



DOI:10.22144/ctujos.2023.220

## HIỆU QUẢ CỦA CHẤT CHIẾT CÂY GIẤM (*Hibiscus sabdariffa* L.) ĐỐI VỚI HOẠT TÍNH KHÁNG *Vibrio parahaemolyticus*, TĂNG TRƯỞNG VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*)

Nguyễn Thị Trúc Linh<sup>1\*</sup> và Hồng Mộng Huyền<sup>2</sup><sup>1</sup>Khoa Nông nghiệp Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Trường Đại học Kiên Giang

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): truelinh@tvu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 25/05/2023

Sửa bài (Revised): 04/08/2023

Duyệt đăng (Accepted): 27/08/2023

**Title:** Efficacy of roselle leaf (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract for antibacterial activity against *V. parahaemolyticus*, and growth and immune enhancement of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*)

**Author(s):** Nguyen Thi Truc Linh<sup>1\*</sup> and Hong Mong Huyen<sup>2</sup>

**Affiliation(s):** <sup>1</sup>Tra Vinh University, <sup>2</sup>Kien Giang University

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định hiệu quả của chất chiết lá cây giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.) trong các dung môi khác nhau. Các chất chiết xuất thu được có hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Đường kính vùng ức chế lần lượt là 24,9 mm, 21,6 mm và 11,9 mm trong dung môi methanol, ethanol và nước đun sôi. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của dịch chiết trong methanol lần lượt là 0,02 mg/mL và 0,08 mg/mL. Ngoài ra, chất chiết methanol lá cây giấm còn kích thích tôm tăng trưởng khi cho tôm ăn thức ăn có bổ sung chất chiết ở nồng độ 1% và 1,5% sau 30 ngày thí nghiệm. Thông số huyết học bao gồm tổng tế bào máu (THC), bạch cầu có hạt (GC), bạch cầu không hạt (HC) của tôm ở các nghiệm thức có 1% và 1,5% chất chiết có sự tăng cường khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng ( $p < 0,05$ ). Kết quả nghiên cứu cho thấy chất chiết lá cây giấm rất tiềm năng trong nuôi tôm.

**Từ khóa:** Chất chiết lá giấm, miễn dịch, *Penaeus vannamei*, tăng trưởng, *Vibrio parahaemolyticus*

### ABSTRACT

The study aimed to determine the effectiveness of the extracts of roselle leaf (*Hibiscus sabdariffa* L.) under different solvents. Interestingly, the extracts obtained remarkable levels in anti-bacterial activity against *V. parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease. The inhibition zone diameter was 24.9 mm, 21.6 mm and 11.9 mm under methanol solvent, ethanol solvent and boiled water, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) of the extract in methanol were 0.02 mg/mL and 0.08 mg/mL, respectively. Moreover, roselle leaf methanol extract stimulated the growth of whiteleg shrimp when they were reared with feed supplemented with extracts at 1% and 1.5% after 30 days of experiment. Hematological parameters, including total hemocyte count (THC), granular cell (GC), hyaline cell (HC) of the shrimp fed with the extract at doses of 1% and 1.5% significantly higher than that of the control ( $p < 0.05$ ). The research results show that roselle leaf extract has great potential in shrimp farming.

**Keywords:** Growth, *Hibiscus sabdariffa* L., immune parameters, *Penaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) được xác định do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang plasmid mã hóa gen gây độc (*PirA*, *PirB*) (*Vp<sub>AHPND</sub>*) (Tran et al., 2013; OIE, 2019). *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. owensii* và *V. punensis* cũng được cho là tác nhân gây bệnh AHPND vì các chủng vi khuẩn này đôi khi mang các gen độc tố có trình tự tương đồng với plasmid gây bệnh AHPND (Restrepo et al., 2018). Lee et al. (2022) cho rằng tôm khỏe vẫn có khả năng nhiễm bệnh AHPND khi tiếp xúc với tôm nhiễm AHPND trước đó đã được trữ ở -80°C.

Nhiều kết quả nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả sử dụng thảo dược trong phòng trị bệnh thủy sản (Citarasu, 2010; Chakraborty & Hancz, 2011; Harikrishnan et al., 2011). Hoạt tính kháng khuẩn của các chiết xuất thảo dược cho đến nay là hoạt tính sinh học được nghiên cứu nhiều nhất, với nhiều tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản (Reverter et al., 2017). Các hợp chất được tìm thấy trong các chiết xuất thảo dược có khả năng kháng khuẩn bao gồm: alkaloids, glycosides, polyphenols và terpenes (Ahn, 2017). Sử dụng thảo dược mang đến nhiều lợi ích: ít tốn kém khi sử dụng nguyên liệu thảo dược thô, có sẵn tại địa phương, dễ dàng chuẩn bị, dễ dàng bị phân hủy sinh học và không gây tác động bất lợi cho môi trường (Syahidah et al., 2015). Thời gian gần đây, chất chiết thảo dược giúp tăng khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio* và tăng cường đáp ứng miễn dịch của tôm nuôi đã được nghiên cứu (Ghosh et al., 2021). Chất chiết xuất cây lựu (*Punica granatum*), cây diệp hạ châu (*Phyllanthus* spp.), cây bàng (*Terminalia catappa*), cây thầu dầu (*Ricinus communis* L.) đã được xác định hiệu quả phòng bệnh trên tôm thông qua các thí nghiệm *in-vitro* và *in-vivo* (Huyền và ctv., 2020; Hoa và ctv., 2020). Một số loài thực vật khác như bạch đàn trắng (*Eucalyptus camaldulensis*), ổi (*Psidium guajava*), hồng sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) và trâm móc (*Syzygium cumini*) cũng đã được xác định hiệu quả giúp giảm tỷ lệ chết của tôm khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *Vibrio* (Immanuel et al., 2004; Ghosh et al., 2021). Tất nhiên, kết quả trên phụ thuộc vào phương pháp chiết xuất và nồng độ sử dụng trong thức ăn của tôm (Harikrishnan et al., 2011). Theo Bulfon et al. (2015) thì dung môi hữu cơ hoặc cồn có hiệu quả trong chiết xuất các hợp chất chuyển hóa sinh học thứ cấp (phân cực hoặc không phân cực) với hoạt tính kháng khuẩn và kích thích miễn dịch so với chiết xuất bằng nước. Ở liều tối ưu giúp kích hoạt đáp ứng miễn dịch tối đa và ở liều cao có thể không

tăng cường hoặc thậm chí ức chế đáp ứng miễn dịch. Thời gian bổ sung thảo dược cũng là một trong những yếu tố tác động đến khả năng đáp ứng miễn dịch của tôm và cá (Reverter et al., 2017).

Cây giấm (hay còn được gọi là búp giấm) là loài thực vật hoang dã ở khu vực ven biển của Việt Nam. Chúng có thể sống được những vùng đất ngọt và lợ-mặn. Theo Lợi (2004), cây giấm có khả năng sát trùng, lợi tiểu, chống oxy hóa. Cây giấm có các thành phần hóa học như gogoetine, hibiscin (anthocyanin), glucoside hibiscritin (flavanol), riboflavin, axit ascorbic, niacin, caroten, canxi và sắt (Lade et al., 2022). Các báo cáo trước đây cho thấy chất chiết từ cây giấm có hoạt tính kháng cả vi khuẩn Gram âm (*V. vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteric*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* và *Pseudomonas aeruginosa*) và vi khuẩn Gram dương (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans* và *Bacillus cereus*) (Abdallah, 2016; Abass et al., 2022; Lade et al., 2022). Tuy nhiên, cho đến nay, vẫn chưa có các kết quả nghiên cứu toàn diện về hiệu quả của cây giấm trên đối tượng thủy sản. Cụ thể như khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh trên tôm, khả năng kích thích tăng trưởng, tăng cường miễn dịch và chống lại vi khuẩn gây bệnh trên tôm. Bài viết này là kết quả đánh giá hiệu quả của chiết xuất lá cây giấm lên khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ, đồng thời đánh giá tốc độ tăng trưởng và khả năng đáp ứng miễn dịch trên tôm thí nghiệm.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu lá cây giấm và phương pháp chiết xuất

Lá cây giấm (*Hibiscus sabdariffa*) được thu 3 đợt ở các vị trí khác nhau tại tỉnh Trà Vinh, đợt 1 từ ngày 15/6/2022 đến ngày 15/7/2022, đợt 2 từ ngày 17/7/2022 đến ngày 17/8/2022 và đợt 3 từ ngày 20/8 đến ngày 15/9/2022. Mẫu lá được rửa sạch, sấy ở 50°C đến khô và sau đó được nghiền thành bột. Bột được sử dụng để chiết xuất với ba loại dung môi khác nhau.

Phương pháp 1 (chiết xuất với dung môi methanol): Bột từ lá cây giấm được ngâm trong dung môi methanol với tỉ lệ 1:10 trong 4 ngày. Sau đó hỗn hợp được lọc thô qua vải và tiếp tục được lọc qua giấy lọc Whatman No.1. Dung dịch qua lọc được cô quay chân không với tốc độ quay 150 vòng/phút ở nhiệt độ 50°C, để loại bỏ dung môi

(Bindhu et al., 2014). Sản phẩm sau cô quay được sấy ở 50°C để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Chất chiết sau cùng được lưu trữ ở 4°C.

Phương pháp 2 (chiết xuất với dung môi ethanol): Quy trình tương tự như đối với dung môi methanol. Ngâm bột lá cây giấm trong dung môi ethanol với tỉ lệ 1:10 trong 4 ngày. Hỗn hợp được lọc qua vải và giấy lọc Whatman No.1. Dung dịch qua lọc được cô quay chân không 150 vòng/phút ở 50°C (Bindhu et al., 2014). Trước khi được lưu trữ ở 4°C, chiết xuất cũng được sấy ở 50°C cho đến khi khối lượng không đổi.

Phương pháp 3 (chiết xuất với với nước nóng): Ngâm 10 g bột cây giấm với 150 mL nước (tỉ lệ 1:15). Hỗn hợp được đun ở nhiệt độ 100°C đến khi dịch chiết còn lại khoảng 10 mL (Kongchum et al., 2016). Chiết xuất được bảo quản ở 4°C.

## 2.2. Thí nghiệm in-vitro xác định hoạt tính kháng khuẩn của chất chiết

Thí nghiệm được tiến hành bằng cách chuẩn bị đĩa tẩm chất chiết xuất và dung dịch huyền phù vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. 0,8 g mỗi loại chất chiết lá cây giấm được hòa tan trong 2 mL dung dịch DMSO (Dimethyl sulfoxide). Dung dịch chất chiết (50 µL) được nhỏ từ từ lên một đĩa giấy có đường kính 8 mm (Advantec, New Zealand). Các đĩa giấy được làm khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng (Najjah et al., 2011). Dụng cụ và thao tác thực hiện trong điều kiện vô trùng.

Thí nghiệm sử dụng dòng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được phân lập và định danh từ nghiên cứu trước đây của Linh et al. (2019) được lưu trữ tại phòng thí nghiệm bệnh học của Trường Đại học Trà Vinh. Dòng vi khuẩn này được kiểm tra độc lực gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính bằng kỹ thuật PCR (Dangtip et al., 2015) trước khi được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB (Tryptic Soy Broth, Himedia, Ấn Độ), có bổ sung 1,5% NaCl trong 18-24 giờ để thu dung dịch huyền phù.

### 2.2.1. Đo đường kính vòng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của chiết xuất lá cây giấm được xác định bằng cách đo đường kính của vòng kháng khuẩn Oonmetta-aree (Oonmetta-aree et al., 2006). Dùng tấm bông tiệt trùng nhúng vào dung dịch huyền phù vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với mật số  $10^8$  CFU/mL và tán đều lên bề mặt đĩa môi trường TSA (Tryptone Soya Agar) có bổ sung 1,5% NaCl. Sau đó, các đĩa giấy đã được tẩm chất chiết được đặt lên đĩa môi trường đã được trải vi khuẩn. Các đĩa tẩm DMSO (dimethyl sulfoxide) được sử dụng làm đối chứng âm và đĩa kháng sinh

doxycyclin (DOX, 30 µg) làm đối chứng dương. Các đĩa môi trường TSA được ủ ở 35°C trong 24 giờ. Đo đường kính vòng kháng khuẩn xuất hiện trên các đĩa môi trường TSA. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Từ số liệu đường kính vòng kháng khuẩn, khả năng kháng khuẩn của chất chiết được phân thành các loại: kháng, trung bình, nhạy (Lorian, 1995). Cụ thể, chất chiết có khả năng kháng khuẩn khi đường kính vòng kháng khuẩn  $\leq 9$  mm, tính kháng trung bình khi đường kính khoảng 10 - 13 mm và tính kháng nhạy khi đường kính  $\geq 14$  mm.

### 2.2.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration – MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (minimum bactericidal concentration – MBC)

#### Xác định nồng độ ức chế tối thiểu

Mỗi chiết xuất thảo dược được pha loãng với DMSO thành các tỉ lệ 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048. Tương ứng với mỗi độ pha loãng, 1 mL dịch chiết được cho vào môi trường lỏng TSB-1,5% NaCl có chứa sẵn 1 mL dịch huyền phù vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với mật số  $2 \times 10^6$  CFU/mL. Hỗn hợp được ủ ở 35°C trong 24 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần. Giá trị MIC cần xác định là nồng độ thấp nhất của chiết xuất có khả năng không cho vi khuẩn phát triển trong môi trường lỏng (Oonmetta-aree et al., 2006).

#### Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu

Dịch huyền phù (50 µL) của thử nghiệm MIC được trải lên môi trường thạch TCBS agar (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar). Mỗi chất chiết được lặp lại 3 lần và tương ứng mỗi độ pha loãng. Đĩa thạch được ủ ở 35°C trong 24 giờ. Giá trị MBC của chiết xuất thảo dược được xác định là nồng độ thấp nhất không có vi khuẩn phát triển trên bề mặt đĩa thạch (Oonmetta-aree et al., 2006).

## 2.3. Đánh giá tác động của chất chiết lá cây giấm lên sinh trưởng và phát triển của tôm thẻ chân trắng

### 2.3.1. Chuẩn bị nguyên vật liệu

Tôm được thí nghiệm là tôm thẻ chân trắng ở giai đoạn Postlarvae 15 (âm tính với bệnh đốm trắng, bệnh vi bào tử trùng và bệnh hoại tử gan tụy cấp tính). Tôm được nuôi trong ao tại trại thực nghiệm Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh đến khi tôm đạt kích cỡ khoảng  $10,54 \pm 0,39$  g/con và chiều dài  $11,61 \pm 0,23$  cm. Trước khi bố trí vào các bể nuôi thí nghiệm, tôm được kiểm tra âm tính với mầm bệnh đốm trắng và

AHPND sử dụng phương pháp PCR với đoạn mã đặc hiệu (OIE, 2009) và chu trình nhiệt của Sirikharin et al. (2015). Tôm cũng được thuần dưỡng trong 3 ngày để quen với điều kiện môi trường trong bể nuôi trước khi bắt đầu quá trình cho ăn thử nghiệm.

Nguồn nước sử dụng cho thí nghiệm là nước biển với độ mặn 28‰ ở xã Ba Đông, huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh. Nước biển được lọc qua túi lọc, sau đó được khử trùng với chlorin với nồng độ 20 - 30 mg/L. Tiếp theo, nước được sục khí mạnh và liên tục trong 24 giờ, và được trung hòa Cl tự do bằng Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (tỉ lệ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Cl là 7:1). Nước mặn 28‰ sau khi được xử lý xong thì được pha loãng với nước ngọt để có độ mặn 15‰.

Bổ sung chất chiết lá giấm vào thức ăn: Viên thức ăn tôm với 40% đạm (Công ty chăn nuôi CP, Việt Nam) được áo bên ngoài với chất chiết lá cây giấm với các nồng độ 1%, 1,5% và 2%. Sau đó, viên thức ăn tiếp tục được áo thêm 2% dầu mực (Vemedim, Việt Nam). Viên thức ăn được bảo quản ở 4°C để sử dụng cho thí nghiệm. Đối với nghiệm thức đối chứng, viên thức ăn chỉ được áo với 2% dầu mực.

2.3.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm sử dụng bể composite 500 L có sục khí với mật độ 60 con/bể, độ mặn nước 15‰. Thí nghiệm được bố trí với 4 nghiệm thức với 3 lần lặp lại. Cụ thể, nghiệm thức đối chứng tôm thí nghiệm được cho ăn thức ăn viên 40% đạm (Công ty Chăn nuôi CP, Việt Nam) không bổ sung chiết xuất lá giấm, 3 nghiệm thức còn lại tôm ăn thức ăn được bổ sung 1%, 1,5% và 2% chiết xuất methanol từ lá cây giấm. Tôm thí nghiệm ăn 4 lần/ngày: 7 giờ, 11 giờ, 15 giờ và 21 giờ. Lượng thức ăn theo nhu cầu của tôm, khoảng 7-10% khối lượng thân. Thí nghiệm cho ăn được thực hiện trong thời gian 30 ngày. Theo dõi hoạt động, lượng thức ăn tôm ăn vào để điều

chỉnh lượng thức ăn cho phù hợp và thay nước 30% mỗi ngày bằng cách siphon.

2.3.3. Chỉ tiêu theo dõi

Các thông số môi trường như pH, nhiệt độ, NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> được theo dõi mỗi ngày 1 lần bằng bộ test kit Sera. Nhiệt độ được đo bằng nhiệt kế.

Chiều dài và khối lượng của tôm thí nghiệm được ghi nhận mỗi 10 ngày và thực hiện trong 30 ngày thí nghiệm. Cụ thể, 5 con tôm/bể được bắt ngẫu nhiên để cân khối lượng và đo chiều dài, đánh giá tăng trưởng của tôm ở các nghiệm thức ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lá giấm.

Đánh giá sự tác động của chất chiết đến khả năng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu trên tôm thẻ chân trắng. Cụ thể, tôm thẻ chân trắng được thu mẫu máu để tiến hành xác định chỉ số huyết học. Máu tôm được thu vào các ngày: ngày đầu tiên (trước khi bố trí thí nghiệm), ngày thứ 15 và ngày thứ 30 (ngày kết thúc thí nghiệm) với số lượng 3 con tôm/bể. Phương pháp xác định tổng số tế bào máu (THC) được thực hiện theo phương pháp của Le Moullac et al. (1997) và định loại bạch cầu (GC và HC) theo mô tả của Cornick and Stewart (1978).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Tổng hợp số liệu thí nghiệm được thực hiện trên phần mềm Microsoft Office Excel 2010. Sử dụng phần mềm SPSS 20.0 để kiểm tra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) bằng phép thử Duncan.

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của các chất chiết lá cây giấm với dung môi chiết khác nhau

3.1.1. Xác định đường kính vòng kháng khuẩn

Đường kính vòng kháng khuẩn của các chất chiết với dung môi methanol, ethanol và nước đun sôi được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1. Đường kính vòng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của chất chiết lá cây giấm**

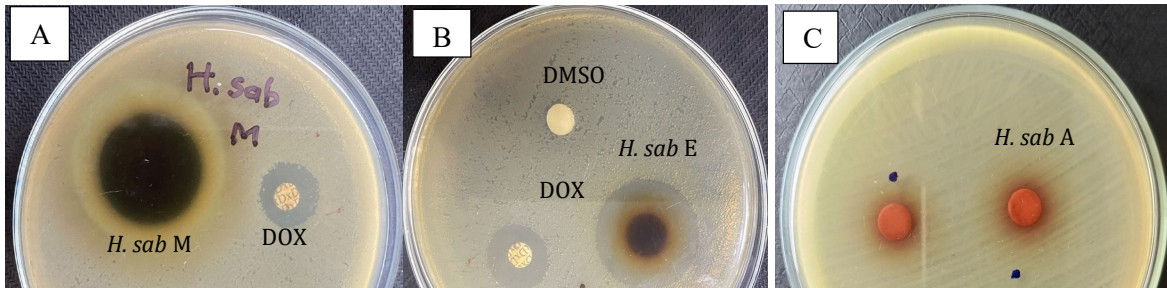
Nghiệm thức	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)				Mức độ kháng
	Đợt thu mẫu thứ 1	Đợt thu mẫu thứ 2	Đợt thu mẫu thứ 3	Trung bình	
<i>H. sab</i> M	25,3±0,6	24,7±0,6	24,7±0,6	24,9±0,6 <sup>a</sup>	S
<i>H. sab</i> E	22,7±0,6	21,3±0,6	20,7±0,6	21,6±0,6 <sup>b</sup>	S
<i>H. sab</i> A	11,3±0,6	11,7±0,6	12,7±0,6	11,9±0,6 <sup>c</sup>	I
DOX	16,3± 0,6	16,7±0,6	15,7±0,6	16,2±0,6 <sup>d</sup>	
DMSO	0,0	0,0	0,0	0,0 <sup>e</sup>	

Ghi chú: Kháng (R): ≤ 9mm; Trung bình (I): ≥ 10 – 13mm; Nhạy (S): ≥ 14mm (Lorian, 1995). *H. sab* M: Chiết xuất lá cây giấm từ phương pháp methanol, *H. sab* E: Chiết xuất lá cây giấm từ phương pháp ethanol, *H. sab* A: Chiết xuất lá cây giấm từ phương pháp nước đun sôi.

Kết quả cho thấy chất chiết từ cả ba phương pháp đều có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Cụ thể, chất chiết lá cây giấm với dung môi methanol có khả năng kháng khuẩn cao nhất với đường kính kháng khuẩn trung bình của 3 đợt thu mẫu là  $24,9 \pm 0,6$  mm, cao gần 1,5 lần so với đối chứng dương (với đường kính trung bình là  $16,2 \pm 0,6$  mm). Chất chiết sử dụng ethanol có đường kính vòng kháng khuẩn trung bình  $21,6 \pm 0,6$  mm, thấp hơn so với chất chiết với methanol nhưng cao hơn so với chất chiết từ phương pháp đun sôi. Đối chứng âm DMSO (cũng là dung môi hòa tan chất chiết) không có ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn trong thử nghiệm (Bảng 1, Hình 1).

Dung môi chiết xuất khác nhau thì chất chiết thu được sẽ cho hoạt tính sinh học khác nhau (Phụng, 2007), nghĩa là dung môi chiết xuất sẽ ảnh hưởng đến thành phần các hợp chất hóa học có lập và theo đó ảnh hưởng đến các hoạt tính sinh học của chất chiết. Nhiều loại dung môi và phương pháp chiết xuất khác nhau được sử dụng để chiết xuất các hợp chất hóa học trong thảo dược đã được nghiên cứu. Chúng bao gồm acetone, benzen, butanol, ethanol, ethyl acetate, methanol, hexane, ether dầu hỏa, dietyl etc, chloroform, ethyl acetate, hoặc thậm chí nước đun sôi, hay nước đun sôi và sau đó lên men

bởi nấm men (Immanuel et al., 2004; Takaoka et al., 2011). Bulfon et al. (2015) cho rằng dung môi hữu cơ (bao gồm các loại cồn) có hiệu quả trong chiết xuất các hợp chất chuyển hóa sinh học thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn và kích thích miễn dịch cao hơn so với chiết xuất bằng nước. Trong nghiên cứu này, chất chiết sử dụng dung môi methanol và ethanol cho ra kết quả kháng khuẩn cao hơn so với phương pháp đun sôi ở  $100^\circ\text{C}$ . Kết quả của nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Methanol có độ phân cực cao hơn ethanol, và theo kết quả nghiên cứu, phương pháp chiết tách bằng methanol có đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn so với phương pháp chiết tách bằng ethanol. Theo Ahn (2017) các hợp chất alkaloids, glycosides, polyphenols, và terpenes chiết xuất từ thực vật đã được xác định có khả năng kháng khuẩn. Đồng thời, Cowan (1999) cho rằng các hợp chất phenols, quinones, flavonoids, flavones, tannins, coumarins ly trích từ thực vật là những hợp chất chính tham gia vào hoạt động kháng khuẩn thông qua các cơ chế làm phá vỡ thành tế bào, ngăn chặn sự tổng hợp protein và tổng hợp DNA, ức chế sự tiết enzyme của vi khuẩn, các chất này có tính phân cực cao. Nhìn chung, kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của dịch chiết lá cây giấm đạt cao nhất khi sử dụng dung môi methanol.



**Hình 1. Vòng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của chất chiết lá cây giấm bằng dung môi**

### 3.1.2. Nồng độ ức chế tối thiểu và diệt khuẩn tối thiểu của chất chiết lá giấm

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chất chiết lá cây giấm sử dụng dung môi methanol là 0,02 mg/mL. Giá trị này của chất chiết sử dụng dung môi ethanol là 0,04 mg/mL (Bảng 2). Kết quả này có nghĩa là chất chiết lá cây giấm sử dụng dung môi methanol có khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cao hơn so với chất chiết sử dụng dung môi ethanol. Theo đó, kết quả này tương đồng với kết quả xác định đường kính vòng kháng khuẩn được mô tả ở Mục 3.1.1. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của chất chiết lá cây giấm sử dụng dung môi methanol và ethanol cũng có sự khác biệt đáng kể, tương ứng là 0,08 và 0,24 mg/mL. Theo

Canillac and Mourey (2001) khi tỷ lệ MBC/MIC của một chất chiết nhỏ hơn hoặc bằng 4 thì chất chiết đó có khả năng diệt khuẩn. Tỷ lệ MBC/MIC của chất chiết sử dụng dung môi methanol là 4. Trong khi đó, phương pháp ethanol có tỷ lệ MBC/MIC lớn hơn 4 (Bảng 2). Từ kết quả trên, dịch chiết lá cây giấm sử dụng dung môi methanol được kết luận có khả năng diệt khuẩn.

Một nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn của chất chiết xuất nước và ethanol từ đài hoa cây giấm kết quả cho thấy chiết xuất ethanol từ đài hoa cây giấm có tác dụng kháng khuẩn với *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* và *Streptococcus mutans* cao hơn đối với chiết xuất bằng nước, trong đó *S. aureus* và *E.*

*coli* nhạy cảm nhất với vùng ức chế tương ứng là 47,9 và 45,8 mm. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với dịch chiết ethanol của *H. sabdariffa* là từ 0,26 đến 1,03 mg/mL (Alaga et al., 2014). Abdallah (2016) cho rằng chất chiết methanol (80%) từ đài hoa cây giấm có hoạt tính kháng khuẩn cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Chất chiết methanol từ cây giấm thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với giá trị MIC dao động từ 0,30±0,2 đến 1,30±0,2 mg/mL chống lại vi khuẩn *S. aureus*, *B. stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marseilles*, *Clostridium sporogens*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. cereus* và *Pseudomonas fluorescences*, chất chiết này chứa các thành phần lycosides, flavonoids, saponins và alkaloids (Olaleye et al., 2007). Ngoài thành phần các hợp chất hóa học có trong thực vật thì phương pháp chiết xuất cụ thể là dung môi chiết xuất có ý nghĩa quan trọng trong hiệu quả sinh học của thảo dược đối với động vật thủy sản, đặc biệt là hoạt tính kháng khuẩn. Dung môi methanol thường được sử dụng làm dung môi để chiết xuất một số loài thực vật có khả năng kháng các loài vi khuẩn gây bệnh trên tôm như *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* (Nguyen et al., 2018; Hoa và ctv., 2020), tuy nhiên hiện nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu chiết xuất methanol từ lá cây giấm kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm. Do đó, kết quả thí nghiệm này cho thấy chất chiết methanol từ

lá cây giấm có tiềm năng sử dụng trong nuôi trồng thủy sản cụ thể là phòng bệnh vi khuẩn gây bệnh trên tôm.

**Bảng 2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của chất chiết lá cây giấm sử dụng 2 loại dung môi khác nhau**

Dung môi	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
Methanol	0,02	0,08	4
Ethanol	0,04	0,24	>4

**3.2. Tác động của chất chiết lá cây giấm lên sự tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng**

**3.2.1. Các chỉ tiêu môi trường**

Kết quả thí nghiệm hiện tại cho thấy việc bổ sung chất chiết vào thức ăn không tác động tiêu cực đến các thông số môi trường. NH<sub>3</sub> trong suốt quá trình bố trí dao động từ 0,0 đến 0,13 mg/L, NO<sub>2</sub> từ 0 đến 4 mg/L, nhiệt độ dao động 27 - 28°C, độ kiềm 90 - 120 mg CaCO<sub>3</sub>/L và pH 7,0 - 8,5 (Bảng 3). Các yếu tố môi trường được quản lý tốt và không vượt ngưỡng gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển bình thường trên tôm trong thời gian thí nghiệm.

**Bảng 3. Giá trị của các thông số môi trường nước của thí nghiệm bổ sung chất chiết vào thức ăn nuôi tôm thẻ chân trắng**

Thí nghiệm	Các yếu tố môi trường				
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	NO <sub>2</sub> (mg/L)	Nhiệt độ (°C)	Độ kiềm mgCaCO <sub>3</sub> /L	pH
Đối chứng	0,0 - 0,13	0,0 - 3,5	27,0 - 28,0	110 - 120	8,0 - 8,5
Giấm 1,0%	0,0 - 0,13	0,0 - 3,5	27,0 - 28,0	100 - 120	7,5 - 8,5
Giấm 1,5%	0,0 - 0,10	0,0 - 3,5	27,0 - 28,0	90 - 120	7,0 - 8,5
Giấm 2,0%	0,0 - 0,10	0,0 - 4	27,0 - 28,0	90 - 120	7,0 - 8,5

**3.2.2. Tốc độ tăng trưởng của tôm thí nghiệm**

Chiều dài trung bình của tôm khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) giữa các thí nghiệm thức trong ngày thứ 10 và 20 sau khi cho ăn bổ sung chất chiết lá cây giấm (Hình 2A). Ở ngày thứ 30, tôm ở thí nghiệm thức bổ sung chất chiết lá giấm có sự tăng trưởng về chiều dài cao hơn so với tôm ở thí nghiệm thức đối chứng (p<0,05). Cụ thể, tôm ở thí nghiệm thức bổ sung 1,5% chất chiết lá giấm cho kết quả tăng trưởng về chiều dài là cao nhất, với chiều dài trung bình là 16,7±0,69 cm/con. Kế đến là tôm ở thí nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết với chiều dài trung bình là 16,13±0,88 cm/con (p<0,05). Tuy nhiên, khi tôm được bổ sung chất chiết với nồng độ cao hơn (2%) thì sự tăng trưởng về chiều dài không có sự khác biệt

so với các thí nghiệm thức còn lại, chiều dài trung bình là 15,31±1,01 cm/con (p>0,05). Tôm ở thí nghiệm thức đối chứng (không được bổ sung chất chiết) chỉ có chiều dài trung bình 14,09±0,46 cm/con. Kết quả thí nghiệm cho thấy, chất chiết chiết lá cây giấm không có tác động tiêu cực đến sự tăng trưởng theo chiều dài của tôm. Đặc biệt, chất chiết giúp gia tăng chiều dài của tôm sau 30 ngày cho ăn liên tục.

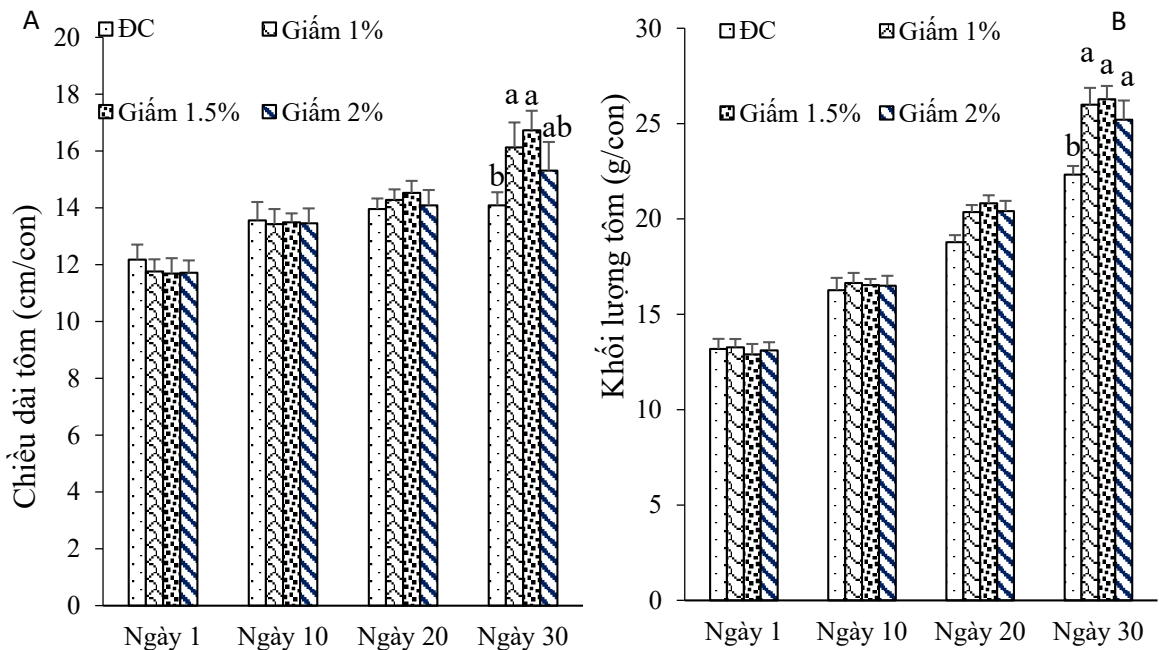
Tương tự như chiều dài, khối lượng của tôm khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các thí nghiệm thức ở ngày thứ 10 và 20 (Hình 2B). Ở ngày thứ 30 sau khi cho ăn, khối lượng trung bình của tôm ở các thí nghiệm thức bổ sung chất chiết là 25,86±0,69 g/con, cao hơn so với tôm ở thí nghiệm thức đối chứng (22,32±0,46 g/con) (P<0,05). Tuy nhiên, trọng



lượng trung bình của tôm không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức có bổ sung chất chiết ( $p > 0,05$ ).

Nhiều chất chiết xuất từ thảo dược có khả năng kích thích tăng trưởng, tăng cường hấp thu và tiêu hóa chất dinh dưỡng, từ đó cải thiện chỉ số chuyển hóa thức ăn (FCR) ở tôm (Ghosh et al., 2021; Reverter et al., 2021). Radhakrishnan et al. (2014) chỉ ra rằng các loại thảo mộc có thể kích thích tăng trưởng vì chúng giúp tăng cường hoạt động của các enzym tiêu hóa (protease, amylase và lipase). Venkatramalingam et al. (2007) ghi nhận cao chiết củ gừng giúp gia tăng hoạt tính của các enzyme tham gia vào quá trình tiêu hóa thức ăn, điều này trực tiếp làm tăng cường hiệu quả sử dụng thức ăn của tôm nuôi; hay bổ sung 0,5% và 1,0% cao chiết thảo dược vào chế độ ăn của tôm thẻ chân trắng trong 60 ngày giúp giảm mật độ vi khuẩn *Vibrio* spp. trong ruột, gan tụy tôm và cải thiện tốc độ tăng trưởng (Huyền và ctv., 2023). Bổ sung chiết xuất gừng (*Zingiber officinale*) (0,2 mg và 2 mg/g thức ăn) giúp tôm thẻ chân trắng tốc cải thiện tốc độ tăng trưởng đặc biệt (SGR), tăng trưởng trung bình hàng ngày (ADG),

trọng lượng cơ thể cuối cùng (FBW) và phần trăm tăng trọng (WG) (Sowannayan et al., 2019). Chiết xuất lá chùm ngây (*Moringa oleifera*) với nồng độ 0,5 % giúp tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) cải thiện tốc độ tăng trưởng về phần trăm tăng trọng (WG), trọng lượng cơ thể cuối cùng (FW) và tăng trưởng đặc biệt theo ngày về khối lượng (SGR), đồng thời làm giảm hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) và hiệu quả sử dụng protein (PER) trong thời gian nuôi 60 ngày (Kaleo et al., 2019). Tương tự như các loại thảo dược nêu trên, kết quả nghiên cứu này cho thấy việc bổ sung dịch chiết lá cây giấm giúp cải thiện tăng trưởng của tôm (chiều dài và khối lượng). Đối với cá hồi vân, chất chiết từ lá cây giấm đã được báo cáo có khả năng kích thích tăng trưởng và miễn dịch của cá nhờ vào các chất chống oxy hóa có trong chất chiết (Hoseini et al., 2021). Lá của cây giấm có chứa protein, chất béo, carbohydrate, chất xơ, tro, canxi, phot-pho, sắt, thiamine, B-caroten, riboflavin, niacin và axit ascorbic (Mahadevan et al., 2009), một trong các chất này có tác dụng kháng khuẩn, kích thích tăng trưởng và tăng cường miễn dịch.



**Hình 2. Chiều dài và khối lượng của tôm nuôi với thức ăn có bổ sung chất chiết lá cây giấm ở các nồng độ khác nhau**

Ghi chú: Ở cùng một thời điểm thu mẫu, các số liệu có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3. Chất chiết lá cây giấm có tác động lên chỉ tiêu huyết học của tôm

Ở thời điểm bắt đầu thí nghiệm, thông số huyết học giữa các nghiệm thức là tương đương với nhau

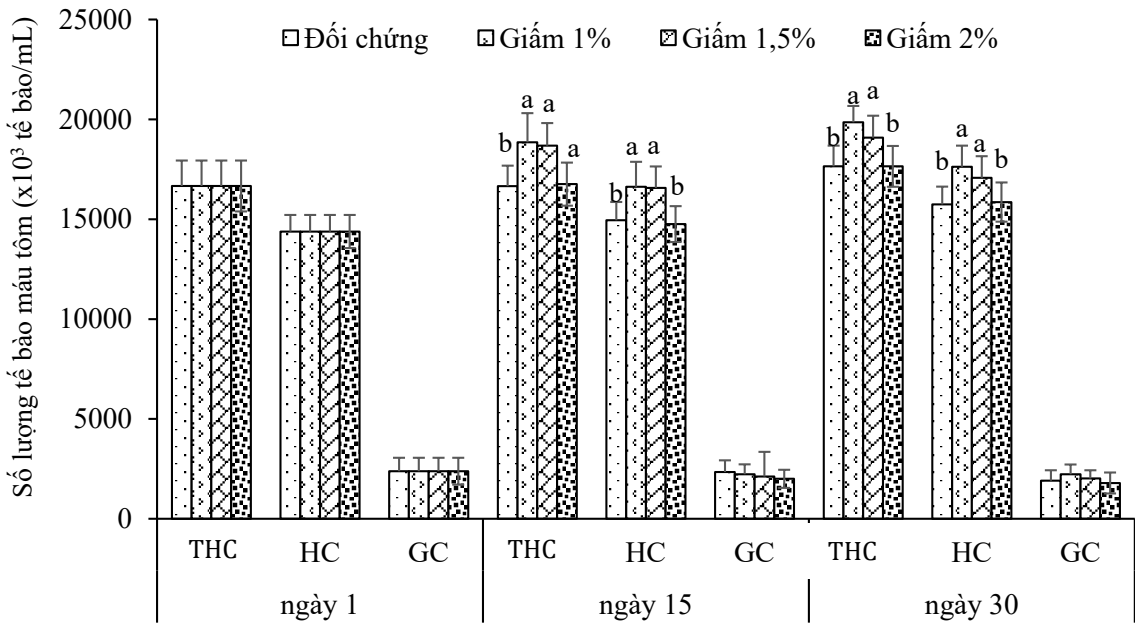
( $p > 0,05$ ). Ở ngày thứ 15, lượng bạch cầu có hạt (GC) của tôm ở tất cả nghiệm thức đều tương đương. Tuy nhiên, bạch cầu không hạt (HC) của tôm thẻ chân trắng được cho ăn bổ sung 1% và 1,5% chất

chiết lá giấm đạt hơn 16 triệu tế bào/mL, cao hơn nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết và đối chứng với chỉ hơn 14 triệu tế bào/mL ( $p < 0,05$ ). Theo đó, mật số tổng tế bào máu (THC) ở 2 nghiệm thức bổ sung 1% và 1,5% chất chiết đạt hơn 18 triệu tế bào/mL cao hơn so với nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết và đối chứng với chỉ hơn 16 triệu tế bào/mL.

Ở ngày thứ 30, GC của tôm ở tất cả nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nhau và cũng không khác biệt có ý nghĩa thống kê với các ngày thu mẫu trước đó (ngày 1 và ngày 15). HC của tôm ở nghiệm thức bổ sung 1% và 1,5% chất chiết lá giấm tăng đến hơn 17 triệu tế bào/mL khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bổ sung 2% dịch chiết lá giấm và nghiệm thức đối chứng, chỉ với hơn 15 triệu tế bào/mL ( $p < 0,05$ ). Giá trị THC cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1% với gần 20 triệu tế bào/mL, kế đến là chất chiết lá giấm 1,5% với 19 triệu tế bào/mL, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bổ sung 2% dịch chiết lá giấm và nghiệm thức đối chứng, chỉ với hơn 17 triệu tế bào/mL ( $p < 0,05$ ). Kết quả thí nghiệm của nghiên

cứu này cho thấy dù lượng chất chiết được bổ sung là nhiều hơn nhưng ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết thì các thông số miễn dịch HC trên tôm đạt thấp hơn so với 2 nghiệm thức bổ sung còn lại (1% và 1,5%). Kết quả này có phần phù hợp với nhận định của Reverter et al. (2017), quá trình tác dụng của chất chiết thảo dược đến phản ứng miễn dịch, tăng cường bảo vệ vật chủ chống lại tác nhân gây bệnh là phụ thuộc vào liều lượng chất chiết thảo dược và thời gian mà vật chủ tiếp xúc với chất chiết thảo dược đó.

Kết quả nghiên cứu này đã đóng góp vào danh mục các loài thực vật (thảo dược) phổ biến có khả năng kháng khuẩn, cải thiện tăng trưởng đối với tôm thẻ chân trắng. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu tiếp theo về tác động của chất chiết lá cây giấm lên tôm nuôi trong điều kiện môi trường bất lợi (stress, tấn công của mầm bệnh,...) với nhíp cho ăn khác nhau để thấy được tiềm năng của lá cây giấm trong nuôi tôm nói riêng và trong ngành thủy sản nói chung.



Ngày thí nghiệm

**Hình 3. Chỉ tiêu huyết học của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) được nuôi với thức ăn có bổ sung chất chiết lá cây giấm**

**4. KẾT LUẬN**

Chất chiết lá cây giấm sử dụng dung môi methanol có hoạt tính kháng khuẩn cao (đường kính vòng vô khuẩn trung bình là 24 mm). Chất chiết này

có khả năng ức chế và tiêu diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (MIC là 0,02 mg/mL, MBC là 0,08 mg/mL).

Khi bổ sung 1%, 1,5% và 2% chất chiết lá cây giấm vào thức ăn, tôm thẻ chân trắng có sự tăng



trường về chiều dài và khối lượng nhiều hơn so với tôm không được bổ sung sau 30 ngày cho ăn liên tục. Đồng thời, liều lượng 1 và 1,5% có hiệu quả trong việc cho nâng cao đáp ứng miễn dịch của tôm, thể hiện qua sự gia tăng số lượng bạch cầu không hạt (HC).

Chất chiết lá cây giấm có tiềm năng lớn được sử dụng với vai trò là chất diệt khuẩn đối với *V. parahaemolyticus*. Đồng thời, chất này thích hợp là chất bổ sung vào thức ăn giúp cải thiện tăng trưởng, tăng cường miễn dịch của tôm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abass, A. A., Al-Magsoosi, M. J. N., Kadhim, W. A., Mustafa, R., Aljdaimi, A. I., Al-Nasrawi, S. J., Hadi, N. R., & Haider, J. (2022). Antimicrobial effect of Red Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*) against different types of oral bacteria. *Journal of Medicine and Life*, 15(1), 89. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0184>.
- Abdallah, E. M. (2016). Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(2), 186. <https://doi.org/10.5455/jice.20160320022623>.
- Ahn, K. (2017). The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Reports*, 50(3), 111–116. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.3.221>.
- Alaga, T. O., Edema, M. O., Atayese, A. O., & Bankole, M. O. (2014). Phytochemical and in vitro anti-bacterial properties of Hibiscus sabdariffa L (Roselle) juice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(7), 339-344. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.1139>.
- Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 67, 40-54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.034>.
- Bindhu, F., Velmurugan, S., Donio, M. B. S., Michaelbabu, M., & Citarasu, T. (2014). Influence of *Agathi grandiflora* active principles inhibit viral multiplication and stimulate immune system in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against white spot syndrome virus infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 41, 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.034>.
- Bulfon, C., Volpatti, D., & Galeotti, M. (2015). Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquacul Res*, 46, 513–551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>.
- Canillac, N., & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261-268. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0397>.
- Chakraborty, S. B., & Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3(3), 103-119. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>
- Citarasu, T., (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>.
- Cornick, J. W., & Stewart, J. E. (1978). Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: Classification, differential counts, and associated agglutinin activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 31, 194-203. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(78\)90008-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90008-3).
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P., & Flegel, T. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 158 -162. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002>.
- Ghosh, A. K., Panda, S. K., & Luyten, W. (2021). Anti-vibrio and immune-enhancing activity of medicinal plants in shrimp: A comprehensive review. *Fish and Shellfish Immunology*, 117, 192-210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.006>
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1-4), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>.
- Hoa, T. T. T., Hằng, B. T. B., Huyền, H. M., Duyên, T. T. M., & Tuấn, N. T. (2020). Hoạt tính kháng khuẩn của một số chất chiết thảo dược kháng *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi* gây bệnh ở tôm biển. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(CĐ Thủy sản), 170-178.
- Hoseini, S. M., Hoseinifar, S. H., & Hien, V. D. (2021). Growth performance and hematological and antioxidant characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets supplemented with Roselle, *Hibiscus sabdariffa*. *Aquaculture*, 530, 735827.

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848620319384>.
- Huyền, H. M., Hải, T. N., & Hoa, T. T. T. (2020). Ảnh hưởng của chất chiết thảo dược lên tăng trưởng, miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) với *Vibrio parahaemolyticus*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(5), 150-159.
- Huyền, H. M., Huy, V. T., & Hoa, T. T. T. (2023). Tác động của cao chiết thầu dầu (*Ricinus communis* L.) đến sự sống, tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 228(13), 73–81. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8250>
- Immanuel, G., Vincylbai, V. C., Sivaram, V., Palavesam, A., & Marian, M. P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.033>.
- Kaleo, I. V., Gao, Q., Liu, B., Sun, C., Zhou, Q., Zhang, H., Shan, F., Xiong, Z., Bo, L., & Song, C. (2019). Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on growth performance, physiological and immune response, and related immune gene expression of *Macrobrachium rosenbergii* with *Vibrio anguillarum* and ammonia stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 603-613. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.039>.
- Kongchum, P., Suphavadee, C., Nantanat, C., & Papimon, S. (2016). Effect of Green Tea Extract on *Vibrio Parahaemolyticus* Inhibition in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Postlarvae. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 11, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.020>.
- Lade, S., Burle, S., Kosalge, S. B., & Bansode, M. N. (2022). Antimicrobial and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa*. Linn (roselle). *International Journal of Pharmacy Research and Technology*, 12(1), 22-27. <https://doi.org/10.31838/ijprt/12.01.04>.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., & VanWormhoudt, A. (1997). Adaptation of trypsin, chymotrypsin and a-amylase to casein level & protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208, 107-125.
- Lee, C., Jeon, H. J., Kim, B. K., Choi, S. K., Kim, S., Jang, G. I., & Han, J. E. (2022). Infectivity and Transmissibility of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Associated *Vibrio parahaemolyticus* in Frozen Shrimp Archived at  $-80^{\circ}\text{C}$ . *Fishes*, 7(3), 125. <https://doi.org/10.3390/fishes7030125>.
- Linh, N. T. T., Ai, T. N., To, T. T. H., Tuu, N. T., Huong, H. K., Long, P. K., Giang, H. T., Phu, T. Q., & Tinh, N. T. N. (2019). Selection of lactic acid bacteria (LAB) antagonizing *Vibrio parahaemolyticus*: The pathogen of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei*). *Biology*, 8, 91. <https://doi.org/10.3390/biology8040091>
- Lợi, Đ.T. (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Thời đại, Hà Nội.
- Lorian, V. (1995). Antibiotics in laboratory medicine. In: Acar, J. F., & Goldstein, F.W. (Eds.). *Disk susceptibility test*, Fourth Edition. London: Williams & Walkins Awwerly (pp.1).
- Mahadevan, N., & Kamboj, P. (2009). Hibiscus sabdariffa Linn.—an overview. *Natural Product Radiance*, 8(1), 77-83.
- Najiah, K. L., Lee, H., Noorasikin, M., Nadirah, S., & Lee, W. (2011). Phenotypic and genotypic characteristics of Mycobacterium isolates from fighting fish *Betta* spp. in Malaysia. *Research in Veterinary Science*, 91, 342-345. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.010>.
- Nguyen, H. T., Dang, L., Nguyen, H. T., Hoang, H., Lai, H. T. N., & Nguyen, H. T. T. (2018). Screening antibacterial effects of Vietnamese plant extracts against pathogens caused acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimps. *Screening*, 11(5), 77-83. <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.23618>
- OIE (World Organization for Animal Health). (2009). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. World Organization for Animal Health, Paris. <https://www.woah.org/en/produit/manual-of-diagnostic-tests-for-aquatic-animals-2021/>.
- OIE-World Organisation for Animal Health. (2019). *Acute hepaatopancreatic necrosis disease*. <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v132/n3/p241-247>.
- Olaleye, M. T. (2007). Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of Hibiscus sabdariffa. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(1), 9-13.
- Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Technology*, 39, 59-965. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.06.015>.
- Phụng, N. K. P. (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Shanthi, R., & Poongodi, R. (2014). Influence

- of medicinal herbs (*Alteranthera sessilis*, *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth and biochemical parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture international*, 22(2), 551-572.  
<https://doi.org/10.1007/s10499-013-9666-1>.
- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajana, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Reyes Munoz, A. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis* clade. *Scientific Reports Articles*, 8,13080.
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sasal, P., & Saulnier, D. (2017). Use of medicinal plants in aquaculture. In: Austin B. & Newaj-Fyzul A. (Ed), *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*, 223-261.  
<https://doi.org/10.1002/9781119152125.ch9>.
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sarter, S., Sasal, P., & Caruso, D. (2021). Moving towards more sustainable aquaculture practices: a meta-analysis on the potential of plant-enriched diets to improve fish growth, immunity and disease resistance. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 537-555.  
<https://doi.org/10.1111/raq.12485>.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR Detection of Binary, Pir-Like Toxins from *Vibrio parahaemolyticus* Isolates that Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp. *PLoS One*. 10(5), 1-16.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>.
- Syahidah, A., Saad, C. R., Daud, H. M., & Abdelhadi, Y. M. (2015). Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(1), 27-44.
- Takaoka, O., Ji, S. C., Ishimaru K., Lee, S. W., Jeong, G. S., Ito, J., Biswas, A., & Takii, K. (2011). Effect of rotifer enrichment with herbal extracts on growth and resistance of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck and Schlegel) larvae against *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture Research*, 42, 1824–1829.  
[doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02783.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02783.x).
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 45–55. [https://doi: 10.3354/dao02621](https://doi.org/10.3354/dao02621).
- Venkatramalingam, K., Christopher, J. G., & Citarasu, T. (2007). Zingiber officinalis an herbal appetizer in the tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius) larviculture. *Aquaculture Nutrition*, 13(6), 439-443.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00495.x>