

Tối ưu hóa điều kiện tách chiết saponin steroid từ lá cây *Costus pictus* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt và khảo sát kháng khuẩn của cao chiết thu được trong điều kiện tối ưu hóa

Nguyễn Đào Thanh Hương^{1*}, Hồ Thị Nguyệt¹, Trương Minh Ngọc¹,
Lê Thanh Bình¹, Đỗ Thị Mai Trinh¹, Bùi Dương Xuân An²

¹Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP Hồ Chí Minh, 366A Trường Chinh, phường 13, quận Tân Bình, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Công Thương TP Hồ Chí Minh, 140 Lê Trọng Tấn, phường Tân Thạnh, quận Tân Phú, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/7/2023; ngày chuyển phản biện 5/7/2023; ngày nhận phản biện 21/7/2023; ngày chấp nhận đăng 25/7/2023

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu là tối ưu hóa quá trình chiết xuất saponin steroid từ lá cây *Costus pictus* và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá *C. pictus* thu được. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn lẻ chính là nồng độ ethanol, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian chiết được khảo sát bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) để đưa ra điều kiện chiết tối ưu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các điều kiện tối ưu để chiết tách saponin steroid như sau: nồng độ dung môi ethanol 79%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/31 g/ml và thời gian chiết (60 giờ) cho kết quả đạt 7,62% saponin steroid. Cao chiết lá *C. pictus* sau khi tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cho thấy có hiệu quả ức chế cả 4 dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Vibrio* sp., *E. coli* và *Salmonella* sp. được khảo sát. Trong đó, hiệu lực ức chế *Vibrio* sp. cao nhất và hiệu lực ức chế *Salmonella* sp. thấp nhất.

Từ khóa: *Costus pictus*, kháng khuẩn, phương pháp đáp ứng bề mặt, saponin steroid.

Chỉ số phân loại: 2.4

1. Mở đầu

C. pictus là cây thuộc họ *Costaceae* có nguồn gốc từ Nam Mỹ, sau đó phát triển mạnh tại châu Á (Ấn Độ, Trung Quốc, Malaysia...) như loài cây cảnh. *C. pictus* đã được sử dụng trong nhiều bài thuốc cổ truyền của Ấn Độ và một số nước Đông Nam Á để điều trị đau khớp, viêm phổi, thấp khớp, tiêu chảy, đau đầu, nôn mửa [1]. Cây *C. pictus* có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như flavonoid, polyphenol, saponins, terpenoid, tannin, tinh dầu và các nguyên tố vi lượng (K, Ca, Cr, Mn, Cu và Zn) [2-4]. *C. pictus* có nhiều tác dụng y học như kháng nấm, kháng vi khuẩn, virus [5, 6], kháng oxy hóa [7], chống viêm [8], làm thuốc chống ung thư [9], trị bệnh tiểu đường [10, 11].

Saponin là một nhóm hợp chất đa dạng được đặc trưng bởi cấu trúc của chúng có chứa aglycone steroid hoặc triterpenoid và được gắn với một hoặc nhiều chuỗi đường [12], đặc trưng bởi tính chất hoạt động bề mặt vì có thể hòa tan trong nước tạo thành dung dịch tạo bọt. Saponin thường được nhóm thành hai loại chính: saponin steroid tồn tại chủ yếu trong cây một lá mầm và saponin triterpenoid có trong cây hai lá mầm [13]. Theo một số nghiên cứu cho thấy, chi *Costus* sp. được coi là một nguồn nguyên liệu mới có tiềm năng khai thác saponin, đặc biệt là saponin steroid [4, 10].

Trong quá trình ly trích hàm lượng saponin steroid bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau như nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian chiết cũng như sự tương tác giữa các yếu tố với nhau. Mặc dù, đã có nhiều nghiên cứu về thành phần hoạt chất và tác dụng sinh học của cây *C. pictus* nhưng vẫn chưa có nhiều bài báo nghiên cứu và điều kiện chiết

saponin steroid cũng như tối ưu quy trình chiết saponin steroid trên loài cây này. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa điều kiện chiết xuất saponin steroid bằng phương pháp RSM và khảo sát một số hoạt tính sinh học của cao chiết lá *C. pictus*. Nghiên cứu này góp phần cơ sở khoa học cho các nghiên cứu chiết xuất saponin steroid và khảo sát một số hoạt tính của cao chiết giàu saponin từ lá cây *C. pictus* và định hướng khai thác nguồn dược liệu một cách hiệu quả.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Lá trưởng thành 1 năm tuổi của cây *C. pictus* được thu hái, rửa sạch dưới nước máy, thái nhỏ, phơi khô trong bóng râm 7 ngày. Lá khô được xay nhuyễn bằng máy xay được liệu YB-600 (Trung Quốc). Sau đó, bột được lọc qua rây lọc có kích thước lỗ 1 mm để đạt được kích thước đồng nhất.

Hóa chất thí nghiệm: Ethanol ($\geq 99,8\%$, tỷ trọng: 0,79 g/cm³ (20°C), Merck); Diosgenin (Sigma-Aldrich, 95%); p-Anisaldehyde ($>99\%$, Merck); ethyl acetate (99,9%, Merck), H₂SO₄ (98%, Merck).

Các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Vibrio* sp., *E. coli* và *Salmonella* sp. được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Vi sinh của Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Cân 500 g bột lá ngâm trong 5.000 ml n-hexan, lắc và để qua đêm để loại béo, sau đó loại n-hexan, bột lá được thu lại và sấy khô để làm nguyên liệu trong các thí nghiệm khảo sát đơn yếu tố.

*Tác giả liên hệ: Email: ngdthanhuong2312@gmail.com

Optimising steroid saponins extraction from *Costus pictus* leaves using response surface methodology and investigating antibacterial properties of extracts obtained under optimised conditions

Dao Thanh Huong Nguyen^{1*}, Thi Nguyet Ho¹,
Minh Ngoc Truong¹, Thanh Binh Le¹,
Thi Mai Trinh Do¹, Duong Xuan An Bui²

¹National Center for Technological Progress, Ho Chi Minh City Branch,
366A Truong Chinh Street, Ward 13, Tan Binh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City University of Industry and Trade,
140 Le Trong Tan Street, Tan Thanh Ward, Tan Phu District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 3 July 2023; revised 21 July 2023; accepted 25 July 2023

Abstract:

The aim of the study was to optimise the extraction of steroid saponins from *Costus pictus* leaves and investigate the antibacterial activity of the obtained *C. pictus* leaf extract. The influence of major single factors, including ethanol concentration, ratio of raw materials to solvent, and extraction time, were investigated, and the use of the response surface methodology provided optimal extraction conditions. The results of the study showed that the optimal conditions for steroid saponins extraction were as follows: ethanol solvent concentration (79%), material/solvent ratio (1/31 g/ml), and extraction time (60 hours), resulting in 7.62% steroid saponin content. The *C. pictus* leaf extract obtained under these optimised conditions exhibited effective inhibition against all four bacterial strains: *Bacillus subtilis*, *Vibrio* sp., *E. coli*, and *Salmonella* sp.. Among them, the inhibitory effect on *Vibrio* sp. was the highest, while the inhibitory effect on *Salmonella* sp. was the lowest.

Keywords: antibacterial effect, *Costus pictus*, response surface methodology, steroid saponins.

Classification number: 2.4

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng saponin steroid thu được: Cân 10 g bột lá đã loại béo và ngâm với ethanol có nồng độ 50, 60, 70, 80 và 90% với tỷ lệ 1/10 g/ml trên máy lắc với tốc độ 90 vòng/phút. Sau 24 giờ ngâm chiết, dịch chiết được lọc qua bông thấm và giấy lọc whatman 01 nhằm loại cặn và thu dịch lọc. Hàm lượng saponin steroid (%) được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 430 nm, tương tự với phương pháp dựng đường chuẩn diosgenin.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu với dung môi đến hàm lượng saponin steroid thu được: Cân 10 g bột lá đã loại béo và tiến hành ngâm trong ethanol với nồng độ được xác định trong thí nghiệm khảo sát nồng độ dung môi với các tỷ lệ 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 và 1:60 g/ml trong thời gian 24 giờ (có lắc

với tốc độ 90 vòng/phút). Sau đó dịch chiết được lọc và tiến hành đo hàm lượng saponin steroid tương tự như thí nghiệm khảo sát dung môi.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng yếu tố thời gian ngâm chiết đến hàm lượng saponin steroid thu được: Cân 10 g bột lá cho tiến hành ngâm trong ethanol với nồng độ và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được xác định từ hai thí nghiệm trên, ngâm trong thời gian 24, 48, 72 và 96 giờ. Hỗn hợp dung dịch được lọc và đo hàm lượng saponin steroid có trong mẫu tương tự như các thí nghiệm trên.

2.2.4. Thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết: Dựa trên kết quả của các thí nghiệm đơn yếu tố, phương pháp RSM được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện chiết saponin steroid từ bột lá *C. pictus* với 3 thông số quan trọng được lựa chọn là nồng độ dung môi (70-90%), tỷ lệ nguyên liệu với dung môi (1:20-1:40 g/ml) và thời gian ngâm chiết (24-72 giờ). Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp CCD (Central composite design) gồm 20 thí nghiệm và ma trận thí nghiệm được xây dựng bằng phần mềm Minitab 18.0. Mỗi yếu tố có 3 mức độ thay đổi theo bảng 1.

Bảng 1. Bảng mã hóa các biến độc lập.

Yếu tố khảo sát	Ký hiệu	Các mức mã hóa		
		-1	0	1
Nồng độ EtOH (%)	X ₁	70	80	90
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	X ₂	1:20	1:30	1:40
Thời gian ngâm chiết (giờ)	X ₃	24	48	72

2.2.5. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của cao chiết lá *C. pictus* sau khi tối ưu hóa điều kiện chiết xuất: Khả năng kháng khuẩn của các cao chiết lá *C. pictus* được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa được thực hiện theo mô tả của J. Oonmetta-Aree và cs (2006) [14] có điều chỉnh. Trên mỗi đĩa thạch chứa môi trường LB được trải đều 100 µl dịch vi khuẩn (10⁶ CFU/ml). Sau đó, mỗi đĩa thạch được đục giếng có đường kính 7 mm và nhỏ 100 µl cao chiết ở các nồng độ 17,5, 35, 70 và 140 mg/ml vào mỗi giếng, dung dịch DMSO 10% được sử dụng làm đối chứng. Đường kính vòng vô khuẩn được đo bằng thước đo đơn vị mm sau 24 giờ ủ mẫu ở 32°C.

2.2.6. Xác định hàm lượng saponin steroid trong mẫu: Phương pháp xác định hàm lượng saponin steroid được thực hiện theo R. Singh và cs (2015) [15], J.C. Baccou và cs (1977) [16] có điều chỉnh. Nguyên lý của phương pháp đo saponin steroid dựa trên phản ứng của saponin steroid với anisaldehyde và ethyl acetate trong môi trường acid để tạo phức chất có màu, độ hấp thụ của phức chất được đo ở bước sóng λ=430 nm. Phần trăm hàm lượng saponin steroid (%) được xác định dựa trên đường chuẩn diosgenin đã biết. Phương pháp dựng đường chuẩn diosgenin như sau: hút 1 ml dung dịch diosgenin được pha trong ethyl acetate (nồng độ 10, 20, 30, 40 và 50 µg/ml) vào ống nghiệm, sau đó thêm 1 ml dung dịch A (0,5 ml anisaldehyde pha trong 99,5 ml ethyl acetate) và 1 ml dung dịch B (hỗn hợp 50 ml H₂SO₄ và 50 ml ethyl acetate). Hỗn hợp dung dịch được đun cách thủy trong nước 60°C trong 20 phút, sau đó làm lạnh trong bể nước ở nhiệt độ phòng 15 phút. Hỗn hợp được đo mật độ quang bằng máy đo quang phổ Genesys 50 -

Thermo USA ở bước sóng $\lambda=430$ nm, ethyl acetate được sử dụng làm mẫu đối chứng. Đường chuẩn diosgenin được biểu diễn dưới dạng: $Y = 0,0067x + 0,0568$, với $R^2=0,9966$. Phần trăm hàm lượng saponin steroid (%) trong dịch chiết lá *C. pictus* được đo tương tự và saponin steroid trong mẫu thí nghiệm được biểu thị bằng % saponin steroid (mg diosgenin đương lượng/khối lượng khô) và được tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng saponin steroid (\%)} = \frac{C \times n \times V}{m \times 1000 \times (100 - h)} \times 100\%$$

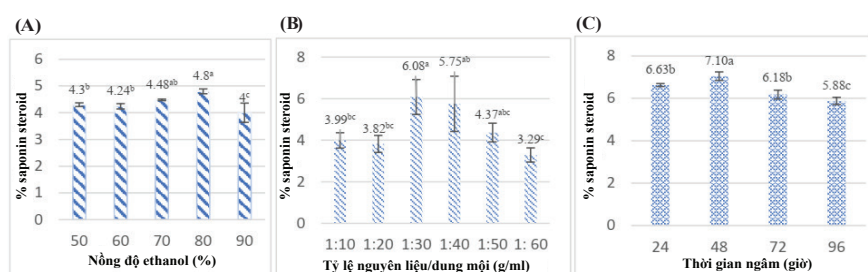
trong đó: C là nồng độ saponin steroid theo đường chuẩn diosgenin ($\mu\text{g/ml}$); n là hệ số pha loãng; V là thể tích dịch chiết; m là khối lượng mẫu ngâm; h là độ ẩm mẫu.

2.2.7. Xử lý dữ liệu: Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, kết quả được biểu diễn dưới dạng mean $\pm$ SD. Các số liệu liên quan đến định lượng hoạt chất trong dịch chiết được xử lý phân tích hồi quy, đưa ra hệ số tương quan bằng cách sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính. Số liệu thu nhận được xử lý và tính toán trên phần mềm Excel, phân tích số liệu ANOVA (One-way analysis of variance), so sánh thống kê số liệu và xây dựng mô hình tối ưu hóa các điều kiện ly trích saponin steroid bằng phần mềm Minitab 18.0. Kiểm định Turkey được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị với mức ý nghĩa $p<0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng saponin steroid thu nhận được

Ảnh hưởng của các yếu tố đơn được khảo sát bao gồm nồng độ ethanol, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian ngâm chiết đến hàm lượng saponin steroid thu nhận được được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn đến phần trăm hàm lượng saponin steroid thu được. (A) Ảnh hưởng của nồng độ ethanol; (B) Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi; (C) Ảnh hưởng của thời gian ngâm. ^{a, b, c}: Các ký tự khác nhau theo sau số liệu biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$.

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến phần trăm hàm lượng saponin steroid thu nhận thể hiện ở hình 1A cho thấy, nồng độ ethanol có ảnh hưởng đến hàm lượng saponin steroid thu nhận được. Cụ thể, hàm lượng saponin steroid thu được tăng dần tỷ lệ thuận với nồng độ dung môi và đạt cực đại khi chiết với dung môi EtOH 80% (tương ứng 4,8%), nhưng không có nhiều khác biệt so với các nồng độ ethanol thấp hơn và giảm mạnh khi tăng nồng độ EtOH lên 90% (tương ứng 4,0%). Điều này cho thấy, trong quá trình chiết xuất saponin steroid từ lá *C. pictus*, nồng độ dung môi trong khoảng khảo sát ảnh hưởng không mạnh đến hiệu suất thu

nhận saponin steroid. Mặt khác, nồng độ ethanol cao không thích hợp cho việc chiết xuất saponin vì có thể làm biến tính protein trong vách tế bào làm giảm hiệu quả chiết xuất. Như vậy, nồng độ ethanol 80% được chọn làm nồng độ dung môi thích hợp cho thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến phần trăm hàm lượng saponin steroid thu nhận được thể hiện ở hình 1B. Số liệu thực nghiệm cho thấy, hàm lượng saponin steroid tăng mạnh khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi tăng dần từ tỷ lệ 1/10 lên 1/30 mg/ml, tương đương với hàm lượng saponin steroid thu được tăng từ 3,99 lên 6,08%, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1/30 lên đến 1/60 mg/ml. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi có ảnh hưởng đến tốc độ hòa tan hoạt chất trong dung môi nên khi tỷ lệ này quá nhỏ thì dẫn đến hiệu quả chiết hoạt chất thấp, khi tăng thể tích dung môi dẫn đến nồng độ chất hòa tan trong dung môi giảm giúp tăng tốc độ chiết hoạt chất. Tuy nhiên, khi tỷ lệ dung môi và nguyên liệu đạt được điểm cân bằng thì hàm lượng hoạt chất trong dung môi không thể tăng thêm. Hiện tượng này đều được ghi nhận khi tách chiết các nhóm hoạt chất khác như flavonoid, polyphenol [17] và tách chiết saponin triterpenoid [18]. Do đó, tỷ lệ 1/30 g/ml là tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp cho thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả của thí nghiệm ảnh hưởng của thời gian ngâm đến hàm lượng saponin steroid được thể hiện ở hình 1C. Kết quả cho thấy, phần trăm hàm lượng saponin steroid gia tăng khi tăng thời gian ngâm dung môi từ 24 lên 48 giờ (tương đương với % hàm lượng saponin steroid thu được tăng từ 6,63 lên 7,10%). Khi tiếp tục tăng thời gian ngâm dung môi từ 48 lên 72 và 96 giờ thì hàm lượng saponin steroid bắt đầu giảm (tương đương 7,10% ở 48 giờ giảm xuống 6,18% ở mốc 72 giờ và 5,88% ở mốc 96 giờ) có khác biệt thống kê với nghiệm thức ngâm 48 giờ. Điều này có thể được lý giải là thời gian đầu chiết xuất dài giúp saponin hòa tan và khuếch tán từ trong tế bào ra môi trường, sau đó khi tăng thêm thời gian chiết xuất thì các tạp chất và các thành phần khác trong dịch chiết đạt trạng thái cân bằng, độ hòa tan thay đổi có thể dẫn các phản ứng keo tụ làm giảm lượng saponin [19].

3.2. Kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết saponin steroid từ lá cây *C. pictus*

Trên cơ sở khảo sát các yếu tố đơn ảnh hưởng đến hàm lượng saponin steroid thu nhận được bằng phương pháp ngâm chiết cho thấy, hàm lượng saponin steroid trong dịch chiết từ lá *C. pictus* chịu ảnh hưởng từ các điều kiện chiết như nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu với dung môi và thời gian chiết. Do đó, phương pháp RSM theo ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman với mô hình CCD được thiết kế với 3 biến được sử dụng nhằm tối ưu hóa điều kiện chiết xuất saponin steroid. Kết quả hàm lượng saponin steroid thu nhận được theo ma trận thực nghiệm Plackett-Burman được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Bảng ma trận thực nghiệm Plackett-Burman và hàm lượng saponin steroid thực nghiệm và dự đoán.

STT	Nồng độ dung môi EtOH (%)	Tỷ lệ nguyên liệu với dung môi (g/ml)	Thời gian ngâm (giờ)	Hàm lượng saponin steroid (%)	
	X_1	X_2	X_3	Thực nghiệm	Dự đoán
1	70	1:20	24	4,42 ^a ±0,03	4,57
2	90	1:20	24	4,86 ^a ±0,35	5,09
3	70	1:40	24	5,54 ^a ±0,22	5,61
4	90	1:40	24	6,62 ^a ±0,73	6,38
5	70	1:20	72	6,93 ^a ±0,34	7,26
6	90	1:20	72	6,70 ^a ±0,05	6,71
7	70	1:40	72	7,09 ^b ±0,10	6,96
8	90	1:40	72	6,73 ^a ±0,30	6,66
9	63	1:30	48	6,59 ^a ±0,13	6,37
10	97	1:30	48	6,46 ^a ±0,12	6,55
11	80	1:13	48	6,65 ^a ±0,01	6,26
12	80	1:47	48	6,85 ^a ±0,43	7,10
13	80	1:30	8	4,42 ^a ±0,07	4,33
14	80	1:30	88	6,87 ^a ±0,17	6,83
15	80	1:30	48	7,38 ^{abc} ±0,07	7,62
16	80	1:30	48	7,78 ^{ab} ±0,47	7,62
17	80	1:30	48	7,31 ^{abc} ±0,07	7,62
18	80	1:30	48	8,06 ^a ±0,05	7,62
19	80	1:30	48	7,37 ^{abc} ±0,05	7,62
20	80	1:30	48	7,80 ^{ab} ±0,14	7,62

a, b, c...: Các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p < 0,05$.

Kết quả bảng 2 cho thấy, dữ liệu thu được từ thực nghiệm không có sự chênh lệch nhiều so với dữ liệu dự đoán từ mô hình với R^2 hồi quy (đạt 0,9511), có 95,11% số liệu thực nghiệm tương thích với mô hình dự đoán. Hàm lượng saponin steroid thu được từ ma trận thí nghiệm có sự biến thiên, trong đó 5 thí nghiệm trung tâm (từ thí nghiệm 15 đến thí nghiệm 20) cho hiệu suất thu nhận saponin cao và ổn định. Cụ thể, hàm lượng saponin steroid thu nhận được thấp nhất trong thí nghiệm số 1 (đạt 4,42%) và cao nhất trong thí nghiệm số 18 (đạt 8,06%).

Sau khi đưa số liệu kết quả hàm lượng saponin steroid thu được từ ma trận thí nghiệm Plackett-Burman gồm 20 thí nghiệm vào phần mềm Minitab 18.0 cho thấy, hàm lượng saponin steroid thu được tuân theo quy trình hồi quy bậc 2:

$$Y = -31,90 + 0,695X_1 + 0,242X_2 + 0,2814X_3 - 0,004099X_1^2 - 0,003320X_2^2 - 0,001253X_3^2 - 0,00062X_1X_2 - 0,001101X_1X_3 - 0,001404X_2X_3$$

trong đó: Y là hàm lượng saponin steroid dự đoán thu nhận được từ lá *C. pictus*; X_1 là nồng độ dung môi ethanol; X_2 là tỷ lệ nguyên liệu với dung môi; X_3 là thời gian ngâm chiết.

Từ bảng phân tích ANOVA (bảng 3) cho thấy, chỉ số sai số mô hình đạt $0,430 > 0,05$ nên mô hình có độ phù hợp với số liệu thực nghiệm và có độ chính xác cao (p -value mô hình = 0,00).

Bảng 3. Bảng phân tích ANOVA của mô hình thực nghiệm.

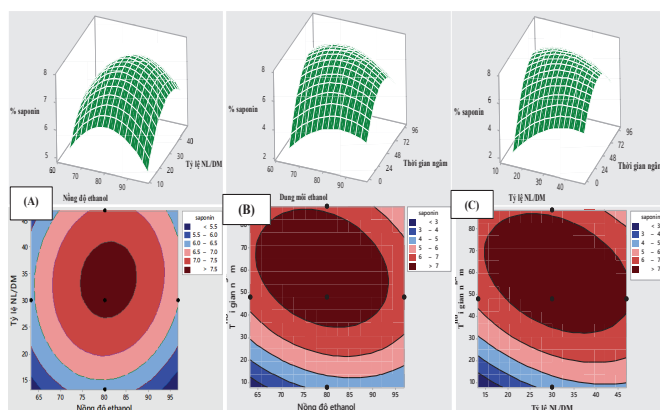
Nguồn	Hệ số tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	f-value	p-value
Mô hình	9	19,8529	2,20588	21,65	0,000
Tuyến tính	3	8,4106	2,80355	27,51	0,000
Nồng độ ethanol (X_1)	1	0,0375	0,03754	0,37	0,557
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (X_2)	1	0,8457	0,84569	8,3	0,016
Thời gian ngâm (X_3)	1	7,5274	7,52741	73,87	0,000
Bình phương	3	9,9443	3,31477	32,53	0,000
X_1^2	1	2,4215	2,42149	23,76	0,001
X_2^2	1	1,5884	1,58844	15,59	0,003
X_3^2	1	7,5041	7,50408	73,64	0,000
Tương tác 2 chiều	3	1,4979	0,49931	4,9	0,024
X_1X_2	1	0,0307	0,03068	0,3	0,595
X_1X_3	1	0,5584	0,5584	5,48	0,041
X_2X_3	1	0,9088	0,90883	8,92	0,014
Sai số	10	1,019	0,1019		
Sai số mô hình	5	0,5515	0,1103	1,18	0,430
Sai số ngẫu nhiên	5	0,4675	0,0935		
Tổng số	19	20,8719			

R-sq=95,12%
R-sq(adj)=90,72%
R-sq(pred)=76,16%

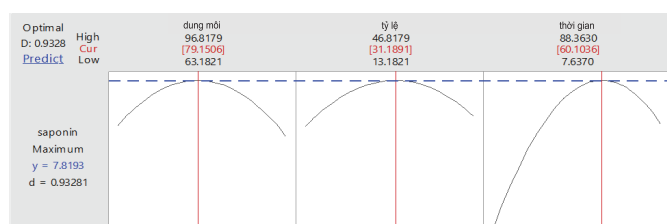
Phân tích ANOVA (bảng 3) được sử dụng để đánh giá độ tin cậy của mô hình thực nghiệm được thiết kế ở bảng 1 cho thấy mô hình có độ chính xác cao ($p=0,000$). Cụ thể, phần trăm hàm lượng saponin steroid chịu ảnh hưởng của 2 tham số bậc 1, bao gồm tỷ lệ nguyên liệu với dung môi (X_2), thời gian ngâm (X_3), 3 tham số bậc 2 là X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 và 2 tham số có tương tác hai chiều là nồng độ ethanol với thời gian ngâm (X_1X_3) và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi với thời gian ngâm chiết (X_2X_3). Ngược, lại các tham số X_1 và X_1X_2 không có ảnh hưởng đến mô hình thực nghiệm. Dựa vào kết quả phân tích cho thấy phương trình hồi quy biểu diễn phần trăm hàm lượng saponin steroid mới như sau:

$$Y = -31,90 + 0,242X_2 + 0,2814X_3 - 0,004099X_1^2 - 0,003320X_2^2 - 0,001253X_3^2 - 0,001101X_1X_3 - 0,001404X_2X_3$$

Đồ thị đồng mức và đồ thị RSM (hình 2) cho thấy, hàm lượng saponin steroid biến đổi phụ thuộc vào tỷ lệ nguyên liệu với dung môi, thời gian ngâm chiết cũng như sự tương tác của 2 yếu tố này. Cụ thể, phần trăm hàm lượng saponin steroid thu được biến thiên khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian ngâm thay đổi (hình 2A-2C), trong khi đó, hàm lượng saponin steroid (%) không có sự thay đổi rõ ràng khi thay đổi nồng độ ethanol (hình 2A và 2B), điều này phù hợp với phương trình hồi quy của mô hình thí nghiệm.



Hình 2. Đồ thị biểu thị sự tương quan giữa các yếu tố khác nhau lên hàm lượng saponin steroid thu nhận được. Phần trăm hàm lượng saponin steroid thu được biến thiên khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian ngâm thay đổi (A, B, C), trong khi đó hàm lượng saponin steroid (%) không có sự thay đổi rõ ràng khi thay đổi nồng độ ethanol (A, B).



Hình 3. Đồ thị biểu diễn điểm tối ưu của điều kiện chiết xuất saponin steroid từ lá *C. pictus*.

Từ các kết quả trên và đồ thị biểu diễn điểm tối ưu của điều kiện chiết xuất saponin steroid (hình 3) chúng tôi đưa ra điều kiện chiết xuất saponin steroid tối ưu (bảng 4) như sau.

Bảng 4. Bảng biểu diễn hàm lượng saponin trong điều kiện tối ưu hóa chiết xuất.

Điều kiện chiết xuất tối ưu			Saponin steroid (%)	
Nồng độ ethanol (%)	Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	Thời gian ngâm (giờ)	Thực nghiệm	Dự kiến
79	1/31	60	7,62±0,31	7,82

3.3. Kết quả kháng khuẩn của cao chiết *C. pictus* đã tối ưu hóa

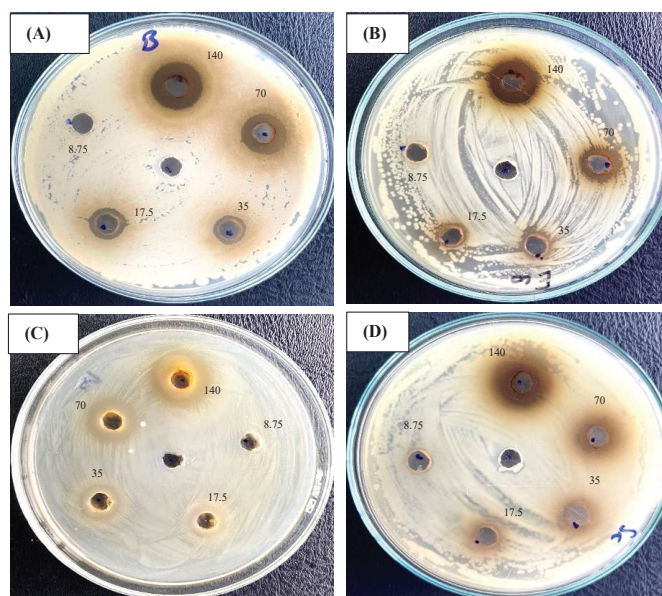
Khả năng kháng khuẩn của cao chiết lá *C. pictus* được xác định dựa trên khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn được tạo ra trên đĩa petri được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết *C. pictus*.

Nồng độ cao chiết (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>Vibrio</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
8,75	-	-	-	-
17,5	2,33±0,57	4,33±0,58	1,33±1,15	-
35	4,33±1,15	4,67±1,16	1,67±0,57	-
70	5,67±0,57	8,00±0,00	4,67±0,57	4,33±0,58
140	8,33±1,16	10,33±0,58	7,33±0,58	5,67±0,57

a, b, c: các ký tự khác nhau theo sau các số trung bình thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Từ bảng kết quả đường kính kháng khuẩn (bảng 5) cho thấy, cao chiết lá *C. pictus* có khả năng ức chế sự phát triển của *B. subtilis*, *Vibrio* sp., *E. coli* và *Salmonella* sp.. Nồng độ cao chiết có khả năng kháng khuẩn từ 17,5 mg/ml với đường kính kháng khuẩn tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết. Khả năng ức chế vi khuẩn của cao *C. pictus* mạnh nhất thể hiện trên chủng *Vibrio* sp. và yếu nhất trên chủng *Salmonella* sp. (bảng 5, hình 4). Cụ thể, nồng độ cao chiết nhỏ nhất có thể ức chế vi khuẩn là 17,5 mg/ml khi thử nghiệm với *B. subtilis*, *E. coli* và *Vibrio* sp., đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 1,33 đến 4,33 mm, trong đó chủng vi khuẩn bị ức chế tại nồng độ này cao nhất là *Vibrio* sp., với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 4,33 mm. Đối với chủng *Salmonella* sp., ở nồng độ 17,5 mg/ml vẫn chưa có khả năng ức chế. Đường kính vòng kháng khuẩn tăng dần khi tăng nồng độ cao chiết *C. pictus* từ 17,5 đến 140 mg/ml, cả 4 chủng thí nghiệm đều bị ức chế mạnh nhất ở nồng độ cao chiết 140 mg/ml với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 5,67 đến 10,33 mm (bảng 5).



Hình 4. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết *C. pictus* với các chủng vi khuẩn khác nhau. (A) *B. subtilis*; (B) *E. coli*; (C) *Vibrio* sp.; (D) *Salmonella* sp..

Từ thí nghiệm kháng khuẩn cho thấy, cao chiết *C. pictus* có khả năng kháng cả 2 loại vi khuẩn gram dương và gram âm, kết quả này có sự tương đồng với nghiên cứu của R. Ramya và cs (2015) [20], nhưng khả năng kháng khuẩn trong thí nghiệm của chúng tôi có hiệu quả yếu hơn của nhóm tác giả này. Từ những thí nghiệm định tính và các khảo sát trước trong nghiên cứu của N.D.T. Huang và cs (2022) [17] cho thấy, cao chiết ethanol lá *C. pictus* có chứa nhiều nhóm hoạt tính sinh học như flavonoid, polyphenol, saponin, glycoside và tannin. Các thành phần hóa học thực vật như tanin, flavonoid, alkaloid và một số hợp chất thơm khác là các chất chuyển hóa thứ cấp đóng vai trò là cơ chế bảo vệ thực vật chống lại nhiều vi sinh vật. Trong đó, flavonoid là chất chống oxy hóa hòa tan trong nước mạnh giúp ngăn ngừa tổn thương tế bào oxy hóa và có hoạt tính chống ung thư, hoạt động chống viêm [21]. Một

số nghiên cứu khác cho thấy, saponin và polyphenol có nhiều tác dụng như kháng viêm, kháng khuẩn, kháng virus, kháng nấm [19, 22, 23]. Do đó, khả năng kháng khuẩn và kháng oxy hóa của cao chiết lá *C. pictus* là kết quả của sự tác động của các nhóm hoạt chất sinh học chứa trong cao chiết.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, điều kiện tối ưu cho quá trình tách chiết saponin steroid từ lá cây *C. pictus* với nồng độ ethanol 79%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/31 g/ml và thời gian tách chiết là 60 giờ với hàm lượng saponin steroid đạt cao nhất là 7,62%.

Sau khi thực hiện tối ưu hóa quy trình tách chiết saponin steroid trong lá *C. pictus* cho thấy cao chiết thu được từ quá trình tối ưu hóa có hoạt tính sinh học. Cao chiết lá *C. pictus* có khả năng kháng khuẩn đối với cả 4 chủng vi khuẩn được khảo sát bao gồm *B. subtilis*, *E. coli*, *Vibrio* sp. và *Salmonella* sp., trong đó hiệu quả kháng khuẩn của cao chiết đạt cao nhất ở nồng độ 140 mg/ml ở cả 4 chủng và hiệu quả ức chế mạnh nhất thể hiện ở chủng *Vibrio* sp. (tương đương 10,33 mm) và yếu nhất ở chủng *Salmonella* sp. (tương đương 5,67 mm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Selvakumarasamy, B. Rengaraju, S.A. Arumugam, et al. (2021), “*Costus pictus*-transition from a medicinal plant to functional food: A review”, *Futur. Foods*, **4**(7), DOI: 10.1016/j.fufo.2021.100068.
- [2] A. Aruna, R. Nandhini, V. Karthikeyan, et al. (2014), “Insulin plant (*Costus pictus*) leaves: Pharmacognostical standardization and phytochemical evaluation”, *Am. J. Pharm. Heal. Res.*, **2**(8), pp.106-119.
- [3] G.M.R. Devi (2019), “A comprehensive review on *Costus pictus* D. Don”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **10**(7), pp.3187-3195, DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(7).3187-95.
- [4] V. Manimozhi (2019), “Phytochemical investigation of the medicinal plant *Costus pictus* D. Don”, *J. Emerg. Technol. Innov. Res.*, **6**(6), pp.49-59.
- [5] O. Guclu-Ustundag, G. Mazza (2007), “Saponins: Properties, applications and processing”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **47**(30), pp.231-258, DOI: 10.1080/10408390600698197.
- [6] J. Raj, R. Kalaivani (2016), “Comparative *invitro* evaluation of anthelmintic property of leaves and rhizome of *Costus pictus* D. Don against albendazole”, *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol.*, **6**(5), pp.438-441, DOI: 10.5455/njppp.2016.6.0205423032016.
- [7] M. Majumdar, P. Parihar (2012), “Antibacterial, anti-oxidant and antiproliferative effect of *Costus pictus* from southern region, India”, *Asian J. Plant Sci. Res.*, **2**(2), pp.95-101.
- [8] S. Ashwini, Z. Bobby, M. Joseph, et al. (2015), “Insulin plant (*Costus pictus*) extract improves insulin sensitivity and ameliorates atherogenic dyslipidaemia in fructose induced insulin resistant rats: Molecular mechanism”, *J. Funct. Foods*, **17**, pp.749-760, DOI: 10.1016/j.jff.2015.06.024.
- [9] V. Prejeena, S.N. Suresh, V. Varsha (2017), “Phytochemical screening, antioxidant analysis and antiproliferative effect of *Costus pictus* D. Don leaf extracts”, *International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research*, **4**(3), pp.2373-2378.
- [10] G.V. Srinivasan, K.K. Vijayan, P. Sharanappa, et al. (2016), “Identification of chemical compounds in the essential oil from *Costus pictus* D. Don plant parts antimicrobial studies isolation and quantification of diosgenin from its root”, *J. Chem. Pharm. Res.*, **8**(7), pp.594-604.
- [11] M.A. Jayasri, S. Gunasekaran, A. Radha, et al. (2008), “Anti-diabetic effect of *Costus pictus* leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats”, *International Journal of Diabetes and Metabolism*, **16**(3), pp.117-122.
- [12] J. Navarro del Hierro, G. Reglero, D. Martin (2020), “Chemical characterization and bioaccessibility of bioactive compounds from saponin-rich extracts and their acid-hydrolysates obtained from fenugreek and quinoa”, *Foods*, **9**(9), DOI: 10.3390/foods9091159.
- [13] M. Abdelrahman, S. Jogaiah (2020), *Bioactive Molecules in Plant Defense*, Springer International Publishing, DOI: 10.1007/978-3-030-61149-1.
- [14] J. Oonmetta-Aree, T. Suzuki, P. Gasaluck, et al. (2006), “Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on staphylococcus aureus”, *LWT - Food Sci. Technol.*, **39**(10), pp.1214-1220, DOI: 10.1016/j.lwt.2005.06.015.
- [15] R. Singh, V.D. Mendhulkar (2015), “*Abutilon indicum* (Linn.) sweet leaves, a natural source of saponin: A spectrophotometric assay”, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **8**(4), pp.725-729.
- [16] J.C. Baccou, F. Lambert, Y. Sauvaire (1977), “Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin”, *Analyst*, **102**, pp.458-465, DOI: 10.1039/an9770200458.
- [17] N.D.T. Huong, H.T. Nguyet, T.M. Ngoc (2022), “Effects of extract conditions on polyphenols and flavonoids from the extract of *Costus pictus* D. Don leaves grown in Vietnam.”, *Journal of Science of Food*, **22**(4), pp.55-63 (in Vietnamese).
- [18] D.T.M. Trinh, T.M. Ngoc, N.T. Lien, et al. (2022), “Optimization conditions for extraction of saponin triterpenoid from *Camellia oleifera* by surface response method (RSM)”, *Journal of Science of Food*, **22**(4), pp.76-87 (in Vietnamese).
- [19] Y. Hu, X. Cui, Z. Zhang, et al. (2018), “Optimisation of ethanol-reflux extraction of saponins from steamed panax notoginseng by response surface methodology and evaluation of hematopoiesis effect”, *Molecules*, **23**(5), DOI: 10.3390/molecules23051206.
- [20] R. Ramya, R. Dhamotharan (2015), “Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Costus speciosus*”, *Int. J. Heal. Sci. Res.*, **5**(12), pp.170-176.
- [21] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga (1996), “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids”, *Free Radic. Biol. Med.*, **20**(7), pp.933-956, DOI: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
- [22] S. Dong, X. Yang, L. Zhao, et al. (2020), “Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria”, *Ind. Crops Prod.*, **149**(7), DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112350.
- [23] K. Vijayaraghavan, J. Rajkumar, M.A. Seyed (2018), “Phytochemical screening, free radical scavenging and antimicrobial potential of *Chromolaena odorata* leaf extracts against pathogenic bacterium in wound infections - A multispectrum perspective”, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **15**(7), pp.103-112, DOI: 10.1016/j.bcab.2018.05.014.