khuẩn *P. acnes*, cao chiết thô từ cây điệp cá cho kết quả ức chế *P. acnes* tốt ở nồng độ cao, cao chiết thô từ cây mỏng toi thể hiện khả năng ức chế ở mức thấp. Chiết xuất từ *Senna alata*, *Eupatorium odoratum*, *Garcinia mangostana* và *Barleria lupulina* có khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* với đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn 15 mm ở nồng độ 5 mg/mL. Trong nghiên cứu của Jae-Suk Choi (2011) về khả năng ức chế vi khuẩn *P. acnes* của một số loại rong biển, chiết xuất methanol từ *E. cava*, *E. kurome*, *I. sinicola* và *S. latiuscula* cho kết quả ức chế mạnh nhất trong số các loài với đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất đạt 8,8 mm ở nồng độ 5 mg/mL [14].



*Hình 2. Khả năng ức chế *P. acnes* của của cao mỏng toi*



Hình 3. Khả năng ức chế *P. acnes* của cao điệp cá

3.3. Đánh giá cao chiết hỗn hợp mỏng toi, điệp cá

Dựa vào các kết quả thu được ở trên tiến hành tạo cao hỗn hợp mỏng toi - điệp cá với nồng độ của cao mỏng toi là 250 mg/mL, điệp cá là 125 mg/mL ở các tỷ lệ khác nhau được ký hiệu: M1, M2, M3.

Đánh giá khả năng ức chế dòng vi khuẩn *P. acnes* của 3 mẫu cao hỗn hợp M1, M2, M3 thu được kết quả như sau:

Bảng 10. Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế *P. acnes* của cao hỗn hợp mỏng toi - điệp cá

Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
Cao chiết hỗn hợp (mg/mL)			DMSO	Penicillin (10 µg/mL)
M1	M2	M3		
4,7 ^b ± 0,58	18,7 ^c ± 0,58	6,7 ^d ± 0,58	0,0 ^a ± 0,00	30,7 ^e ± 1,15

Trong cùng một hàng, các số có chữ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,01$

Kết quả từ Bảng 10 cho thấy khả năng ức chế *P. acnes* của cao hỗn hợp M2 tốt hơn so với hai mẫu còn lại với đường kính vòng vô khuẩn là $18,7 \pm 0,58$ mm. Qua đó, chọn cao hỗn hợp M2 để tiến hành tạo gel khảo sát khả năng ức chế *P. acnes*.



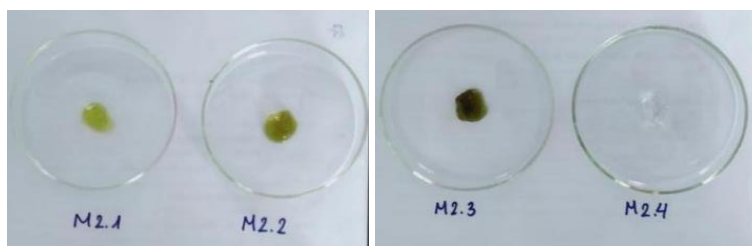
Hình 4. Kết quả khảo sát khả năng ức chế *P. acnes* của cao hỗn hợp mỏng toi - điệp cá

3.4. Tạo gel chiết xuất từ cao hỗn hợp mỏng toi - điệp cá

Dựa trên kết quả thí nghiệm 3.3, cao chiết hỗn hợp M2 được chọn để tạo gel với 4 tỷ lệ khác nhau.

Bảng 11. Thành phần tạo gel hỗn hợp từ cao M2

Thành phần	Tỷ lệ (%)			
	M2.1	M2.2	M2.3	M2.4
Cao M2	1	4	7	0
Carbome 940	0,4	0,4	0,4	0,4
Propylene glycol	3	3	3	3
Triethanolamine	1	1	1	1
Nước vô trùng	94,6	91,6	88,6	95,6
Tổng	100%	100%	100%	100%



Hình 5. Gel M2.1, M2.2, M2.3, M2.4

3.5. Đánh giá các mẫu gel chiết xuất từ cao hỗn hợp mỏng toi – điệp cá

3.5.1. Khảo sát khả năng ức chế *P. acnes* của các mẫu gel chiết xuất từ cao hỗn hợp mỏng toi - điệp cá

Tiến hành khảo sát khả năng ức chế *P. acnes* của gel M2.1, M2.2, M2.3, M2.4 thu được kết quả như sau:

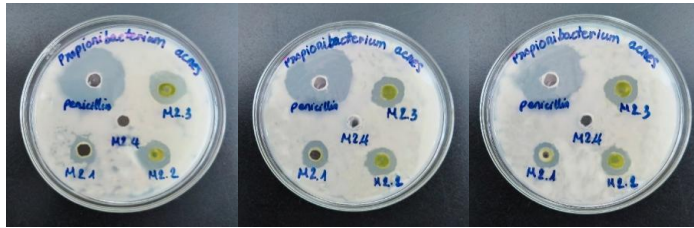
Bảng 12. Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế *P. acnes* của gel M2.1, M2.2, M2.3, M2.4

Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
Gel				Penicillin (10 μ g/mL)
M2.1	M2.2	M2.3	M2.4	
8,3 ^b ± 0,58	13,7 ^c ± 0,58	15,3 ^d ± 0,58	0,0 ^a ± 0,00	29,3 ^e ± 1,15

Ghi chú: Mẫu gel M2.4 được dùng làm đối chứng âm

Trong cùng một hàng, các số có chữ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,01$

Các mẫu gel M2.1, M2.2, M2.3 đều thể hiện hoạt tính ức chế *P. acnes* tốt, trong đó mẫu M2.3 là tốt nhất với đường kính vòng vô khuẩn là $15,3 \pm 0,58$ mm. Các thành phần tạo gel không có khả năng kháng khuẩn đối với dòng vi khuẩn *P. acnes*. So với kết quả nghiên cứu của Chutima Jantart và cộng sự về hoạt tính ức chế *P. acnes* của gel chiết xuất từ các loại thảo dược ở Thái Lan, gel chiết xuất từ cao hỗn hợp mỏng toi - điệp cá có hoạt tính ức chế *P. acnes* tốt hơn. Cụ thể, gel tạo từ hỗn hợp cao mỏng toi - điệp cá ở nồng độ 1% w/w đã thể hiện hoạt tính ức chế *P. acnes*. Trong khi đó, ở nồng độ 1% gel chiết xuất từ thảo dược không có khả năng ức chế dòng vi khuẩn và chỉ thể hiện hoạt tính ức chế dòng vi khuẩn ở nồng độ 5% w/w với đường kính vòng vô khuẩn là $10,0 \pm 1,00$ mm [1].

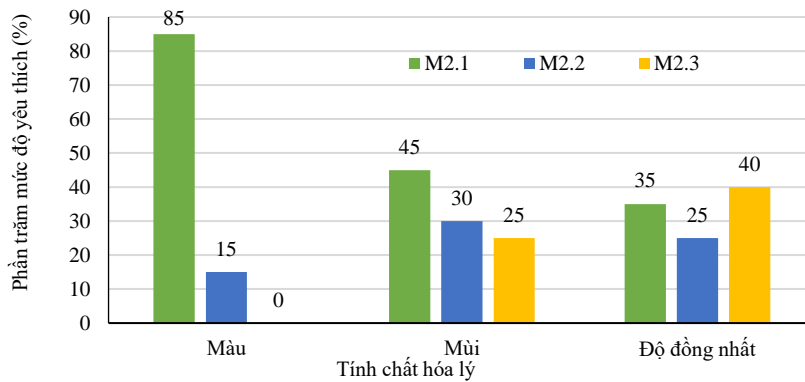


Hình 6. Kết quả khảo sát khả năng ức chế dòng vi khuẩn *P. acnes* của gel M2.1, M2.2, M2.3, M2.4

3.5.2. Đánh giá tính chất hóa lý, độ an toàn cho da của gel M2.1, M2.2, M2.3

3.5.2.1. Đánh giá tính chất hóa lý

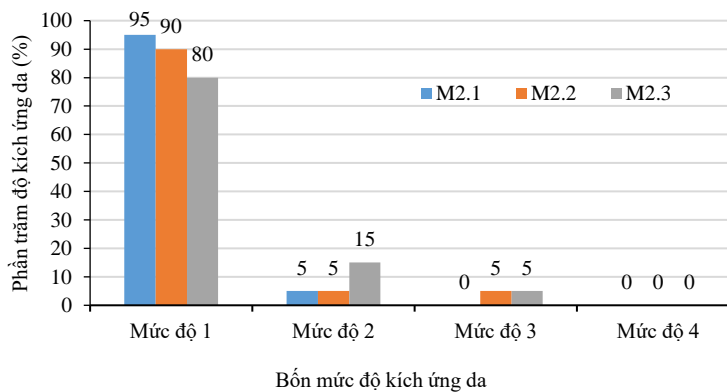
Đánh giá tính chất hóa lý dựa trên kết quả đánh giá cảm quan của 20 tình nguyện viên. Kết quả đánh giá cho thấy 3 mẫu gel cho cảm quan tốt; mùi thơm, dễ chịu; độ đồng nhất tốt. Độ pH của các mẫu M2.1, M2.2 và M2.3 lần lượt là 7,1; 6,8; và 6,2.



Hình 7. Đánh giá cảm quan độ yêu thích của ba mẫu gel M2.1, M2.2, M2.3

Kết quả ở Hình 7 cho thấy mẫu M2.1 chiếm tỷ lệ độ yêu thích cao nhất về màu, mùi. Mẫu M2.1 chiếm tỷ lệ độ yêu thích cao nhất về độ đồng nhất.

3.5.2.2. Đánh giá độ an toàn cho da (độ kích ứng da)



Hình 8. Đánh giá độ kích ứng da của ba mẫu gel M2.1, M2.2, M2.3

Kết quả ở Hình 8 cho thấy mẫu gel M2.1, M2.2 tương đối an toàn cho da. Cụ thể như sau:

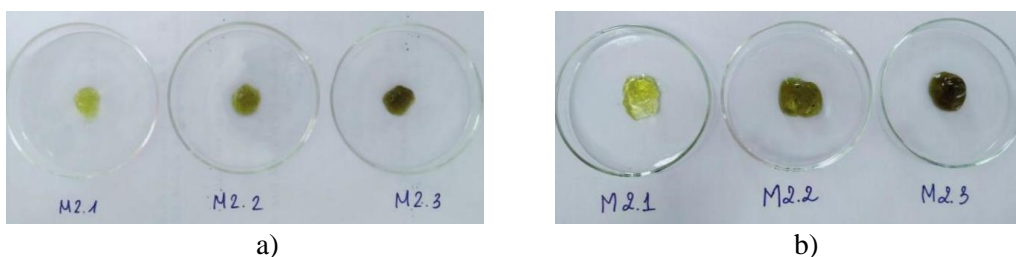
Mẫu M2.1: an toàn đối với da, không gây kích chiếm tỷ lệ 95%, gây kích ứng nhẹ chiếm tỷ lệ 5%, gây kích ứng vừa phải và kích ứng nghiêm trọng không có.

Mẫu M2.2: an toàn đối với da, không gây kích chiếm tỷ lệ 90%, gây kích ứng nhẹ chiếm tỷ lệ 5%, gây kích ứng vừa phải chiếm tỷ lệ 5%, gây kích ứng nghiêm trọng không có.

Mẫu M2.3: an toàn đối với da, không gây kích chiếm tỷ lệ 80%, gây kích ứng nhẹ chiếm tỷ lệ 15%, gây kích ứng vừa phải chiếm tỷ lệ 5%, gây kích ứng nghiêm trọng không có.

3.5.3. Đánh giá mức độ ổn định của gel M2.1, M2.2, M2.3

Các công thức gel được kiểm tra mức độ ổn định bằng cách sử dụng chu trình đóng băng và tan băng trong 6 chu kỳ. Đối với mỗi chu kỳ, các mẫu được đóng gói trong ống nhựa được bảo quản ở 4 °C trong 24 giờ, sau đó được lưu trữ ở 30°C trong 24 giờ. Sau khi hoàn thành sáu chu kỳ, các công thức gel được đánh giá về các tính chất hóa lý. Kết quả được thể hiện qua Hình 9.



a)
 Hình 9. Gel M2.1, M2.2, M2.3 trước và sau sáu chu kỳ đông lạnh - rã đông
 a) Gel M2.1, M2.2, M2.3 trước sáu chu kỳ đông lạnh - rã đông;
 b) Gel M2.1, M2.2, M2.3 sau sáu chu kỳ đông lạnh - rã đông

Sau 6 chu kỳ đông lạnh - rã đông, các đặc tính hóa lý của công thức gel về hình thức, màu sắc, mùi, độ đồng nhất và độ pH không thay đổi. Tương tự với nghiên cứu của Chutima Jantararat, các thành phần trong công thức tạo gel ổn định về mặt vật lý trong điều kiện gia tốc [1].

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết mỏng toi và diệp cá đều có khả năng kháng khuẩn trên dòng vi khuẩn *P. acnes*, cao hỗn hợp mỏng toi (nồng độ cao 250 mg/mL) - diệp cá (nồng độ cao 125 mg/mL) cho vòng vô khuẩn với đường kính là $18,7 \pm 0,58$ mm, bên cạnh đó gel được tạo từ cao hỗn hợp trên với các công thức 1% w/w, 4% w/w, 7% w/w đều có khả năng ức chế vi khuẩn *Propionibacterium acnes*. Trong đó, công thức gel hỗn hợp 7% w/w thể hiện hoạt tính ức chế dòng vi khuẩn tốt nhất với đường kính vòng vô khuẩn của là $15,3 \pm 0,58$ mm. Một trong những nguyên nhân giải thích tác dụng của các công thức gel hỗn hợp mỏng toi - diệp cá là do cao chiết mỏng toi, diệp cá có chứa các hợp chất alkaloid, flavonoid, phenolic, đây là các hợp chất quan trọng có khả năng kháng khuẩn. Như vậy, gel hỗn hợp mỏng toi - diệp cá có hiệu quả trong việc ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây mụn trứng cá điển hình là vi khuẩn *Propionibacterium acnes*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 117/HĐ-DCT ngày 03/09/2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jantarat C., Sirathanarun P., Chuchue T., Konpian A., Sukkua G., Wongprasert P. - In vitro antimicrobial activity of gel containing the herbal ball extract against *Propionibacterium acnes*, *Scientia Pharmaceutica* **86** (1) (2018) 8.
2. Shantha T.R., Patchaimal P., Reddy M.P., Kumar R.K., Tewari D. Bharti V., Venkateshwarlu G., Mangal A.K., Padhi M.M., Dhiman K.S. - Pharmacognostical standardization of *Upodika- Basella alba* L.: An important ayurvedic antidiabetic plant, *Ancient Science of Life* **36** (1) (2016) 35-41.
3. Rathee Sushila, Ahuja Deepti, Rathee Permender, Thanki Madhavi, Rathee Dharmender - Cytotoxic and antibacterial activity of basella alba whole plant: A relatively unexplored plant, *Pharmacologyonline* **3** (2010) 651-658.
4. Ibrahim T.A., Ajongbolo K.F. and Aladekoyi G. - Phytochemical screening and antimicrobial activity of crude extracts of *Basella alba* and *Helianthus annuus* on selected food pathogens, *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* **3** (2) (2014) 27-31.
5. Kumar M., Prasad S.K., Hemalatha S. - A current update on the phytopharmacological aspects of *Houttuynia cordata* Thunb, *Pharmacogn Review* **8** (15) (2014) 22-35.
6. Nguyễn Thanh Nhật Phương, Phạm Tấn Phương, Nguyễn Hoàng Trí Tài, Trần Hồng Đức, Nguyễn Đức Độ - Khảo sát hàm lượng alkaloid, flavonoid và khả năng kháng khuẩn của cao chiết cỏ màn trâu (*Eleusine indica*), *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* **53** (B) (2017) 54-60.
7. Chang C.C, Yang M.H., Web H.M., Chern J.C. - Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of Food and Drug Analysis* **10** (3) (2002) 178-182.
8. Mounyr Balouiri, Moulay Sadiki, Saad Koraiichi Ibsouda. - Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6** (2) (2016) 71-79.
9. Bộ Y tế - Thông tư 06/2011/TT-BYT về quản lý mỹ phẩm (2011).
10. Ghovvati M., Afshari G.K., Nasrollahi S.A., Firooz A., Samadi A., Karimi M., Talebi Z., Kolahdooz S., Vazirian M. - Efficacy of topical cinnamon gel for the treatment of facial acne vulgaris: A preliminary study, *Biomedical Research and Therapy* **6** (1) (2019) 2958-2965.
11. Hoàng Văn Tuấn, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Đình Luyện, Nguyễn Thanh Hảo - Nghiên cứu tách chiết và xác định một số hoạt tính sinh học của dịch chiết flavonoid từ cây diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunberg) thu hái tại Hà Nội, *Tạp chí Sinh học* **35** (3se) (2013) 183-187.
12. Indranath Ghosal, Debosree Mukherjee, Csaba Hancz, Suman Bhusan Chakraborty - Efficacy of *Basella alba* and *Tribulus terrestris* extracts for production of monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **5** (8) (2015) 152-158.
13. Võ Thị Kiều Ngân, Nguyễn Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thanh Hoàng, Trần Hồng Đức, Nguyễn Đức Độ - Khảo sát hàm lượng phenolic tổng, flavonoid tổng, hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết ethanol và methanol của lá và thân rễ cây cỏ tranh (*Imperata cylindrica*), *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* **52** (B) (2017) 16-22.

14. Chomnawang M.T., Surassmo S., Nukoolkarn V.S., Gritsanapan W. - Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria, *Journal of Ethnopharmacology* **101** (1-3) (2005) 330-333.

ABSTRACT

STUDY ON THE INHIBITORY EFFECTS OF GEL CONTAINING VINE SPINACH (*Basella alba* L.) AND FISH-MINT (*Houttuynia cordata* Thunb) EXTRACTS ON *Propionibacterium acnes*

Pham Thi Kieu Oanh*, Phan Nu Hoang Oanh, Hoang Xuan The
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: phamoanh283@gmail.com

Acne vulgaris is a common chronic disorder of the pilosebaceous unit and *P. acnes* is the main cause of acnes on the skin. Two main problems of conventional acne vulgaris treatments are antibiotic resistance and side effects on the skin. So that, botanical products with antimicrobial activity could be a good choice for acne vulgaris treatment. Vine spinach (*Basella alba* L.) and fish-mint (*Houttuynia cordata* Thunb) are commonly used in traditional herbal medicine to treat boils and skin infections. However, the inhibitory effects of these plant extracts on *P. acnes* are still remains elusive. The present study investigated the antibacterial effects of *Basella alba* L. and *Houttuynia cordata* Thunb extract gels against *P. acnes*. The MIC (Minimal Inhibitory Concentration) value of *Basella alba* L. extract and *Houttuynia cordata* Thunb extract on *P. acnes* was 125 and 62,5 mg/mL, respectively. Our results showed that the gel containing combined *Basella alba* L. and *Houttuynia cordata* Thunb extract inhibited *P. acnes* with average zone of inhibition diameter was $15,3 \pm 0,58$ mm.

Keywords: *Basella alba*, *Houttuynia cordata*, *Propionibacterium acnes*, acne vulgaris.