

Phát triển phương pháp khuếch tán - so màu trên đĩa thạch trong sàng lọc và phát hiện các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ các dịch chiết thực vật

Phạm Thị Lương Hằng*, Đoàn Thị Duyên, Nguyễn Thị Yên, Ngô Thị Trang

*Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 02 tháng 11 năm 2012

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 11 năm 2012; chấp nhận đăng ngày 07 tháng 5 năm 2013

Tóm tắt. Chúng tôi đã nghiên cứu tối ưu hóa phương pháp thử hoạt tính kháng khuẩn dựa trên phương pháp khuếch tán qua thạch, đồng thời đề xuất kỹ thuật nhuộm màu vi sinh vật đơn giản và hiệu quả cho việc phân tích kết quả từ phép thử hoạt tính bằng thuốc nhuộm Iodonitrotetrazolium chloride (INT). Từ đó, quy trình sàng lọc và phát hiện các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ các dịch chiết tự nhiên đã được thiết lập và đề xuất. Dựa vào quy trình này, 8 trong số 10 dịch chiết từ 3 loài thực vật: Xương sông, Chè Vàng và Xạ đen đã cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn gram dương, trong đó, 3 dịch chiết: n-hexane và EtOAc của Xương sông và dịch chiết nước của Xạ đen có hoạt tính tương đối tốt trên vi khuẩn *B. subtilis*, với đường kính vòng vô khuẩn 6 -7 mm.

Từ khóa: khuếch tán-so màu, kháng khuẩn, Iodonitrotetrazolium chloride (INT), Xương sông, Xạ đen.

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là một Quốc gia giàu tiềm năng về cây thuốc. Số loài cây thuốc chính thức đã được thống kê là 3.850 loài. Việc sử dụng cây thuốc để chữa bệnh nhiễm khuẩn ở Việt Nam đã có từ rất lâu đời và gần đây, nhiều ông trình nghiên cứu đã chứng minh cơ sở khoa học cho các bài thuốc, các kinh nghiệm chữa bệnh quý báu của ông cha ta. Đặc biệt, có những công trình nghiên cứu phát hiện các hợp chất kháng khuẩn của những cây đã được sử dụng

làm thực phẩm trong đời sống của nhân dân như: Tỏi [1], Cần tàu [2], Mướp đắng [3], Vối [4]... Điều này rất có ý nghĩa trong việc tạo ra các thực phẩm bổ sung (không độc hại, không tác dụng phụ) trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh nhiễm khuẩn cho người dân. Trong công trình này chúng tôi sẽ bổ sung những dẫn liệu khoa học về tiềm năng kháng khuẩn của hai loại cây đã được sử dụng làm thực phẩm hàng ngày là cây Xương sông (*Blumea myriocephala* D. C.) và Chè Vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume.). Bên cạnh đó chúng tôi còn chỉ ra khả năng kháng khuẩn của dịch chiết từ cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) - Một loài cây thuốc mang tính thời sự dùng trong chữa bệnh

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-906221180.
E-mail: luonghang@vnu.edu.vn

Ung thư của Lương ở Y tỉnh Hòa Bình trong những năm gần đây [5].

Các nghiên cứu trên của các nhà khoa học Việt Nam đã cho thấy tiềm năng dược liệu của những cây thuốc Việt nam. Tuy nhiên, để tách chiết được thành công một chất có hoạt tính kháng khuẩn từ một dịch chiết tổng hợp mà chưa có một khái niệm ban đầu về cấu trúc phân tử, trọng lượng phân tử hay thành phần cấu tạo để nhận diện trong quá trình tách chiết là một vấn đề hết sức khó khăn và phức tạp. Công cụ chủ yếu giúp cho quá trình tách chiết này chỉ là dựa trên hoạt tính sinh học của chất đó nằm trong một hỗn hợp ban đầu. Chính vì thế, việc xây dựng được một phương pháp thử hoạt tính sinh học cho kết quả nhanh, chính xác là một yêu cầu cấp thiết trong lĩnh vực nghiên cứu các hợp chất tự nhiên. Bên cạnh đó, để tránh thu được một chất đã biết hoặc có hoạt tính kháng sinh yếu sau một thời gian dài đầu tư nghiên cứu thì cần phải có một phương pháp nhận diện nhanh các chất có hoạt tính ngay cả trước khi tiến hành các bước tinh sạch.

Phương pháp khuyếch tán qua thạch có sử dụng đĩa giấy được đưa ra lần đầu tiên từ năm 1950 bởi nhà khoa học B. A. Thompson [6]; Cho đến nay phương pháp này đã khẳng định được vai trò hữu hiệu của nó và được sử dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu về công nghệ sinh học và y dược học. Ở Việt nam, các nhà khoa học đã có nhiều nghiên cứu cải tiến trong phương pháp này theo hướng nhanh hơn, đơn giản hơn: đục lỗ thạch thay cho đĩa giấy hoặc cấy trái vi khuẩn thay cho trộn mẫu vi khuẩn vào môi trường thạch. Tuy nhiên trong một số trường hợp lại xuất hiện nhiều hạn chế như: mật độ vi khuẩn không đồng nhất, dung môi còn lại trong các giếng thử, nhất là việc khó xác định được vòng kháng khuẩn khi sử dụng phép thử này cho các dịch chiết có màu từ thực vật. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu tối ưu

hóa phương pháp thử hoạt tính, đồng thời đề xuất kỹ thuật nhuộm màu vi sinh vật đơn giản và hiệu quả cho việc phân tích kết quả từ phép thử hoạt tính bằng thuốc nhuộm Iodonitrotetrazolium chloride (INT). INT là một chất được sử dụng để phát hiện hoạt tính của enzyme dehydrogenase có mặt trong quá trình hô hấp hiếu khí và kỵ khí của vi sinh vật [7]. Điện tử và hydro được tách ra từ cơ chất bởi enzym này sẽ được chuyển đến một chất nhận hydro, thường là một co-enzyme. INT lại nhận điện tử và hydro từ co-enzyme để tạo thành chất kết tinh có màu đỏ. Vì vậy, khi phun sương các đĩa thử hoạt tính với dung dịch INT, vòng vô khuẩn sẽ hiện lên rõ nét với màu trắng trên nền đỏ của vi khuẩn [8].

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

- Mẫu thực vật gồm 3 loài: lá Xương sông (*Blumea myriocephala* D. C.), Chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume.) và Xạ đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.)

- Thời gian và địa điểm thu hái:

+ Lá Xương sông được thu mua vào tháng 6, 7 năm 2010 tại Hà Nội.

+ Chè vàng được thu mua vào tháng 5 năm 2010 tại Nghệ An

+ Xạ đen được mua vào tháng 8 năm 2010 tại Viện dược liệu – Hà Nội.

- Các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu được Bộ môn vi sinh vật học- Trường Đại học khoa học tự nhiên cung cấp bao gồm:

+ Vi khuẩn Gram dương: *Bacillus subtilis* và *Sarcina* sp.

+ Vi khuẩn Gram âm: *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- Chất nhuộm màu vi khuẩn: Iodonitrotetrazolium chloride (INT), đặt mua của hãng Sigma.

2.2. Phương pháp

- Phương pháp tách chiết: Các mẫu thực vật khô được chiết liên tiếp với 3 loại dung môi là n-hexane, Ethyl acetate và Methanol. Một lượng 6g mẫu bột lá được nghiền thành bột mịn, sau đó được khuấy từ với dung môi n-hexane trong 1 giờ. Kết thúc giai đoạn khuấy từ, hỗn hợp sẽ được ly tâm với tốc độ 4000 vòng/10 phút, lọc và thu dịch chiết n-hexane. Phần cặn sẽ được tiếp tục khuấy từ trong dung môi ethyl acetate và trong methanol với các bước lặp lại như với dung môi n-hexane để thu được dịch chiết ethyl acetate và methanol. Riêng mẫu xạ đen được tạo thêm dịch chiết nước theo phương pháp sắc nước truyền thống với 20g mẫu khô. Các dịch chiết sau đó sẽ được làm bay hơi dung môi bằng máy cất quay chân không để thu được các cao khô, dùng cho các phép thử hoạt tính.

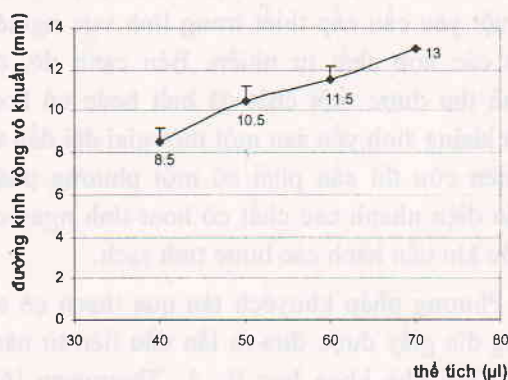
- Phương pháp khuếch tán đĩa giấy – thử hoạt tính kháng khuẩn: Cao khô được hòa tan lại bằng dung môi methanol rồi được tra lên các đĩa giấy (6 mm). Sau khi dung môi đã bay hơi hoàn toàn, các đĩa giấy này được đặt lên các đĩa thạch chứa vi khuẩn đã chuẩn bị trước và đặt trong tủ lạnh. Tiếp đó, các đĩa thử này chuyển vào tủ ấm và kiểm tra kết quả sau 24 giờ.

3. Kết quả và thảo luận

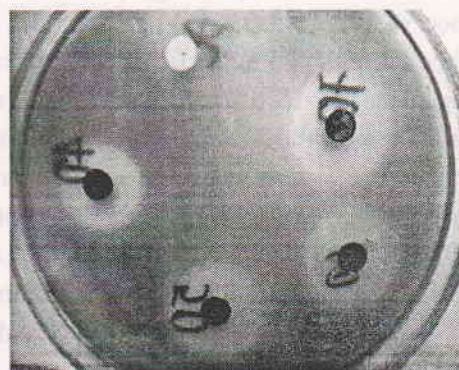
3.1. Thiết kế quy trình thử hoạt tính kháng khuẩn

Ảnh hưởng của thể tích mẫu thử: Thể tích mẫu thử có ảnh hưởng gián tiếp đến kết quả của phép thử hoạt tính thông qua bước hòa tan mẫu và tra mẫu vào đĩa giấy. Trong một

khảo sát sơ bộ chúng tôi đã thấy rằng dịch chiết EtOAc Xương sông có khả năng ức chế vi khuẩn *B. subtilis*, nên chúng tôi đã sử dụng dịch chiết này cho thí nghiệm với hàm lượng 4 mg trong các thể tích dung môi: 40; 50; 60 và 70 μL , thời gian khuếch tán mẫu là 4 giờ. Kết quả cho thấy, tăng thể tích dung môi hòa tan có thể làm tăng kích thước vòng vô khuẩn, đường kính vòng vô khuẩn tăng nhiều khi sử dụng thể tích từ 50 - 70 μL và đạt cao nhất 13 mm khi pha loãng trong 70 μL dung môi (hình 1 và 2). Tuy nhiên nếu tiếp tục tăng thể tích mẫu trên 70 μL thì các mẫu sẽ rớt ra ngoài đĩa giấy, làm giảm hàm lượng mẫu thử, vì vậy chúng tôi đề xuất thể tích mẫu thử tối đa để hấp thụ vào đĩa giấy là 70 μL .

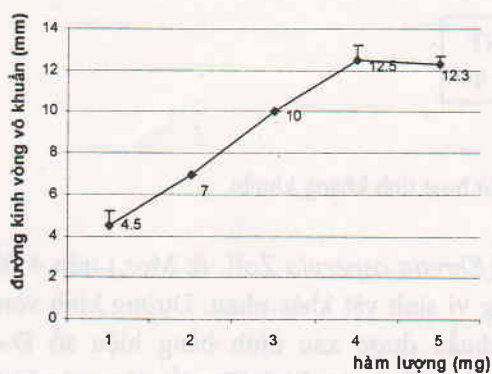


Hình 1. Kết quả thử hoạt tính với các thể tích mẫu khác nhau.

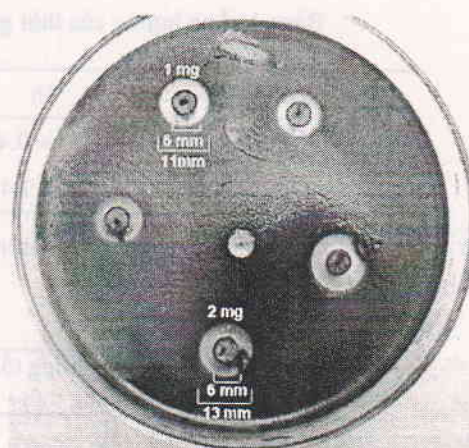


Hình 2. Thể tích mẫu thử 40; 50; 60 và 70 μL trên *B. subtilis*.

Ảnh hưởng của hàm lượng mẫu thử: Với mục đích tìm ra hàm lượng chất thử nhỏ nhất có thể cho kết quả dương tính và thuận tiện thao tác trong các bước tiến hành, một dãy các hàm lượng: 1; 2; 3; 4; 5 mg chất thử được sử dụng làm đối tượng trong thí nghiệm này, các mẫu thử được pha loãng trong thể tích dung môi từ 50 - 70 μ L. Kết quả cho thấy, kích thước vòng vô khuẩn tăng tỷ lệ thuận với hàm lượng mẫu thử từ 1- 4 mg (hình 3 và 4). Ở hàm lượng chất thử 5mg, đường kính vòng vô khuẩn gần tương đương với đường kính vòng kháng của hàm lượng 4 mg, điều này có thể là do khi hàm lượng mẫu thử quá cao, các hoạt chất khó được hòa tan hoàn toàn và bị giữ lại một lượng nhỏ ở đĩa giấy. Từ đó cho thấy hàm lượng chất thử từ 1-4 mg là hoàn toàn có thể sử dụng được cho phép thử hoạt tính, tức là ở nồng độ nhỏ nhất là 1 mg cũng có thể cho kết quả phép thử dương tính ở những dịch chiết tự nhiên có hoạt tính thực sự. Tuy nhiên, khi sử dụng hàm lượng quá nhỏ (1 mg) thì sẽ gặp khó khăn khi sử dụng cân điện tử để cân mẫu, vì vậy chúng tôi đề xuất một hàm lượng hợp lý cho phép thử hoạt tính là 2 mg.



Hình 3. Kết quả thử hoạt tính với các hàm lượng mẫu khác nhau.



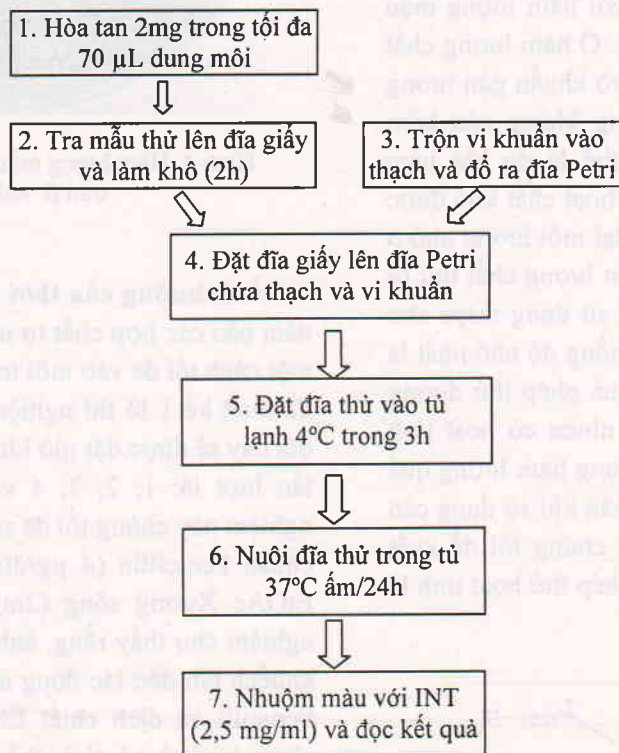
Hình 4. Hàm lượng mẫu thử 1 mg và 2 mg trên *B. subtilis*.

Ảnh hưởng của thời gian khuếch tán: Để đảm bảo các hợp chất tự nhiên được khuếch tán một cách tối đa vào môi trường thạch, chúng tôi đã thiết kế 1 lô thí nghiệm gồm 5 đĩa thử, các đĩa này sẽ được đặt giờ khuếch tán trong tủ lạnh lần lượt là: 1; 2; 3; 4 và 5h. Đối với lô thí nghiệm này chúng tôi đã sử dụng đồng thời chất chuẩn Penicillin (4 μ g/đĩa giấy) và dịch chiết EtOAc Xương sừng (2mg/đĩa giấy). Các thử nghiệm cho thấy rằng, ảnh hưởng của thời gian khuếch tán đến tác động ức chế của chất chuẩn Penicilli và dịch chiết EtOAc Xương sừng là như nhau và có tính thống kê (bảng 1). Nếu tăng thời gian khuếch tán từ 1h đến 3 h thì kết quả vòng vô khuẩn tăng lên rõ rệt ở cả dịch chiết và chất đối chứng dương. Ngoài khoảng thời gian này thì sự sai khác trong kích thước vòng kháng khuẩn không lớn. Điều đó có thể kết luận rằng thời gian 3h là tối ưu để 2mg dịch chiết tự nhiên cũng như 4 μ g có thể khuếch tán hoàn toàn vào đĩa thạch gây tác động ức chế đối với vi khuẩn.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khuếch tán mẫu đến phép thử hoạt tính

Thời gian	1h	2h	3h	4h	5h
EtOAc Xương sồng (mm)	3.3 ± 0.4	5 ± 0.0	6 ± 1.4	6.8 ± 0.4	6.5 ± 0.7
Penicillin (mm)	18 ± 1.4	21.5 ± 0.7	24 ± 0.0	24.3 ± 0.4	24.3 ± 0.4

Từ những nghiên cứu và phân tích ở trên chúng tôi đề xuất quy trình thử hoạt tính kháng khuẩn gồm 7 bước như hình 5.



Hình 5. Các bước cơ bản trong quy trình thử hoạt tính kháng khuẩn.

3.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn

Áp dụng quy trình thử hoạt tính kháng khuẩn ở trên chúng tôi đã tiến hành sàng lọc hoạt tính của 10 dịch chiết từ 3 loài thực vật: lá Xương sồng (*Blumea myriocephala* D. C.), Chè vàng (*Jasminum subtriplinerve* Blume.) và Xạ

đen (*Ehretia asperula* Zoll. & Mor.) trên 4 đối tượng vi sinh vật khác nhau. Đường kính vòng vô khuẩn được xác định bằng hiệu số D-d, trong đó d là đường kính đĩa giấy (6 mm) còn D là tổng đường kính vòng ngoài. Kết quả của quá trình sàng lọc được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của các dịch chiết tự nhiên

Dịch chiết	D - d (mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>Sarcina</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Xương sông	n-hexane	6	-	-	-
	EtOAc	7	2	-	-
	MeOH	2	-	-	-
Chè vàng	n-hexane	2	-	-	-
	EtOAc	4	2	-	-
	MeOH	4	-	-	-
Xạ đen	n-hexane	-	-	-	-
	EtOAc	-	-	-	-
	MeOH	2	-	-	-
	nước	7	-	-	-

-: không có hoạt tính; +: hoạt tính yếu ($1\text{ mm} < D-d \leq 4\text{ mm}$),

++: hoạt tính trung bình: ($5\text{ mm} \leq D-d < 10\text{ mm}$); +++: hoạt tính mạnh ($D-d > 10\text{ mm}$).

Kết quả cho thấy, tất cả các dịch chiết của xương sông thể hiện tính kháng khuẩn đối với các vi khuẩn *B. subtilis* và chỉ có dịch chiết EtOAc có hoạt tính kháng vi khuẩn *Sarcina* sp. ($D= 2\text{mm}$). Không có dịch chiết nào có hoạt tính đối với vi khuẩn Gram âm: *E. coli* và *P. aeruginosa*. Từ đó cho thấy, các dịch chiết này có tác động chọn lọc trên vi khuẩn Gram dương. Trong đó dịch chiết EtOAc và n-hexane có hoạt tính tốt nhất trên *B. subtilis* với đường kính vòng kháng là 6-7 mm (hình 6). Theo kinh nghiệm dân gian, lá Xương sông ngoài việc sử dụng để chế biến món ăn, nó còn được dùng trong chữa nhiều bệnh mụn nhọt, lở loét và đau xương khớp. Trong nghiên cứu này, đây là lần đầu tiên lá xương sông được nghiên cứu một cách khoa học về tác dụng kháng khuẩn. Từ các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy trong lá Xương sông chứa tới một lượng tinh dầu lớn gồm: 96,95% methylthimol và 1,7% O-ximen [9-10], chúng tôi dự đoán rằng có khả năng tác dụng kháng khuẩn này trong dịch chiết EtOAc xương sông được gây ra bởi chính các hợp chất có mặt trong tinh dầu của Xương sông. EtOAc là dung môi có khả năng chiết rút tinh dầu cao

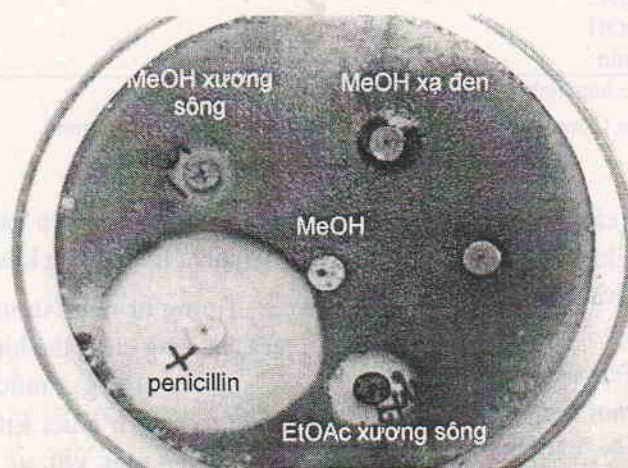
và tinh dầu được xếp vào một nhóm chất có thể hiện hoạt tính kháng khuẩn.

Tương tự như Xương sông, cả 3 dịch chiết từ Chè vàng cũng thể hiện tính kháng khuẩn với *B. subtilis* nhưng ở mức độ nhỏ hơn (2-4 mm), đồng thời dịch chiết EtOAc cũng thể hiện tính kháng yếu đối với vi khuẩn *Sarcina* sp. Chè vàng là một loại cây được sử dụng làm đồ uống phổ biến của những người dân ở tỉnh Nghệ An và Hà Tĩnh. Qua một số kết quả nghiên cứu cho thấy trong chè vàng rất giàu các hợp chất flavonoid [11-12], tuy nhiên chưa có công bố nào nêu ra tên của hợp chất có khả năng kháng khuẩn ở Chè vàng. Cùng với nghiên cứu của trường Đại học Dược thành phố Hồ Chí Minh khẳng định các dịch chiết của chè vàng đều cho kết quả kháng khuẩn trừ dịch chiết nước [13] đã cho thấy điểm tương đồng với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi. Từ đó cũng cho thấy, phương pháp thử hoạt tính mà chúng tôi đưa ra đảm bảo chính xác và có độ tin cậy cao.

Dịch chiết MeOH và dịch chiết nước của xạ đen thể hiện hoạt tính kháng sinh với vi khuẩn *B. subtilis* tương ứng là 2 mm và 7 mm. Điều đó cho thấy đối với Xạ đen các chất có hoạt

tính kháng khuẩn là những chất có độ phân cực cao. Dịch chiết nước bằng cách sắc truyền thống vẫn cho kết quả kháng khuẩn tốt chứng tỏ rằng các chất có hoạt tính bền với nhiệt độ 100°C. Xạ đen là một cây thuốc mang tính thời sự trong những năm gần đây, bởi khả năng hỗ trợ điều trị ung thư của một số bài thuốc của lương y tinh Hòa Bình. Tuy nhiên, một số hợp chất thuộc nhóm Oleanan được cho là có khả

năng kháng ung thư tách chiết từ cây xạ đen lại không đạt tiêu chuẩn của Viện nghiên cứu Ung thư quốc gia Hoa kỳ [14]. Vì vậy, khả năng kháng ung thư và hợp chất kháng ung thư của hợp chất này vẫn cần phải tiếp tục xem xét. Ở một khía cạnh khác chúng tôi đã xem xét khả năng kháng khuẩn của các dịch chiết từ lá Xạ đen, đây là một phát hiện mới về hoạt tính sinh học của cây thuốc Xạ đen.



Hình 6. Vòng vô khuẩn trên *B. Subtilis*.

4. Kết luận

1) Đã thiết lập thành công quy trình thử hoạt tính kháng khuẩn từ nguồn nguyên liệu tự nhiên theo phương pháp khuếch tán qua thạch với sự tối ưu hóa của các chỉ tiêu: hàm lượng mẫu thử (2 mg), thể tích mẫu thử (tối đa 70 μ l), thời gian khuếch tán (3h) và nhuộm màu vi khuẩn với dung dịch Iodonitrotetrazolium chloride nồng độ 2,5 mg/ml.

2) Áp dụng quy trình thử hoạt tính kháng khuẩn cho các dịch chiết từ 3 loài thực vật: Xương sồng, Chè Vàng và Xạ đen cho thấy 8 trong số 10 dịch chiết có hoạt tính kháng với vi khuẩn gram dương. Trong đó, 3 dịch chiết: n-hexane và EtOAc của Xương sồng và dịch chiết

nước của Xạ đen có hoạt tính tương đối tốt trên vi khuẩn *B. subtilis*, với đường kính vòng vô khuẩn 6-7 mm.

Lời cảm ơn

Tập thể thực hiện đề tài TN – 10 – 30 xin trân trọng cảm ơn Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN đã tài trợ kinh phí. Chúng tôi cũng xin cảm ơn Bộ môn Vi sinh vật, Khoa Sinh học, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Enzyme và Protein cũng như Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, ĐHQG Hà nội đã cung cấp các chủng vi khuẩn và tạo điều kiện cho sử dụng thiết bị cho nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- [1] Hoàng Đình Hoà, cs., Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chế phẩm từ tỏi (*Allium sativum*) nhằm ứng dụng để bảo quản thực phẩm. Hội nghị Khoa học lần thứ 20 - Kỷ niệm 50 năm thành lập trường Đại học Bách khoa Hà Nội 1956 - 2006, 7 (2006) 120.
- [2] Trần Thị Phụng, cs., Khảo sát tinh dầu cần tàu (*Apium graveolens* L. var. *graveolens*). Tuyển tập các công trình hội nghị khoa học và công nghệ hoá hữu cơ toàn quốc lần thứ 3, (2005) 409.
- [3] Hoàng Thu Hà, Phạm Thị Trân Châu, Một số thành phần hoá sinh và hoạt tính sinh học của dịch ép từ thịt quả mướp đắng (*Monordia charantia* L.), TC Sinh học, 1 (2006) 75.
- [4] Nguyễn Văn Thuán, Nguyễn Văn Đậu, Góp phần nghiên cứu thành phần hóa học của lá cây vối, Hóa học và ứng dụng, 9 (2006) 46.
- [5] Lê Thị Huyền, và cs., Hoạt tính độc tế bào của cây xạ đen và cây bông ổi, Tuyển tập các công trình Hội nghị khoa học và công nghệ hoá học hữu cơ toàn quốc lần thứ tư - Hội Hoá học Việt Nam, (2007) 624.
- [6] Trịnh Thị Thùy, cs., Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất tritecpen từ cây xạ đen, TC Hóa học, 4 (2008) 456.
- [7] B.A. Thompson, Dried discs technique for determining sensitivity to the antibiotics, J. clin. Path, 3 (1950) 118.
- [8] O.K. Onajole, et al., In vitro antifungal and antibacterial activities of pentacycloundecane tetra-amines Chem Biol Drug Des, 77 (2011) 295.
- [9] N. Didry, et al., New procedure for direct bioautographic TLC assay as applied to a tincture of *Ranunculus bulbosus*, J. Ethnopharmacol, 29 (1990) 283.
- [10] Ngô Thị Lý, et al., Một vài phản ứng của o-methylthymol tách từ tinh dầu lá xương sông (*Blumea myriocephala* D.C.), 4 (2004) 74.
- [11] Lê Thị Anh Đào, Lê Thị Thu Hương, Nghiên cứu một số thành phần hoá học của lá xương sông (*Blumea myriocephala* D.C.), TC Khoa học: Các khoa học tự nhiên (Trường đại học sư phạm Hà Nội), 1 (2003) 88.
- [12] Nguyễn Thị Hồng Hương, et al., Định lượng một số flavonoid và phenylethanoid glycosid trong chè vàng bằng điện di mao quản, TC Kiểm nghiệm thuốc, 3 (2008) 10.
- [13] Nguyễn Thị Hồng Hương, et al., Góp phần nghiên cứu các flavonoid trong cây chè vàng (*Jasminum subtriplonerve* Blume), TC Dược học, 11 (2007) 29.
- [14] D.H.Ngan, et al., Bioactivities and chemical constituents of a Vietnamese medicinal plant Che Vang, *Jasminum subtriplinerve* Blume (Oleaceae). Nat Prod Res, 22 (2008) 942.

Development of colorimetric agar-diffusion method for screening and detection of anti-bacterial compounds from plant extracts

Phạm Thị Lương Hằng, Đoàn Thị Duyên, Nguyễn Thị Yến, Ngô Thị Trang

Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi Str., Thanh Xuân Dist., Hanoi, Vietnam

Abstract. We have optimized antibacterial bioassay based on agar-diffusion method, and proposed a simple and effective staining technique for analysis of results using Iodonitrotetrazolium chloride (INT). Since then, the procedure for screening and detection of antibacterial compounds from natural extracts have been established. Based on the screening procedure, 8 out of 10 extracts from three plant species: *Blumea myriocephala* D. C., *Jasminum subtriplinerve* Blume. and *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. have been shown the effective against Gram-positive bacteria. Of these, three extracts including n-hexane and EtOAc extracts from the *Blumea myriocephala* and aqueous extract of *Ehretia asperula*. exhibited the relatively good activity against *B. subtilis*, with a diameter of 6-7 mm.

Keywords: Colorimetric agar-diffusion, anti-bacterial activity, *Blumea myriocephala* D.C., *Ehretia asperula* Zoll. & Mor, Iodonitrotetrazolium chloride (INT).