



# TỔNG HỢP XANH NANO BẠC TỪ DỊCH CHIẾT ĐƯỢC LIỆU LÁ SIM (*RHODOMYRTUS TOMENTOSA*) VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN

## Green synthesis of silver nanoparticles using *rhodomyrtus tomentosa* leaf extract and characterization of their antibacterial activity

Nguyễn Thị Nga<sup>1</sup>, Lê Anh Tâm<sup>2</sup>, Ngô Văn Cường<sup>3</sup>, Nguyễn Văn Thành Đạt<sup>4</sup>,  
Nguyễn Thị Như Quỳnh<sup>5</sup>, Cao Văn Dư<sup>6\*</sup>

Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng

<sup>1</sup>nganguyen.120896@gmail.com, <sup>2</sup>anhtam.sn96@gmail.com, <sup>3</sup>vancuong283@gmail.com, <sup>4</sup>nvtat19@gmail.com,  
<sup>5</sup>ds.nhuquynhnguyen@gmail.com, <sup>6</sup>caovandulhu@gmail.com

**TÓM TẮT:** Trong bài báo này, đề tài trình bày phương pháp tổng hợp nano bạc trong môi trường dịch chiết nước lá Sim giàu polyphenol với vai trò vừa là tác nhân khử vừa là chất bảo vệ. Tính chất quang học, hình thái kích thước của các hạt nano bạc sau quá trình tổng hợp được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis, kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả UV-Vis cho thấy hấp thụ cực đại nằm trong khoảng 431 nm, hình thái kích thước qua TEM cho thấy các hạt chủ yếu ở dạng tựa cầu với kích thước phân bố  $15 \pm 1$  nm. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp đục lỗ trên thạch và phương pháp pha loãng trong ống nghiệm. Kết quả cho thấy dung dịch nano bạc tổng hợp có tác dụng kháng các vi khuẩn *S. aureus*, *S. faecalis*, *S. epidermidis* và *P. aeruginosa* khi quan sát vòng kháng khuẩn trên thạch. Giá trị MIC được xác định khoảng 15 mg/l cho tất cả các chủng thử nghiệm.

**TỪ KHOÁ:** nano bạc, sim, *rhodomyrtus tomentosa*, kháng khuẩn

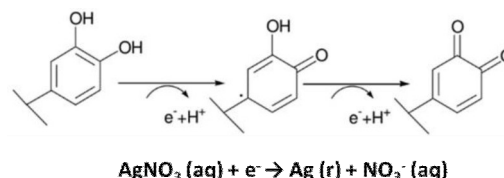
**ABSTRACT:** In this study, nanosilver particles NPs were synthesized from  $\text{AgNO}_3$  by using aqueous extract of *Rhodomyrtus tomentosa* both as bioreductant and capping agent. UV-visible spectroscopy, Transmission Electron Microscopy (TEM) were performed to ascertain the formation of Ag-NPs. The synthetic nanoparticles has showed maximum absorbance in 431 nm, size distribution about  $15 \pm 1$  nm. Antibacterial activity was evaluated by using agar diffusion and broth dilution method. The results showed the remarkable inhibition on the growth of *S. aureus*, *S. faecalis*, *S. epidermidis* và *P. aeruginosa*. MIC value is 15 mg/l for all tested bacteria.

**KEYWORDS:** Silver nanoparticles, *Rhodomyrtus tomentosa*, Antibacterial activity

## 1. GIỚI THIỆU

Một trong những thách thức lớn nhất của y học hiện nay là sự xuất hiện các chủng vi khuẩn đề kháng với các kháng sinh thông thường. Điều này đã thúc đẩy việc tìm kiếm các phương pháp thay thế, bao gồm cả ứng dụng các hạt nano bạc làm chất kháng khuẩn. Hạt nano bạc là cụm các nguyên tử bạc, có kích thước nanomet (khoảng  $1 \div 100$  nm). Diện tích bề mặt lớn làm tăng tính bám dính, đồng thời kích thước nhỏ giúp các phân tử này dễ dàng xâm nhập sâu vào bên trong, gây rối loạn các quá trình sinh hóa dẫn đến làm chết tế bào vi khuẩn [1].

Phương pháp phổ biến được sử dụng để tổng hợp nano bạc là phương pháp khử hóa học với việc sử dụng các tác nhân khử như hydrazin, natri borohydrid, ... nhằm chuyển hóa ion bạc thành bạc kim loại. Mặc dù thường tỏ ra hiệu quả, nhưng phương pháp này vẫn có hạn chế là độc tính của các chất sử dụng. Để tránh hoặc giảm thiểu ảnh hưởng của các chất độc hại, gần đây giới khoa học đã bắt đầu áp dụng định hướng của hóa học xanh trong việc điều chế nano bạc, với hai tiêu chí vừa kinh tế, vừa thân thiện với môi trường. Trong số các phương pháp hóa học xanh, phương pháp điều chế nano bạc từ phản ứng giữa bạc nitrat với dịch chiết dược liệu đang ngày càng cho thấy nhiều tiềm năng và ưu thế vì giá thành thấp, hoạt tính sinh học cao, quy trình tổng hợp đơn giản và thân thiện với môi trường. Nhờ sở hữu các thành phần có khả năng khử sinh học như các polyphenol: flavonoid, tanin... các dược liệu có thể được sử dụng để tổng hợp nano kim loại [2, 3].



Hình 1. Quá trình oxy hóa polyphenol trong dược liệu để tổng hợp nano bạc [4]

Cây Sim được trồng phổ biến ở Việt Nam, lá cây Sim đã được chứng minh có nhiều nhóm polyphenol, thích hợp để làm chất khử trong tổng hợp nano bạc [5] đồng thời cấu trúc của polyphenol cũng có khả năng làm chất ổn định kích thước và bảo vệ [6] các hạt nano bạc sau quá trình khử. Do vậy, trong nội dung nghiên cứu này, đề tài sử dụng dịch chiết nước lá Sim để tổng hợp nano bạc. Việc tổng hợp thành công nano bạc từ dịch chiết lá Sim mang nhiều lợi ích khi vừa tận dụng nguồn tài nguyên thực vật sẵn có, vừa tạo ra hệ chất tăng cường hoạt tính kháng khuẩn, thay thế cho các kháng sinh.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu

Bạc nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) được mua của Yuyu-chem (Trung Quốc), dược liệu lá Sim được thu hái tại Bình Sơn, Quảng

Received: April, 19th, 2019

Accepted: July, 25th, 2019

\*Corresponding Author

Email: caovandulhu@gmail.com

Ngãi vào tháng 12 năm 2018. Mẫu được định danh và lưu mẫu tại Bộ môn Dược liệu – Đại học Lạc Hồng.

## 2.2 Tổng hợp nano bạc

Lá cây Sim được rửa sạch bằng nước cất, sấy khô ở 70 °C đạt độ ẩm nhỏ hơn 13%, xay nhỏ, rây qua rây đường kính 2 mm. Cân 25 g dược liệu, tiến hành chiết với 200 ml nước cất, đun cách thủy ở 80 °C trong 20 phút, lọc thu dịch chiết. Dịch chiết sau đó được tạo hỗn hợp và tiến hành phản ứng tổng hợp nano bạc với dung dịch AgNO<sub>3</sub> 0,01 M trên bếp khuấy từ với tốc độ 400 vòng/phút. Các thông số tiến hành khảo sát: tỷ lệ dịch chiết/bạc nitrat, nhiệt độ phản ứng và thời gian phản ứng.

## 2.3 Xác định cấu trúc

Tính chất quang học của nano bạc được xác định bằng Phổ UV-Vis trên máy UV Thermo EVO300 PC tại bộ môn Hóa phân tích-Kiểm nghiệm, Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng. Hình thái kích thước và sự phân bố các hạt nano bạc được xác định từ ảnh TEM đo trên máy JEM-1400, Nhật Bản tại Trường Đại học Bách Khoa thành phố Hồ Chí Minh kết hợp phần mềm Image Tool.

## 2.4 Xác định hoạt tính kháng khuẩn

Bốn chủng vi khuẩn *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853 được cấy hoạt hóa trong môi trường BHI, ủ ở 37 °C trong 24 giờ để có độ đục bằng độ đục Mc Farland 0,5 (OD tại 600 nm trong khoảng 0,08 ÷ 0,1), tương đương với 1 ÷ 1,5×10<sup>8</sup> vi khuẩn/ml. Pha loãng 1/100 để được mẫu có nồng độ 1 ÷ 1,5×10<sup>6</sup> vi khuẩn/ml cho thử nghiệm [7]

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định theo phương pháp Kirby-Bauer [8]: vi khuẩn thử nghiệm được trải trên thạch MHA, đục các giếng có đường kính 6 mm trên thạch. Cho vào mỗi giếng 80 µl dung dịch nano bạc ở các nồng độ khác nhau. Quan sát kết quả vòng kháng khuẩn sau khi ủ mẫu 24 giờ ở 37 °C.

Giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) thực hiện theo phương pháp pha loãng trong ống nghiệm: Mẫu thử, mẫu đối chiếu penicillin G được pha thành nhiều nồng độ khác nhau như ống nghiệm thứ nhất pha loãng 2 lần, ống nghiệm thứ hai pha loãng 4 lần, ống nghiệm thứ ba pha loãng 8 lần... Cho 200 µl vi khuẩn vào các ống nghiệm chứa sẵn 4 ml mẫu thử. Quan sát độ đục các ống sau 24 giờ. Giá trị MIC được xác định là nồng độ thấp nhất có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn [9].

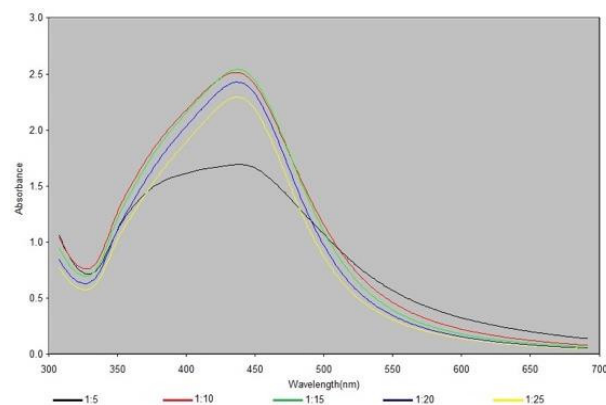
## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1 Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch chiết/bạc nitrat

Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch chiết/bạc nitrat được khảo sát với tỷ lệ thể tích 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25. Nhiệt độ, thời gian phản ứng và vận tốc khuấy cố định lần lượt là: 50 °C; 30 phút; 400 vòng/phút. Các mẫu sau quá trình tổng hợp cho kết quả phân tích UV-Vis như trên hình 2. Kết quả cho thấy: tất cả các mẫu đều cho đỉnh hấp thụ cực đại trong khoảng bước sóng từ 437 đến 438 nm. Đây là kết quả của hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt xảy ra với các hạt nano bạc [10, 11], điều này chứng tỏ nano bạc đã được hình thành sau phản ứng khử muối AgNO<sub>3</sub> như trên hình 1.

Kết quả UV-Vis cũng cho thấy, vị trí các đỉnh hấp thụ cũng không có sự thay đổi đáng kể. Tuy nhiên, cường độ đỉnh hấp thụ có sự khác biệt khá rõ. Cụ thể, với tỷ lệ dịch chiết 1:5, cường độ đỉnh hấp thụ là thấp nhất tương ứng với giá trị A<sub>max</sub>

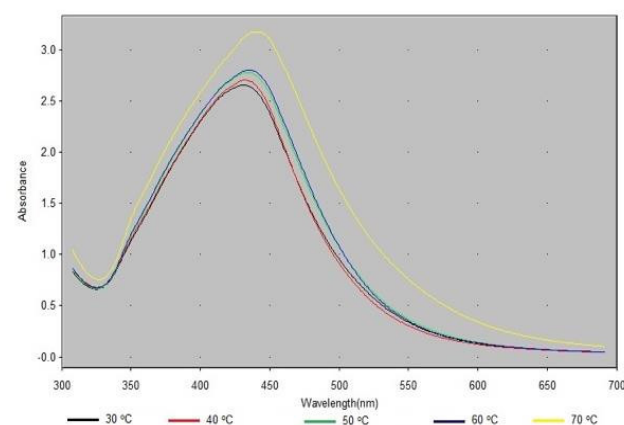
= 1,65. Cường độ đỉnh hấp thụ của dung dịch keo nano bạc được tổng hợp từ các tỷ lệ còn lại có giá trị ổn định ít thay đổi từ 2,293 đến 2,542. Kết quả này có thể được giải thích như sau: với tỷ lệ 1:5 hàm lượng bạc nitrat là thấp, do vậy cùng thời gian phản ứng thì nồng độ các hạt nano bạc được tạo ra chưa nhiều (phản ứng chưa kết thúc). Khi tỷ lệ dịch chiết/bạc nitrat tăng đến 1:10 thì nồng độ bạc nitrat đủ lớn làm phản ứng oxy hóa - khử diễn ra triệt để, lượng nano bạc tạo ra nhiều (phản ứng kết thúc). Kết quả này cho phép chọn tỷ lệ dịch chiết/bạc nitrat là 1:10 cho các khảo sát tiếp theo.



Hình 2. Phổ UV-Vis của mẫu khảo sát ở các tỷ lệ khác nhau

### 3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên quá trình hình thành hạt nano bạc được tiến hành ở các nhiệt độ khác nhau: 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C và 70 °C. Các điều kiện phản ứng không thay đổi gồm: tốc độ khuấy là 400 vòng/phút, thời gian phản ứng 30 phút, tỷ lệ hỗn hợp dịch chiết/AgNO<sub>3</sub> là 1:10. Kết quả phân tích UV-Vis như trên hình 3.

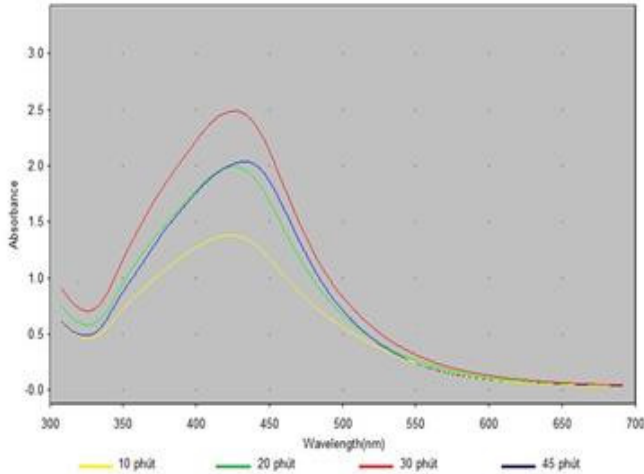


Hình 3. Phổ UV-Vis của mẫu khảo sát theo nhiệt độ tổng hợp

Kết quả phân tích UV-Vis cho thấy có sự thay đổi khá rõ vị trí các đỉnh hấp thụ cực đại khi tăng nhiệt độ với giá trị tương ứng lần lượt là: 30 °C (431 nm); 40 °C (432 nm); 50 °C (435 nm); 60 °C (437 nm) và 70 °C (449 nm). Kết quả này cho phép dự đoán kích thước các hạt nano bạc có sự gia tăng theo nhiệt độ tổng hợp và có thể được giải thích như sau: với tỷ lệ dịch chiết/AgNO<sub>3</sub> là 1:10 thì phản ứng tổng hợp nano bạc đều xảy ra trong khoảng nhiệt độ từ 30 đến 70 °C. Khi càng tăng nhiệt độ, vận tốc phản ứng càng diễn ra nhanh, nồng độ các hạt nano bạc hình thành càng nhiều trong cùng một khoảng thời gian phản ứng. Điều này tăng xác suất quá trình các hạt nano bạc va chạm và kết tụ để hình thành các hạt lớn hơn. Kết quả này cho thấy 30 °C là nhiệt độ tốt nhất để tổng hợp nano bạc kích thước nhỏ nhất.

### 3.3 Ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến quá trình tổng hợp nano bạc được khảo sát với các khoảng thời gian thay đổi từ 10, 20, 30 và 45 phút. Các thông số còn lại được cố định gồm: tỉ lệ dịch chiết/ $\text{AgNO}_3 = 1:10$ , nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ , tốc độ khuấy 400 vòng/phút. Các mẫu tổng hợp cho kết quả phân tích UV-Vis trên Hình 4.

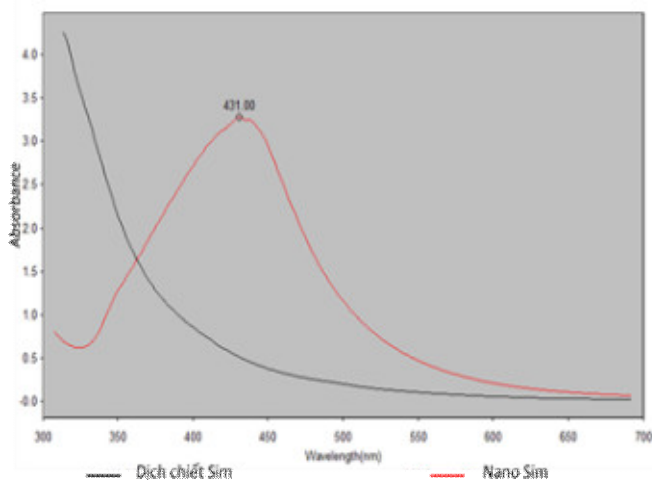


Hình 4. Phổ UV-Vis của mẫu theo thời gian tổng hợp

Kết quả UV-Vis cho thấy, khi tăng thời gian phản ứng từ 10 đến 30 phút thì vị trí các đỉnh hấp thụ cực đại không có sự thay đổi với vị trí khoảng 435 nm. Tuy nhiên có sự thay đổi rõ về cường độ đỉnh hấp thụ. Điều này chứng tỏ ở thời gian 10 và 20 phút phản ứng chưa diễn ra hoàn toàn và phản ứng tiếp tục diễn ra đến 30 phút và kết thúc ở thời gian này. Khi tăng thời gian đến 45 phút thì cường độ đỉnh hấp thụ lại giảm và vị trí đỉnh hấp thụ lại dịch chuyển về phía bước sóng lớn hơn với giá trị là 440 nm. Kết quả này có thể giải thích là khi thời gian phản ứng kéo dài quá lâu sau khi phản ứng khử  $\text{AgNO}_3$  đã kết thúc sẽ làm cho các hạt nano bạc kết tụ lại để hình thành các hạt lớn hơn.

Từ những kết quả khảo sát trên, đề tài chọn điều kiện tối ưu để tổng hợp nano bạc là: tỉ lệ dịch chiết/ $\text{AgNO}_3 = 1:10$ ; nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ ; thời gian 30 phút; tốc độ khuấy 400 vòng/phút.

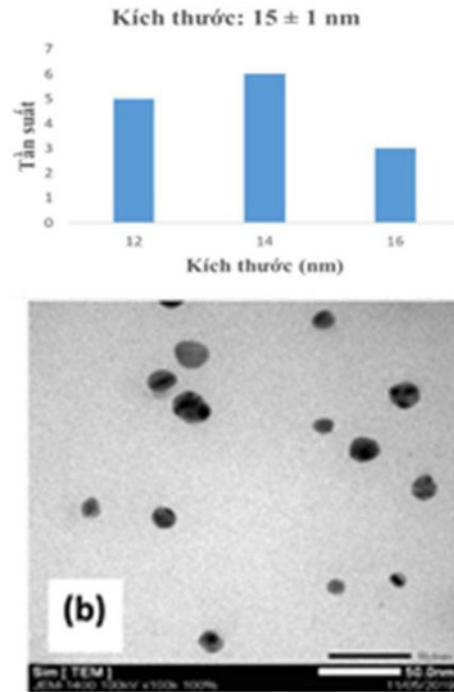
### 3.4 Kết quả phân tích cấu trúc



Hình 5. Phổ UV-Vis của mẫu nano tổng hợp từ thông số tối ưu

Kết quả phân tích UV-Vis (Hình 5) cho thấy dịch chiết không có đỉnh hấp thụ trong khoảng hấp thụ của nano bạc. Hạt nano bạc tạo thành có nồng độ khoảng 980 mg/l, có đỉnh hấp thụ 431 nm.

Kết quả trên ảnh TEM (Hình 6) ở cả 2 thang đo đều cho thấy, các hạt nano bạc có sự phân bố đồng đều, ở dạng tựa cầu trong phạm vi kích thước từ 12 đến 16 nm, đa số có kích thước  $15 \pm 1$  nm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu trước đó của Supakit và cộng sự [12].



Hình 6. Ảnh TEM và biểu đồ sự phân bố kích thước hạt nano bạc ở thước đo 50 nm

### 3.5 Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn

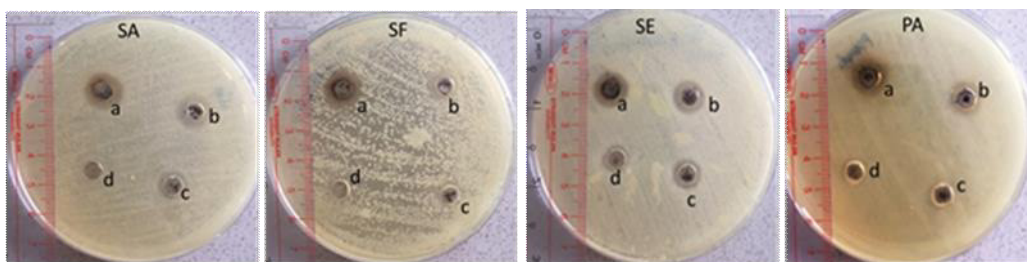
Mẫu phân tích ảnh TEM trên Hình 5 được tiến hành thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và cho kết quả như trên hình 6. Kết quả thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn được tạo ra trên đĩa petri có chứa thạch dưỡng chất đồng thời với nano bạc và vi khuẩn sau khi được ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong vòng 24 giờ. Các mẫu nano bạc đều cho thấy khả năng kháng bốn loại vi khuẩn hiệu quả. Trong đó, ở mẫu có nồng độ bạc 490 mg/l có đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất với các vi khuẩn *S. aureus* (13 mm), *S. epidermidis* (11 mm), *S. faecalis* (11 mm) và đặc biệt kháng được *P. aeruginosa* (12 mm). Càng giảm nồng độ nano bạc thì đường kính vòng kháng khuẩn giảm dần.

### 3.6 Kết quả xác định MIC

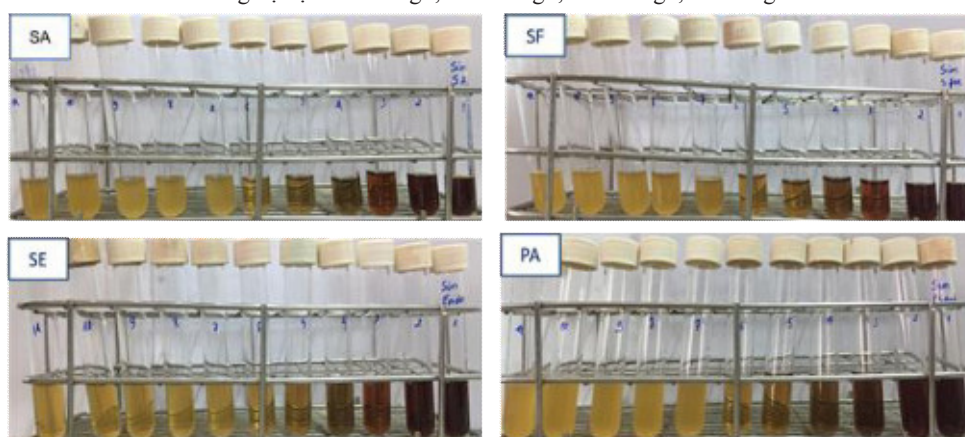
Bằng phương pháp xác định MIC trong môi trường lỏng, nồng độ ức chế tối thiểu MIC đều là 15 mg/l cho tất cả các chủng vi khuẩn thử nghiệm tương đương với chất đối chiếu penicillin G có nồng độ ức chế tối thiểu MIC tương ứng với các chủng vi khuẩn lần lượt là *S. aureus* 0,14 mg/l, *S. epidermidis* 0,14 mg/l, *S. faecalis* 0,299 mg/l, *P. aeruginosa* 30.000 mg/l.

Năm 2017, tác giả Supakit Paosen đã thực hiện xác định giá trị MIC của mẫu dung dịch nano bạc tổng hợp từ dịch chiết lá Sim, kết quả MIC là 7,8-125 mg/l tương đương với kết quả của đề tài [12].





**Hình 6.** Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của mẫu nano bạc  
SA: *S. aureus*, SF: *S. faecalis*, SE: *S. epidermidis*, PA: *P. aeruginosa*  
Nồng độ bạc a: 490 mg/l, b: 245 mg/l, c: 120 mg/l, d: 60 mg/l



**Hình 7.** Kết quả khảo sát MIC của mẫu nano bạc  
SA: *S. aureus*, SF: *S. faecalis*, SE: *S. epidermidis*, PA: *P. aeruginosa*

#### 4. KẾT LUẬN

Nano bạc đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp hóa học xanh với việc sử dụng polyphenol được chiết suất từ dịch chiết lá Sim với vai trò vừa là chất khử và chất bảo vệ. Hạt nano bạc tạo thành được xác định tính chất quang học bằng phân tích UV-Vis cho đỉnh hấp thu trong khoảng bước sóng 431 nm. Nano bạc tạo thành ở dạng tựa cầu được phân bố đồng đều với kích thước  $15 \pm 1$  nm. Hạt nano có tác dụng kháng khuẩn với các chủng *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. faecalis*, *P. aeruginosa*.

#### 5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Caio H. N. Barros et al. Biogenic nanosilver against multidrug-resistant Bacteria (MDRB). *Antibiotics*, **2018**, 7, 69-93.
- [2] Mujeeb Khan et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized using *Pulicaria glutinosa* plant extract as a green bioreductant. *Int J Nanomedicine*, **2014**, 9, 3551-3565.
- [3] Shahid Ullah Khan et al. Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int J Nanomedicine*, **2018**, 13, 733-762.
- [4] Samiran Mondal et al. A brief introduction to the development of biogenic synthesis of metal nanoparticles. *Journal of Nano Research*, **2014**, 27, 41-52.
- [5] Hazrulrizawati Abd Hamid, Senait Sileshi Zeyohannes Roziasyahira Mutazah, Mashitah M Yusoff. *Rhodomyrtos tomentosa*: a phytochemical and pharmacological review. *Asian J Pharm Clin Res*, **2017**, 10 (1), 10-16.
- [6] Elisabete C. B. A. Alegria et al. Effect of Phenolic Compounds on the Synthesis of Gold Nanoparticles and Its Catalytic Activity in the Reduction of Nitro Compounds. *Nanomaterials*, **2018**, 8 (5), 320.
- [7] Ramezan Ali Ataei et al. Determination of vancomycin minimum inhibitory concentration for ceftazidime resistant *Streptococcus pneumoniae* in Iran. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **2014**, 13 (1), 45-53.
- [8] T.G. Gini, G. Jeya Jothi. In vitro screening of antibacterial and antifungal activity of *Marsilea quadrifolia* (Marsileaceae) Linn. Extract. *Am J Phytomed Clin Ther*, **2015**, 3 (4), 313-329
- [9] Ghodsieh Bagherzade. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2017**, 7 (3), 227-233.
- [10] Seema Garg, Amrisha Chandra, Avijit Mazumder, Rupa Mazumder. Green synthesis of silver nanoparticles using *Arnebia nobilis* root extract and wound healing potential of its hydrogel. *Asian Journal of Pharmaceutics*, **2014**, 95-101.
- [11] Thanh Son Cu, Van Du Cao, Cuu Khoa Nguyen, Ngoc Quyen Tran. Preparation of silver core-chitosan shell nanoparticles using catechol-functionalized chitosan and antibacterial studies. *Macromolecular Research*, **2014**, 22 (4), 418-423.
- [12] Supakit Paosen, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using plants from Myrtaceae family and characterization of their antibacterial activity. *Materials Letters*, **2017**, 209, 201-206.