

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA TINH DẦU TIÊU ĐEN

Huỳnh Hoàng Duy^{1*}, Thi Đình Nguyên¹,
Nguyễn Thị Như Hào², Đống Thị Anh Đào², Nguyễn Thị Hàng³

TÓM TẮT

Title: Chemical composition and antibacterial activity of black pepper essential oil

Từ khóa: tinh dầu tiêu đen, hoạt chất sinh học, vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm, hoạt tính kháng khuẩn, MIC.

Keywords: Black pepper essential oil, biologically-active compounds, spoilage bacteria, antibacterial activity, MIC.

Lịch sử bài báo

- Ngày nhận bài: 30/6/2022

- Ngày nhận kết quả bình duyệt: 16/7/2022

- Ngày chấp nhận đăng bài: 29/7/2022

Tác giả:

¹Trường ĐH Yersin Đà Lạt

² Trường ĐH Bách Khoa – Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh

³Trường ĐH Công nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh

Email:

duyhh@yersin.edu.vn

Nghiên cứu được thực hiện để xác định thành phần hóa học của tinh dầu tiêu đen chiết xuất từ hạt hồ tiêu đen tại tỉnh Đắk Nông, Việt Nam. Phổ GC-MS ghi nhận trong tinh dầu tiêu chứa 13 hợp chất hữu cơ với thành phần chính là 3-Carane (25,6%), b-Caryophyllene (20,7%), Limonene (21,6%). Đánh giá khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu trên 5 chủng vi khuẩn *E. coli*, *B. cereus*, *P. pseudomollei*, *Salmonella*, và *S. aureus* ở các nồng độ từ 4,4 - 88 mg/mL thì kết quả đường kính vòng tròn vô khuẩn tăng dần và đạt giá trị cực đại tại nồng độ 88 mg/mL lần lượt là 18,38; 15,88; 13,88; 15,25; 12,25 mm, so với đường kính vô khuẩn của kháng sinh Amoxicilin 10 mg/mL là 6,63; 18,38; 10,00; 19,25; 6,38 mm thì khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen có thể ngang bằng hay thậm chí còn tốt hơn so với dung dịch Amoxicilin. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC của tinh dầu tiêu đen trên 5 chủng vi khuẩn *E. coli*, *B. cereus*, *P. pseudomollei*, *Salmonella*, và *S. aureus* lần lượt là 128, 2048, 1024, 256 và 2048 µg/mL.

ABSTRACT

The study was conducted to identify the chemical compound of black pepper essential oil extracted from black pepper seed cultivated in Dak Nong province, Vietnam. According to GC-MS analysis, black pepper essential oil contains 13 chemical compounds, the majority of which are 3-Carane (25,6%), b-Caryophyllene (20,7%), Limonene (21,6%), all of which are biologically-active compounds. The antibacterial activity of pepper essential oil on 5 pathogenic bacteria strains *E. coli*, *B. cereus*, *P. pseudomollei*, *Salmonella*, and *S. aureus* from 4,4 to 88 mg/mL was evaluated. The results show that, at the concentrations from 4,4 to 88mg/ml, the diameter of the antibacterial circle increases steadily and reaches the peaks at the concentration of 88 mg/mL, which is 18,38; 15,88; 13,88; 15,25; 12,25 mm respectively, compared to the diameter of the antibacterial circle of Amoxicillin 10 mg/mL is 6,63; 18,38; 10,00; 19,25; 6,38 mm, showing that the antibacterial activity of black pepper essential oil can be equal to or even better than that of the antibiotic Amoxicillin 10 mg/mL under the same analysis condition. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of black pepper essential oil on 5 strains of *E. coli*, *B. cereus*, *P. pseudomollei*, *Salmonella*, and *S. aureus* are 128, 2048, 1024, 256, and 2048 µg/mL respectively.

1. Đặt vấn đề

Nhiễm vi sinh vật trong chuỗi sản xuất thực phẩm là một nguyên nhân chính gây hư hỏng thực phẩm, các vi sinh vật này có thể gây ra các phản ứng không mong muốn làm thay đổi xấu tới hương vị, mùi, màu sắc, cảm quan và kết cấu của thực phẩm và đặc biệt còn có thể có khả năng gây bệnh truyền qua thực phẩm. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Aspergillus niger* và *Saccharomyces cerevisiae* là các vi sinh vật thông dụng thường xuất hiện trong thực phẩm hư hỏng (López-Malo, Maris Alzamora, & Palou, 2005; Rydlo, Miltz, & Mor, 2006; Singh, Drake, & Cadwallader, 2003). Do đó, để ngăn ngừa sự phát triển của vi sinh vật gây hư hỏng thực phẩm này, một số kỹ thuật bảo quản được áp dụng chẳng hạn như: xử lý nhiệt, ướp muối, axit hóa, sấy khô và sử dụng chất bảo quản - chất kháng khuẩn (Davidson, Taylor, & Schmidt, 2014; Farkas, 2014), các chất này được phủ trên bề mặt thực phẩm hoặc kết hợp vào vật liệu đóng gói để giúp kéo dài hạn sử dụng của thực phẩm (Hanušová, Dobiáš, & Klauisová, 2009). Tuy nhiên, các nhà nghiên cứu cũng như người tiêu dùng nhìn chung đều nhận thức được tác động ngắn hạn cũng như dài hạn của việc sử dụng chất bảo quản nhân tạo đến sức khỏe, nên hiện nay xu hướng nghiên cứu tìm ra các chất kháng khuẩn tự nhiên đang rất được quan tâm.

Các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên bao gồm các loại tinh dầu có nguồn gốc từ thực vật (húng quế, cỏ xạ hương, rau kinh giới, cây quế, cây đinh hương và cây hương thảo), các loại enzym thu được từ các

nguồn động vật (lysozyme, lactoferrin), vi khuẩn từ các nguồn vi sinh vật (nisin, natamycin), hữu cơ axit (axit sorbic, axit propionic, axit xitric) và các polyme có trong tự nhiên (chitosan). Trong đó, tinh dầu thực vật đang được quan tâm rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm vì tiềm năng của chúng như là chất khử nhiễm và vì chúng được công nhận là an toàn (GRAS) theo tiêu chuẩn đánh giá của EU (Smith & Navilliat, 1997). Các thành phần hoạt tính thường được tìm thấy trong các phân đoạn tinh dầu và đã được khẳng định rõ ràng hầu hết chúng đều có hoạt tính kháng khuẩn rộng, chống lại các mầm bệnh và vi khuẩn hư hỏng từ thực phẩm (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2009). Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu thực vật là do cấu trúc hóa học của chúng, đặc biệt là sự hiện diện của các nhóm chức ưa nước, chẳng hạn như nhóm hydroxyl của các thành phần phenol hoặc tính ưa béo của một số thành phần tinh dầu (Dorman & Deans, 2000). Thông thường, các hợp chất có nhóm phenolic như dầu của cây đinh hương, rau kinh giới, cây hương thảo, cỏ xạ hương, cây xô thơm và vanillin đem lại hiệu quả kháng khuẩn tốt (Skandamis, Tsigarida, & Nychas, 2002). Chúng ức chế vi khuẩn Gram dương hơn vi khuẩn Gram âm (Mangena & Muyima, 1999; Marino, Bersani, & Comi, 2001).

Hạt tiêu đen được biết đến như là “vua của gia vị” và được sử dụng phổ biến trên toàn cầu trong đó có Việt Nam. Trong lĩnh vực chế biến thực phẩm, tiêu đen thường được sử dụng như gia vị tạo vị cay nhẹ, thơm nồng, giúp tăng hương vị cho món ăn và kích thích ăn ngon miệng (Pino, Rodriguez-Feo, Borges, & Rosado, 1990). Tinh dầu tiêu đen thu được từ vỏ ngoài và

nội nhũ hạt tiêu của cây hồ tiêu (*Pepper nigrum L.*) và có chứa nhiều hợp chất với hoạt tính sinh học cao như Piperine, D-Limonene, Caryophyllene, Pinene, Cymene.. rất tốt cho sức khỏe, giúp tăng cường chức năng tiêu hóa, chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn nên thường được sử dụng để điều trị các bệnh ho, viêm khớp, bệnh thần kinh ngoại vi, bệnh phong..(Bumblauskiene, Jakštas, Janulis, Maždzieriene, & Ragažinskiene, 2009; Prabhu, Kiran, Sundaresan, Mony, & Venugopalan, 2015). Năm 2010, Karsha & cộng sự đã nghiên cứu phương thức tác động của tinh dầu tiêu đen từ Ấn Độ lên màng vi khuẩn hấp thụ UV₂₆₀ nm và UV₂₈₀ nm bằng phương pháp đo quang phổ thì thấy tinh dầu tiêu đen thay đổi tính thấm của màng dẫn đến sự rò rỉ, tức là phá vỡ axit nucleic và protein từ màng ngoài đến môi trường bên trong tế bào vi khuẩn (Karsha & Lakshmi, 2010). Gần đây hơn là nghiên cứu về đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và cơ chế hoạt động của tinh dầu tiêu đen từ Trung Quốc trên chủng vi khuẩn *E.Coli* có trong sản phẩm thịt. Kết quả cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu tiêu đen là 1,0 µg/mL, đường kính vòng tròn vô khuẩn nằm trong khoảng 17,12 - 26,13 mm. Nghiên cứu trên đã kết luận rằng là tinh dầu tiêu đen rất có tiềm năng là chất bảo quản tự nhiên để ứng dụng cho các sản phẩm từ thịt (Zhang et al., 2017a). Đối với các nghiên cứu về tinh dầu tiêu đen tại Gia Lai, Việt Nam vào năm 2019, Thien Hien Tran & cộng sự đã đưa ra các thông số tác động của quá trình chiết tách chưng cất thủy và phân tích các thành phần hóa học của tinh dầu, kết quả thu được từ phổ GC-MS cho thấy hàm lượng các thành phần chính trong tinh dầu tiêu

đen tại Gia Lai là 3-carene (29,2%), D-Limonene (20,9%), Caryophyllene (15,1%) và β-Pinene (9,8%) (Tran et al., 2019).

Từ nền tảng ngoại suy này cho thấy rằng các nhà nghiên cứu đang hướng về khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen và tại Việt Nam, các nghiên cứu bước đầu đã xác định các thành phần hóa học của tinh dầu tiêu từ Gia Lai, hứa hẹn là một chất bảo quản tự nhiên tiềm năng để sử dụng trong thực phẩm. Tuy nhiên, rất khó để biện minh điều này nếu không có các kết quả nghiên cứu thêm về hoạt động kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen tại các khu vực địa lý khác nhau ở Việt Nam và cũng như đánh giá về khả năng kháng khuẩn của chúng để làm nền tảng cho các ứng dụng thực phẩm sau này. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu là phân tích thành phần hóa học và đánh giá khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen, đồng thời xác định nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu tiêu trên năm chủng vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm. Kết quả nghiên cứu thu được được kỳ vọng sẽ hỗ trợ sự phát triển hơn nữa các chất bảo quản tự nhiên có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật phong phú tại Việt Nam và có giá thành thấp.

2. Nội dung

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tinh dầu tiêu đen được cung cấp bởi Công Ty An Phong, Xã Nâm, N'Jang, Huyện Đăk Dong, Tỉnh Đăk Nông và bảo quản ở điều kiện lạnh 4°C trong lọ thủy tinh tối màu.

Các chủng vi khuẩn *Escherichia Coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* được cung cấp bởi bảo tàng giống vi sinh vật

(VTCC) – Viện Vi Sinh Và Công Nghệ Sinh Học, Đại Học Quốc Gia Hà Nội. Giống vi sinh vật được duy trì trên các khay thạch dinh dưỡng ở 4°C trong phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát thành phần hóa học của tinh dầu tiêu đen

Khảo sát thành phần hóa học của tinh dầu tiêu đen theo phương pháp phân tích sắc khí nối khối phổ GC-MS dựa trên tiêu chuẩn QTTN/KT2 – 022:2017 tại Trung Tâm Kỹ Thuật Tiêu Chuẩn Đo Lường Chất Lượng 3. Ghi nhận phổ GC-MS và xác định phần trăm diện tích peak của từng hợp chất hữu cơ bay hơi.

2.2.2 Chuẩn bị dung dịch huyền phù vi khuẩn

Vi khuẩn được bảo quản lạnh sâu ở nhiệt độ -50°C. Lấy vi khuẩn khỏi tủ đông, tăng nhiệt từ từ và ủ trong tủ ấm 37°C. Tiến hành tăng sinh với 4 mL môi trường TSB cho 40 µl dịch vi khuẩn, tiếp tục 60 µl với 10 mL môi trường, ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 - 12 giờ cho mỗi cấp. Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào dịch vi khuẩn sau tăng sinh và trải lên petri chứa môi trường agar, ủ ở nhiệt độ 37°C trong 12 - 24 giờ. Cấy giữ giống trong các ống thạch nghiêng để tiện sử dụng. Cấy ria các chủng vi khuẩn để tạo ra các khuẩn lạc thuần riêng rẽ. Ủ các đĩa thạch 24 giờ ở 37°C. Dùng que cấy vô trùng lấy 1 - 2 khuẩn lạc hòa tan vào 2 mL nước muối sinh lý vô trùng và trộn đều bằng máy trộn Vortex. So sánh độ đục với ống độ đục chuẩn MC Farland 0,5 tương đương với nồng độ vi khuẩn 10⁸ cfu/mL (Có thể điều chỉnh độ đục bằng cách cho thêm nước muối sinh lý hoặc vi khuẩn). Pha loãng 100 lần huyền phù vi khuẩn đến nồng độ 10⁶ cfu/mL (Hudzicki, 2012).

2.2.3 Đánh giá khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khoan giấy khuếch tán

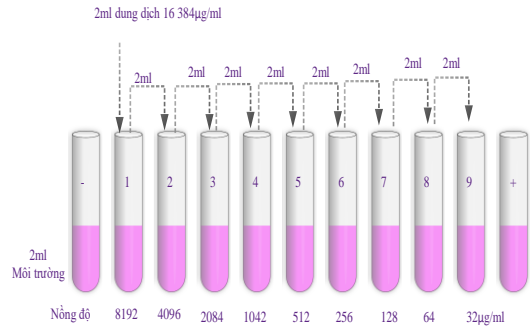
Dùng micropipet nhỏ vào khoan giấy vô trùng có đường kính 6 mm 20 µL lần lượt các dung dịch là: dung dịch DMSO 5% làm đối chứng âm, dung dịch tinh dầu tiêu đen với các nồng độ 4,4 mg/mL, 8,8 mg/mL, 17,6 mg/mL và 88 mg/mL (tinh dầu được pha loãng trong dung dịch DMSO 5%) và dung dịch kháng sinh Amoxicilin 10 mg/mL làm đối chứng dương và để khô trong 30 phút. Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào ống nghiệm chứa huyền phù vi khuẩn 10⁶ cfu/mL và trải đều lên đĩa thạch môi trường. Để khô trong 5 phút trước khi đặt khoan giấy. Đặt khoan giấy lên mặt thạch đã cấy vi khuẩn. Mỗi đĩa thạch gồm 6 khoan giấy của 6 dung dịch mẫu. Khoảng cách tối thiểu giữa hai khoan giấy là 24 mm và với mép petri là 10 - 15 mm. Để đĩa thạch trong tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Kết quả thu được bằng cách dùng thước đo đường kính vòng tròn vô khuẩn xung quanh khoan giấy (Andoğan et al., 2002)

2.2.4 Phương pháp pha loãng nồng độ - xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Lấy 2 mL môi trường lỏng TSB cho vào các ống nghiệm. Cho 2 mL dung dịch tinh dầu tiêu nồng độ 16384 µg/mL (tinh dầu tiêu được pha loãng với dung dịch DMSO 0,5%) vào ống nghiệm 1 tạo thành dung dịch tinh dầu tiêu 8192 µg/mL. Trộn đều rồi lấy 2 mL dung dịch tinh dầu tiêu từ ống nghiệm 1 sang ống nghiệm 2 để được dung dịch tinh dầu tiêu nồng độ 4096 µg/mL. Tiếp tục với các ống nghiệm còn lại để được dung dịch pha loãng với nhiều nồng độ khác nhau lần lượt là 8192 µg/mL, 4096 µg/mL, 2048 µg/mL, 1024 µg/mL,

512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL và 32 µg/mL. Lấy 0,2 mL huyền dịch vi sinh vật 10^6 cfu/mL cho vào mỗi ống nghiệm. Sử dụng một ống nghiệm chỉ chứa môi trường làm đối chứng (-) và một ống nghiệm chứa vi khuẩn và môi trường làm đối chứng (+). Làm tương tự nhưng thay dung dịch tinh dầu tiêu bằng dung dịch kháng sinh Amoxicilin 1024 µg/mL để được dãy dung dịch có nồng độ 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL và 2 µg/mL. Nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C. Sau 24 giờ, bổ sung 400µl dung dịch thuốc thử Tetrazolium Chloride vào mỗi ống nghiệm. So màu và đọc kết quả.

Ống nghiệm có vi khuẩn phát triển sẽ chuyển màu đỏ. Giá trị MIC được xác định là nồng độ tinh dầu tiêu trong ống nghiệm có nồng độ thấp nhất mà tại đó không có vi khuẩn phát triển tức là không làm dung dịch trong ống nghiệm hóa đỏ. (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008).



Hình 1: Sơ đồ thí nghiệm phương pháp pha loãng nồng độ

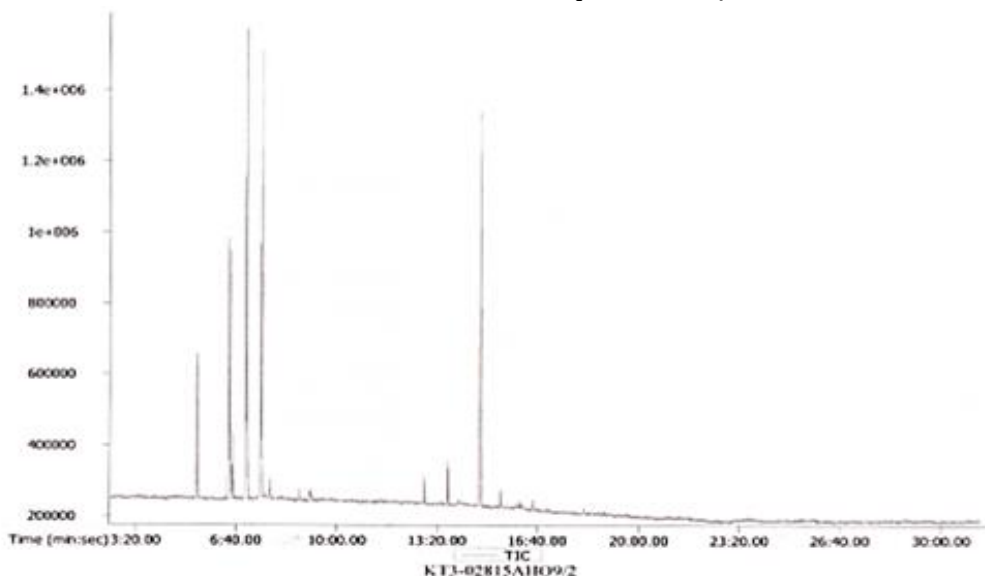
2.2.5. Phân tích thống kê số liệu nghiên cứu

Số liệu thu thập được phân tích bằng phần mềm SPSS Statistics 22 (SPSS Inc. Chicago, U.S.A) theo phương pháp thống kê mô tả (trung bình, độ lệch chuẩn). One-way ANOVA và Tukey's Multiple Range được sử dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình ở mức ý nghĩa 5%.

2.3. Kết quả nghiên cứu

2.3.1 Xác định thành phần hóa học của tinh dầu tiêu đen từ Đắk Nông, Việt Nam

Phổ GC-MS ghi nhận các peak là các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi có trong tinh dầu tiêu đen được thể hiện ở hình 1, từ diện tích các peak có thể định lượng được thành phần hóa học của tinh dầu.



Hình 2. Phổ GC- MS thể hiện peak của các hợp chất có trong tinh dầu tiêu đen

Bảng 1. Kết quả hàm lượng các hợp chất trong tinh dầu tiêu đen

Hợp chất	Mẫu phân tích (%)	Tinh dầu tiêu đen tại Tỉnh Gia Lai (Tran et al., 2019)	Tinh dầu tiêu đen tại Ấn Độ (Aziz, Naher, & Roy, 2012)
α -Pinene	6,8	4,7	7,4
(-) β -Pinene	12,6	9,8	13,2
β -Myrcene	2,6	2,9	3,1
3-Carane	25,6	29,2	32,6
α -Phellandrene	4,4	0,1	0,8
Limonene	21,6	20,9	15,2
Cymol	0,8	-	-
Linalool	0,5	0,4	-
δ -Elemene	1,1	3,5	-
α -Copaene	2,0	3,2	-
α -Caryophyllene	0,7	0,9	-
β -Caryophyllene	20,7	15,1	10,7
δ -Cadinene	0,5	1,2	-

Tinh dầu tiêu đen thu hoạch tại Đắk Nông, Việt Nam là một hỗn hợp đa dạng có chứa 13 hợp chất hữu cơ với thành phần chính là 3-Carane (25,6%), Limonene (21,6%), β -Caryophyllene (20,7%), β -Pinene (12,6%), α -Pinene (6,8%) và các hợp chất chiếm hàm lượng rất thấp như δ -Cadinene (0,5%), Linalool (0,5%) và α -Caryophyllene (0,7%). Trong đó, ghi nhận hàm lượng 3-Carane đạt giá trị cao nhất và là hợp chất có hoạt tính sinh học cao, có khả năng chống oxy hóa mạnh.

Khi so sánh với kết quả thu được từ tinh dầu trong hạt tiêu đen được thu hoạch từ tỉnh Gia Lai, Việt Nam qua phổ GC-MS cho thấy có sự tương đồng về thành phần và cũng như hàm lượng các thành phần chính của hai loại tinh dầu từ hai tỉnh có sự khác biệt không lớn. Trong đó, thành phần chính của tinh dầu tiêu đen ở Gia Lai là 3-Carane (29,2%), Limonene (20,94%), β -Caryophyllene (15,1%), β -Pinene (9,8%), và α -Pinene (4,7%). Hơn nữa, khi đối chiếu

với mẫu tinh dầu tiêu từ Ấn Độ thì hàm lượng 3-Carane cũng ghi nhận kết quả cao nhất là 32,6%, cao hơn so với các giá trị thu được từ tinh dầu tiêu từ Việt Nam. Bên cạnh đó thì hàm lượng các hoạt chất chính còn lại như β -Caryophyllene, Limonene, β -Pinene, α -Pinene có sự thay đổi và khác biệt đáng kể. Sự khác biệt này có thể do sự khác nhau về giống tiêu đen (*Pepper nigrum L.*) cũng như vị trí địa lý và điều kiện sinh thái.

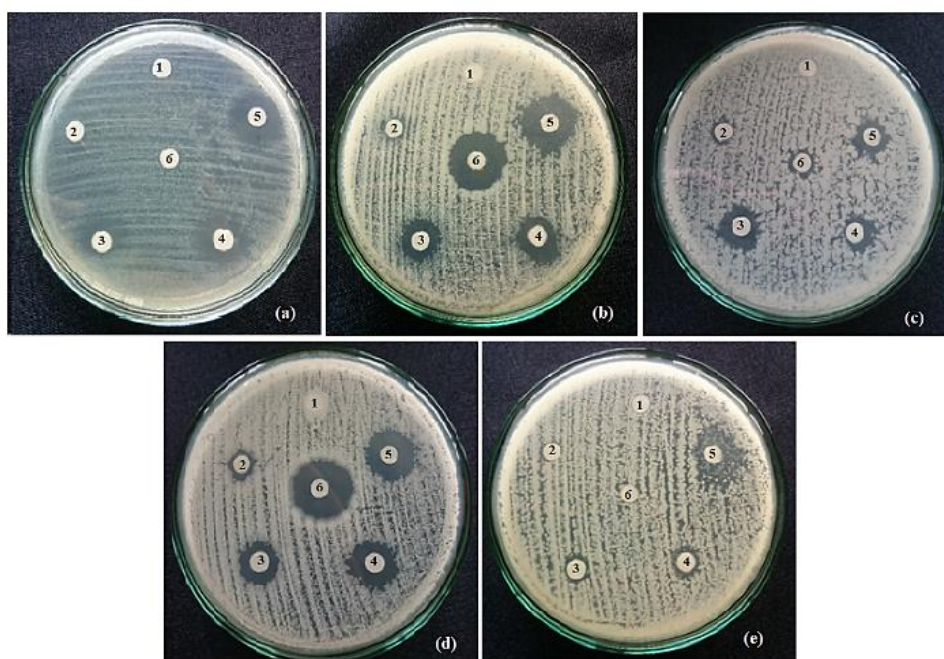
2.3.2 Kết quả thí nghiệm khoanh giấy kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen được xác định dựa trên khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn trong điều kiện nuôi cấy in vitro. Nghiên cứu được thực hiện ở các nồng độ khác nhau của tinh dầu tiêu đen là 4,4 mg/mL, 8,8 mg/mL, 17,6 mg/mL, 88 mg/mL. Kết quả vòng tròn vô khuẩn của tinh dầu tiêu trên 5 loại vi khuẩn được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Đường kính vòng tròn vô khuẩn của các mẫu tinh dầu tiêu đen và mẫu đối chứng

Dung dịch	Đường kính vòng tròn vô khuẩn d (mm)				
	<i>E.Coli</i>	<i>B. Cereus</i>	<i>P. pseudomallei</i>	<i>Samonella</i>	<i>S.aureus</i>
DMSO 5%	6,00 ^a ± 0,00	6,00 ^a ± 0,00	6,00 ^a ± 0,00	6,00 ^a ± 0,00	6,00 ^a ± 0,00
4,4 mg/mL	7,00 ^b ± 0,76	8,88 ^c ± 0,52	8,69 ^b ± 1,07	8,25 ^b ± 1,04	6,31 ^a ± 0,37
8,8 mg/mL	8,63 ^c ± 1,06	12,13 ^d ± 1,55	12,88 ^{ef} ± 1,81	12,25 ^c ± 1,67	8,50 ^b ± 0,46
17,6 mg/mL	10,00 ^d ± 1,69	12,81 ^d ± 1,25	12,13 ^{de} ± 0,83	12,50 ^c ± 1,69	9,86 ^{bc} ± 0,83
88 mg/mL	18,38 ^e ± 1,19	15,88 ^e ± 2,42	13,88 ^f ± 2,36	15,25 ^d ± 1,04	12,25 ^d ± 1,83
Amoxicilin 10mg/mL	6,63 ^{ab} ± 0,52	18,38 ^f ± 0,74	10,00 ^{bc} ± 0,93	19,25 ^e ± 0,89	6,38 ^a ± 0,52

Trong cùng một cột, các số có chữ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$



Hình 3. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen trên các chủng vi khuẩn (a) *E. Coli*, (b) *B. cereus*, (c) *P. pseudomallei*, (d) *Salmonella*, (e) *S. aureus*.

Thứ tự khoan giấy số (1): Đối chứng âm DMSO 5%, (2): Dung dịch tinh dầu tiêu đen 4,4 mg/mL, (3): Dung dịch tinh dầu tiêu đen 8,8 mg/mL. (4): Dung dịch tinh dầu tiêu đen 17,6 mg/mL (5): Dung dịch tinh dầu tiêu đen 88 mg/mL (6): Đối chứng dương dung dịch Amoxicilin 10 mg/mL

Trong thí nghiệm khoan giấy khuếch tán dung dịch DMSO 5% được dùng làm

dung môi pha loãng tinh dầu tiêu đen giúp cho sự phân tán tinh dầu tốt hơn. Đối với khoan giấy tẩm dung dịch DMSO 4,4 mg/mL vòng kháng khuẩn thu được $d_{DMSO} = 6$ mm ở mọi chủng vi khuẩn, chứng tỏ dung dịch DMSO 5% không có hoạt tính với các chủng vi khuẩn. Do đó, DMSO phù hợp để sử dụng làm đối chứng âm trong thí nghiệm.

Trên 2 chủng vi khuẩn gram âm *E.Coli* và *S. aureus* được khảo sát, đường kính vòng tròn vô khuẩn của đối chứng dương kháng sinh Amoxicilin 10mg/mL lần lượt là $d = 6.63 \pm 0,52$ mm và $6,38 \pm 0,52$ mm, khá tương đồng và gần như không có sự khác biệt đáng kể với đường kính của khoanh giấy là 6 mm nên có thể nhận định khả năng kháng khuẩn của kháng sinh Amoxicilin trên 2 chủng vi khuẩn gram âm *E.Coli* và *S. aureus* yếu và thêm nữa là giá trị này cũng nhỏ hơn đường kính vòng tròn vô khuẩn của tinh dầu tiêu đen tại các nồng độ khảo sát từ 4,4 đến 88 mg/mL. Điều này cho thấy khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen rất tốt và tốt hơn nhiều so với đối chứng dương.

Đối với chủng vi khuẩn *B. cereus* và *Samonella* thì tinh dầu tiêu đen có khả năng kháng và cường độ kháng khuẩn tăng dần theo chiều tăng của nồng độ khảo sát từ 4,4 đến 88 mg/mL. Tuy nhiên, khả năng kháng khuẩn này của tinh dầu tiêu đen thấp hơn so với đối chứng dương là kháng sinh Amoxicilin 10 mg/mL ở mọi nồng độ khảo sát là $d = 18,38 \pm 0,74$ và $19,25 \pm 0,89$. Đồng thời, giá trị đường kính vòng tròn vô khuẩn của kháng sinh Amoxicilin đối với 2 loại vi khuẩn này cũng cao vượt trội hơn so với nhóm vi khuẩn còn lại *E.Coli*, *S. aureus* và *P. pseudomallei*.

Khi khảo sát khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen trên chủng vi khuẩn *P. pseudomallei*, kết quả thu được tại nồng độ 8,8; 17,6 và 88 mg/mL, đường kính vòng tròn vô khuẩn lớn và lớn hơn nhiều so với đối chứng dương nên khả năng kháng khuẩn tinh dầu tiêu đen cao hơn so với mẫu đối chứng dương Amoxicilin 10 mg/mL.

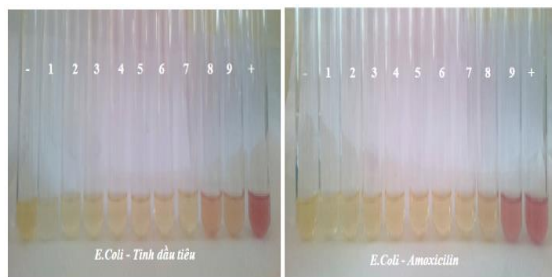
Đường kính vòng tròn vô khuẩn ở các chủng vi khuẩn không có sự chênh lệch lớn tại nồng độ thấp 4,4 mg/mL. Cụ thể đường kính lớn nhất thể hiện ở vi khuẩn *B. cereus* với $d = 8,88 \pm 0,52$ mm và nhỏ nhất ở vi khuẩn *S. aureus* với $d = 6,31 \pm 0,37$ mm. Song ở các nồng độ 8,8 mg/mL, 17,6 mg/mL và 88 mg/mL, sự chênh lệch đường kính vòng vô khuẩn trên các chủng vi khuẩn lớn hơn. Ở nồng độ 8,8 mg/mL đường kính lớn nhất thể hiện ở chủng *P. pseudomallei*. Ở nồng độ 17,6 mg/mL, đường kính lớn nhất thể hiện ở chủng *B. cereus*. Ở nồng độ 88 mg/mL, đường kính lớn nhất thể hiện ở chủng vi khuẩn *E. coli*.

Năm 2017, tác giả Zhang và cộng sự đã nghiên cứu hoạt động kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen từ Trung Quốc trên vi khuẩn *E.coli*, kết quả thu được cho thấy khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen tăng dần theo mức tăng nồng độ khảo sát 0,0, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 μ L/mL. Đồng thời, theo phân loại 3 mức độ hoạt động kháng khuẩn bằng giá trị đường kính vùng kháng khuẩn: hoạt động mạnh ($d > 20$ mm), hoạt động trung bình ($12 \text{ mm} < d < 20 \text{ mm}$) và hoạt động yếu ($d < 12 \text{ mm}$), tác giả đưa ra kết luận tinh dầu tiêu đen có hoạt tính kháng khuẩn mạnh với giá trị đường kính vùng kháng khuẩn của *E. coli* được hiển thị trong khoảng từ 17,12 mm đến 26,13 mm (Zhang et al., 2017a). Kết quả thu được tương đồng với nghiên cứu đã được thực hiện.

2.3.3 Kết quả thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC

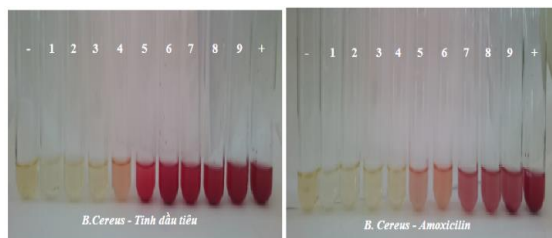
Kết quả thí nghiệm xác định giá trị MIC trên chủng vi khuẩn *E. coli* được thể hiện như hình 4. Giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen là 128 μ g/mL và giá trị MIC của dung dịch

Amoxicilin trên chủng vi khuẩn *E. coli* cũng cho giá trị tương đương là 128 $\mu\text{g/mL}$.



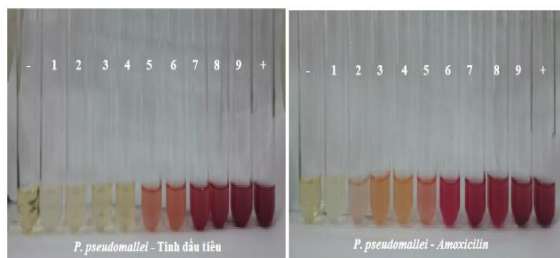
Hình 4. Giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen và dung dịch Amoxicilin trên *E.Coli*

Kết quả thí nghiệm xác định giá trị MIC trên chủng vi khuẩn *B. cereus* được thể hiện như hình 5. Trong đó ghi nhận giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen trên chủng *B. cereus* là 2048 $\mu\text{g/mL}$ và MIC của dung dịch Amoxicilin trên chủng vi khuẩn *B. cereus* là 1024 $\mu\text{g/mL}$.



Hình 5. Giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen và dung dịch Amoxicilin trên *B.cereus*

Thực hiện tương tự đối với *P. pseudomallei*, giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen trên chủng vi khuẩn *P. pseudomallei* là 1024 $\mu\text{g/mL}$ và dung dịch Amoxicilin là 8192 $\mu\text{g/mL}$ được thể hiện trên hình 6.



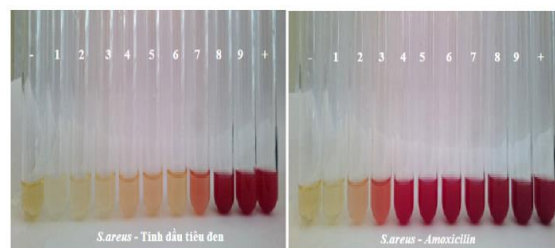
Hình 6: Giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen và dung dịch Amoxicilin trên *P.pseudomallei*

Kết quả thí nghiệm xác định giá trị MIC trên chủng *Salmonella* của tinh dầu tiêu đen và mẫu đối chứng dung dịch Amoxicilin được thể hiện như hình 7. Giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen trên chủng vi khuẩn *Salmonella* là 256 $\mu\text{g/mL}$. Giá trị MIC của dung dịch Amoxicilin trên chủng vi khuẩn *Salmonella* là 64 $\mu\text{g/mL}$.



Hình 7. Giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen và dung dịch Amoxicilin trên *Salmonella*

Giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen trên chủng vi khuẩn *S. aureus* là 2048 $\mu\text{g/mL}$ và của dung dịch đối chứng dương Amoxicilin là 8192 $\mu\text{g/mL}$, kết quả được thể hiện như trong hình 8.



Hình 8. Giá trị MIC của tinh dầu tiêu đen và dung dịch Amoxicilin trên *S. aureus*

Bảng 3. Giá trị MIC ($\mu\text{g /mL}$) của tinh dầu tiêu đen và dung dịch Amoxicilin

Chủng vi khuẩn	MIC của tinh dầu tiêu đen ($\mu\text{g /mL}$)	MIC của Amoxicilin ($\mu\text{g /mL}$)
<i>Escherichia coli</i>	128	128
<i>Bacillus cereus</i>	2048	1024
<i>P. pseudomallei</i>	1024	8192
<i>Salmonella</i>	256	64
<i>S.aureus</i>	2048	8192

Khi so sánh kết quả MIC được mô tả chi tiết ở bảng 3 và kết quả thí nghiệm khoanh giấy kháng khuẩn ở bảng 2 thì thấy có sự khác biệt về khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tiêu đen và dung dịch kháng sinh Amoxicilin, đặc biệt ở chủng vi khuẩn *E.coli*. Sự khác biệt này có thể do khả năng khuếch tán không giống nhau của mẫu dung dịch có phối và không có phối nhũ hóa DMSO 5%, tuy nhiên sự khác biệt này không quá lớn và kết quả trên các vi khuẩn còn lại có sự tương đồng cao. Nếu đánh giá chung trên 5 loại vi khuẩn thì nồng độ tối thiểu ghi nhận được của tinh dầu tiêu đen để ức chế vi khuẩn là 2048 $\mu\text{g/mL}$ và của dung dịch Amoxicilin là 8192 $\mu\text{g/mL}$. Từ đó, có thể sử dụng kết quả như một cơ sở để tính toán lượng tinh dầu tiêu đen hợp lý để ứng dụng trong bảo quản thực phẩm.

3. Kết luận

Tinh dầu tiêu đen từ Đắk Nông, Việt Nam có thành phần hóa học phức tạp gồm nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó hợp chất chiếm hàm lượng chính là 3-Carane (25,6%), Limonene (21,6%), β -

Caryophyllene (20,7%), β -Pinene (12,6%), α -Pinene (6,8%). Khi đánh giá khả năng kháng khuẩn thì tinh dầu tiêu đen có hoạt tính kháng khuẩn ngang bằng hoặc thậm chí còn tốt hơn so với kháng sinh Amoxicilin 10 mg/mL. Tinh dầu tiêu đen với nồng độ 2048 $\mu\text{g/mL}$ có thể ức chế được toàn bộ các vi sinh vật khảo sát *E. coli*, *B. cereus*, *P. pseudomollei*, *Salmonella* và *S. aureus*. Kết quả trên của nghiên cứu sẽ làm tiền đề cho việc ứng dụng tinh dầu tiêu đen trong công thức các sản phẩm thực phẩm để hạn chế sự phát triển của vi sinh vật, và thay thế cho các chất bảo quản tổng hợp khác. Từ nền tảng nghiên cứu này có thể đưa ra hướng nghiên cứu tiếp theo là xác định hàm lượng tiêu diệt tối thiểu của vi sinh vật MBC của tinh dầu tiêu đen, đánh giá hạn sử dụng của tinh dầu tiêu đen trong sản phẩm thực phẩm để bị hư hỏng với hàm lượng chất béo cao, cũng như nghiên cứu ra các sản phẩm dạng nhũ hóa từ tinh dầu tiêu để tạo thành hệ nhũ có khả năng phân tán tốt, đem lại hiệu quả kháng khuẩn tối ưu hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andoğan, B. C., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Özbaşar, D., & Mumcu, E. (2002). Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of Pharmacal Research*, 25(6), 860–864. <https://doi.org/10.1007/BF02977005>

Aziz, S., Naher, S., & Roy, S. K. (2012). International Journal of Pharmaceutical

and Phytopharmacological Research Comparative Studies on Physicochemical Properties and GC-MS Analysis of Essential Oil of the Two Varieties of the Black Pepper (*Piper nigrum* Linn.). *Int.J.Pharm.Phytopharmacol.Res*, 2012(2), 67–70. Retrieved from www.eijppr.com

- Bumblauskiene, L., Jakštas, V., Janulis, V., Maždžieriene, R., & Ragažinskiene, O. (2009). Preliminary analysis on essential oil composition of *Perilla L.* cultivated in Lithuania. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 66(4), 409–413.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2014). Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. In *Food Microbiology* (pp. 765–801). <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch30>
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Farkas, J. (2014). Physical Methods of Food Preservation. In L. . Doyle, M.P; Beuchat (Ed.), *Food Microbiology* (pp. 685–712). <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch29>
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.008>
- Hanušová, K., Dobiáš, J., & Klaudivová, K. (2009). Effect of packaging films releasing antimicrobial agents on stability of food products. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(SPEC. ISS.), 347–349. <https://doi.org/10.17221/958-cjfs>
- Hudzicki, J. (2012). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *American Society For Microbiology*, (December 2009), 1–13. Retrieved from <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
- Karsha, P. V., & Lakshmi, O. B. (2010). Antibacterial activity of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) with special reference to its mode of action on bacteria. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(2), 213–215.
- López-Malo, A., Maris Alzamora, S., & Palou, E. (2005). Aspergillus flavus growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 99(2), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.010>
- Mangena, T., & Muyima, N. Y. O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in Applied Microbiology*, 28(4), 291–296. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00525.x>
- Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00447-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00447-0)
- Pino, J., Rodriguez-Feo, G., Borges, P., &

- Rosado, A. (1990). Chemical and sensory properties of black pepper oil (Piper nigrum L.). *Food / Nahrung*, 34(6), 555–560. <https://doi.org/10.1002/food.19900340615>
- Prabhu, G. R. D., Kiran, C. R., Sundaresan, A., Mony, R. S., & Venugopalan, V. V. (2015). Process development studies for recovery of bio active isolates from spent black pepper generated from ayurvedic industry. *Industrial Crops and Products*, 66, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.029>
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>
- Rydlo, T., Miltz, J., & Mor, A. (2006). Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. *Journal of Food Science*, 71(9), R125–R135. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00175.x>
- Sana Mukhtar, I. G. (2012). *Anst Entibacterial Activity Of Aqueous And Ethanolic Extract Of Garlic, Cinnamon And Turmeric Agaischerichia coli ATCC 25922 And Bacillus subtilis DSM 3256 . Department of Environmental Sciences , Fatima Jinnah Women University , the Mall., (1991), 131–136.*
- Singh, T. K., Drake, M. A., & Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(4), 166–189. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00021.x>
- Skandamis, P., Tsigarida, E., & Nychas, G.-J. (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of Salmonella typhimurium in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19(1), 97–103. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0447>
- Smith, M. D., & Navilliat, P. L. (1997). A new protocol for antimicrobial testing of oils. *Journal of Microbiological Methods*, 28(1), 21–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(96\)00958-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(96)00958-X)
- Tran, T. H., Ha, L. K., Nguyen, D. C., Dao, T. P., Nhan, L. T. H., Nguyen, D. H., ... Bach, L. G. (2019). The study on extraction process and analysis of components in essential oils of black pepper (Piper nigrum L.) seeds harvested in Gia Lai Province, Vietnam. *Processes*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/pr7020056>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Zhang, J., Ye, K. P., Zhang, X., Pan, D. D., Sun, Y. Y., & Cao, J. X. (2017a). Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02094>