

DOI:10.22144/ctujos.2025.041

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY ĐẾN KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN *Escherichia coli* CỦA DỊCH CHIẾT TỎI LÝ SƠN (*Allium sativum* L.)

Nguyễn Thị Kim Hương^{1,2}, Phan Khắc Duy^{1,2}, Nguyễn Khởi Nghĩa³, Bùi Thị Lê Minh³, Hồ Nguyễn Quang Minh³, Nguyễn Quốc Châu Thanh⁴ và Đặng Huỳnh Giao^{1,2*}

¹Trường Bách Khoa, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

²Phòng thí nghiệm Ứng dụng kỹ thuật Hóa học (5.18 RLC), Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

³Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

⁴Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): dhgiao@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 14/08/2024

Sửa bài (Revised): 03/09/2024

Duyệt đăng (Accepted): 22/11/2024

Title: Research on extraction and investigation of antibacterial activity of Ly Son garlic extract (*Allium sativum* L.)

Author(s): Nguyen Thi Kim Huong^{1,2}, Phan Khắc Duy^{1,2}, Nguyen Khoi Nghia³, Bui Thi Le Minh³, Ho Nguyen Quang Minh³, Nguyen Quoc Chau Thanh⁴ and Dang Huynh Giao^{1,2*}

Affiliation(s): ¹College of Engineering, Can Tho University, Viet Nam; ²Applied Chemical Engineering Lab (5.18 RLC), Can Tho University, Viet Nam; ³College of Agriculture, Can Tho University, Viet Nam; ⁴College of Natural Sciences, Can Tho University, Can Tho, Viet Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm nghiên cứu sự ảnh hưởng của điều kiện trích ly đến khả năng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *Escherichia coli* (*E.coli*) của dịch chiết tỏi Lý Sơn (*Allium sativum* L.). Kết quả cho thấy điều kiện tốt nhất để chiết xuất các hoạt chất diallyl disulfide và trisulfide trong tỏi Lý Sơn là khi được ngâm dầm trong dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) với tỷ lệ giữa khối lượng củ tỏi và thể tích dung môi là 20 mg/ml, được chiết xuất trong 2 giờ ở 30°C và chỉ chiết 1 lần, sóng siêu âm không có tác dụng hỗ trợ tăng hoạt tính sinh học của dịch chiết. Dịch chiết tối ưu có nồng độ ức chế tối thiểu đối với *E.coli* là 2,5 mg/ml. Những kết quả này đã khẳng định hiệu quả kháng *E.coli* của dịch chiết tỏi Lý Sơn được chiết xuất ở điều kiện tối ưu.

Từ khóa: Dịch chiết tỏi, *Escherichia coli*, hoạt tính kháng khuẩn, trích ly

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the influence of extraction conditions on the antibacterial ability of Ly Son garlic extract (*Allium sativum* L.) against *Escherichia coli* (*E.coli*). The results showed that the best condition to extract diallyl disulfide and trisulfide in Ly Son garlic was soaking in a solvent of distilled water:ethanol (1:1, v/v) with the ratio between dry weight of garlic and volume of solvent was 20 mg/ml, extracted for 2 hours at 30°C and extracted only once, ultrasound waves have no effect in enhancing the biological activity of the extract. The optimal extract had a minimum inhibitory concentration against *E.coli* of 2.5 mg/ml. These results confirmed the anti-*E.coli* effect of Ly Son garlic extract extracted under optimal conditions.

Keywords: Antibacterial activity, *Escherichia coli*, extraction, garlic extract

1. GIỚI THIỆU

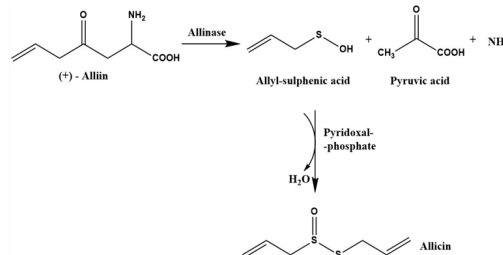
Trong thời gian gần đây, việc thảo dược được sử dụng trong phòng trị bệnh đặc biệt là những bệnh nhiễm khuẩn đang ngày càng trở nên phổ biến. Phương pháp này có nhiều ưu điểm như nguyên liệu dễ tìm kiếm, giá thành thấp, chứa nhiều chất có hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng stress (Pongsak & Parichat, 2008; Suman et al., 2023). Bên cạnh đó, Việt Nam lại có một hệ thực vật hết sức phong phú về chủng loại và phân loài. Trong suốt chiều dài lịch sử, nhiều nền văn hóa đã nhận ra tỏi có rất nhiều tiềm năng, có thể sử dụng để ngăn ngừa và điều trị các bệnh khác nhau. Kết quả trong các nghiên cứu gần đây đã chứng minh tác dụng của tỏi và chiết xuất của nó trong nhiều ứng dụng trong đời sống. Ở những nghiên cứu này, chiết xuất từ củ tỏi giúp tăng khả năng miễn dịch đồng thời tăng cường khả năng phục hồi bệnh (Bayan et al., 2014; Susan, 2015).

Alliin là một hợp chất lưu huỳnh có oxy, được đặt tên theo cây tỏi (*Allium sativum* L.), đã được phân lập về mặt hóa học vào những năm 1940 (Nguyen et al., 2013). Nó có tác dụng kháng khuẩn, kháng virus, nấm và ký sinh trùng (Londhe et al., 2011). Alliin là một trong hơn 30 hợp chất lưu huỳnh được tìm thấy trong tỏi và có tên hóa học là *S*-prop-2-en-1-yl prop-2-ene-1-sulfinothioate (Marchese et al., 2016; Borlinghaus et al., 2021).

Theo kết quả nghiên cứu của Anna et al. (2016), alliin là một loại dầu không màu, có độ hòa tan trong nước thấp và đặc biệt không có trong tép tỏi nguyên vẹn, nhưng được sản xuất tự nhiên cùng với pyruvate và amoniac từ tiền chất alliin ((*S*)-allyl-L-cysteine sulfoxide) thông qua hoạt động của alliinase (alliin lyase, EC 4.4.1.4, một enzyme lyase nội sinh loại bỏ α,β khỏi *Allium* spp.), khi tép tỏi được nghiền nát hoặc ngâm. Hai phân tử allylsulfenic acid ngưng tụ một cách tự nhiên, bằng cách loại bỏ nước trở thành một phân tử alliin (Zaini et al., 2022). Tuy nhiên, do tính chất hóa học không ổn định (Guan, 2018) alliin dễ bị phân hủy thành các hợp chất organosulfur khác như diallyl sulfide, diallyl disulfide và ajones (Lee et al., 2013) (Hình 1).

Gần đây, có nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các chiết xuất từ tỏi có nhiều ứng dụng trong đời sống. Những nghiên cứu này cho thấy chiết xuất tỏi giúp tăng cường khả năng phục hồi bệnh (Bayan et al., 2014), nhưng hầu hết ở các nghiên cứu này dung môi độc hại đều được sử dụng như chloroform và methanol để chiết xuất (Jang et al., 2017). Việc

sử dụng dung môi độc hại để chiết xuất gây ảnh hưởng đến sức khỏe, gây hại cho môi trường đồng thời còn hạn chế khả năng ứng dụng dịch chiết tỏi vào các mục đích phục vụ đời sống của con người. Vì vậy, việc nghiên cứu được thực hiện nhằm thay thế dung môi độc hại bằng dung môi an toàn trong nghiên cứu và ứng dụng ở quy mô công nghiệp là cần thiết về mặt khoa học lẫn ứng dụng thực tiễn.



Hình 1. Sơ đồ chuyển hóa Alliin thành Alliin (Dixit et al., 2015)

Trong số các loại tỏi được trồng tại nhiều vùng khác nhau ở Việt Nam, tỏi Lý Sơn (*Allium sativum* L.) được biết đến là một loại nông sản nổi tiếng, nó không những có giá trị cao về mặt kinh tế, mà còn là sản phẩm hàng hoá đặc thù của tỉnh Quảng Ngãi do tỏi trồng ở vùng này có hương vị khác biệt với các loại tỏi khác và được rất nhiều người biết đến. Với mong muốn khai thác tiềm năng ứng dụng của tỏi Lý Sơn bằng cách chiết xuất được các hợp chất từ tỏi phục vụ ứng dụng trong dược phẩm. Trong nghiên cứu này, điều kiện thích hợp để chiết xuất hoạt chất có hoạt tính kháng khuẩn từ củ tỏi đã được xác định bằng phương pháp ngâm dầm, sử dụng dung môi nước và ethanol để chiết xuất ở điều kiện thường và áp suất khí quyển trong vòng 2 giờ. Phương pháp được xây dựng dựa trên nghiên cứu trước đó của Wanyika et al. (2011) về trích ly alliin có trong củ tỏi bằng phương pháp ngâm dầm và đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch trích bằng phương pháp nồng độ pha loãng kết hợp với phân tích sắc ký khí ghép khối phổ (GC/MS) để tìm ra điều kiện chiết xuất tối ưu. Bên cạnh đó, việc kết hợp quy trình ngâm dầm với sự trợ giúp của sóng siêu âm nhằm mục đích tăng hiệu suất của quá trình chiết xuất cũng được nghiên cứu.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và thiết bị

Hóa chất phân tích: nước cất, ethanol (C₂H₅OH, 99,5%, GHTech, Trung Quốc), sodium chloride (NaCl, 99,5%, (Xilong Scientific, Trung Quốc), *n*-hexane (H₃C(CH₂)₄CH₃, ≥ 95%, J.T.Baker), sodium sulfate (Na₂SO₄, Merck, Đức), bông thủy tinh thí nghiệm (Assistant, Đức), glycerol (C₃H₅(OH)₃

Merck, Đức), nutrient agar (NA) (Merck, Đức), nutrient broth (NB) (Merck, Đức), eosin methylene blue (EMB) (Merck, Đức).

Dụng cụ được dùng để xử lý mẫu dịch trích tòi phân tích GC/MS bao gồm: pipet thủy tinh, hủ bi, gòn thủy tinh, Na₂SO₄, phễu thủy tinh. Tất cả dụng cụ đều được sấy ở 250°C trong 2 tiếng.

Tỏi Lý Sơn được mua tại siêu thị Metro, phường Hưng Lợi, quận Ninh Kiều, Thành Phố Cần Thơ.



Hình 2. Củ tỏi Lý Sơn

Vi sinh vật *Escherichia coli* số hiệu ATCC®25922 được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Dược lý ATL 4-26, khoa Thú y, Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

Hệ thống sắc ký khí – quang phổ khối (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy – GC/MS) của hãng Shimadzu GCMS-QP2020 (Nhật Bản) được đặt tại phòng Hóa học Đất – khoa Khoa học Đất, được dùng để phân tích sự hiện diện của các hoạt chất có tính kháng khuẩn, phòng bệnh trong dung dịch trích tòi bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ.

2.2. Phương pháp tiến hành

2.2.1. Chuẩn bị mẫu

Tỏi sau khi được thu mua về được tách riêng từng tép, lột vỏ, loại bỏ tép hỏng. Nguyên liệu chưa sử dụng được đựng trong túi nylon, lưu trữ ở nơi khô ráo, thoáng mát.

2.2.2. Xác định hàm lượng vật chất khô có trong tòi

Hàm lượng vật chất khô của nguyên liệu trước khi thực hiện thí nghiệm được xác định bởi tủ nung Binder (ED115, Đức) theo quy trình được tham khảo từ nghiên cứu của Nguyen and Luu (2013). Tỏi được rửa sạch và để cho ráo nước, cắt nhuyễn và cân lấy 5 gam (W), cho lượng tỏi vừa cân vào các cốc đã chuẩn bị trước và ghi nhận lại khối lượng tương ứng với từng cốc đã đánh số (thực hiện 3 cốc xác

định vật chất khô). Sau đó, các cốc được sấy ở nhiệt độ 105°C đến khi khối lượng không đổi. Hàm lượng vật chất khô trong tòi được xác định bởi công thức:

$$\% \text{ Vật chất khô (DM)} = \frac{P2 - P1}{W} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó:

P1: Trọng lượng cốc (g),

P2: Trọng lượng cốc và mẫu sau khi sấy (g),

W: Trọng lượng tỏi tươi ban đầu (g).

2.2.3. Pha chế môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Khi tiến hành pha chế, 13 gam bột Nutrient Broth được cân và cho vào 1 lít nước cất, trộn và hòa tan hoàn toàn hỗn hợp. Dung dịch đã hòa tan được cho vào bình thủy tinh, sau đó đem bình chứa hỗn hợp trên đi khử trùng bằng cách hấp ở 121°C trong 15 phút (Adrian, 2019).

2.2.4. Xử lý mẫu dịch trích đo GC/MS

Dịch chiết và dung môi *n*-hexane được rút mỗi loại 5 mL và cho vào hủ bi. Vortex hủ bi trong 1 phút để dịch trích tỏi và dung môi được trộn đều vào nhau. Hỗn hợp dịch trích tỏi và dung môi được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và áp suất khí quyển. Nhồi cột lọc bằng cách cho gòn thủy tinh và Na₂SO₄ vào pipet thủy tinh (nhồi đến khoảng 2/3 pipet thủy tinh). Ống được đặt lên giá đỡ, ống hút được dùng để hút lớp dịch phía trên sau ly tâm cho vào pipet thủy tinh. Cho dịch trích chảy qua hết pipet thủy tinh để thu được dịch lọc. Cuối cùng, 1 mL dịch trích đã lọc được rút và cho vào vial để phân tích hàm lượng các hoạt chất có trong dịch trích bằng máy GC/MS (Mastovska & Lehotay, 2006). Các thông số của phương pháp định tính các chất có trong dịch trích tỏi trên máy GC/MS được trang bị đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID) như sau: nhiệt độ cột ở 50°C, tốc độ dòng không khí và H₂ là 350 và 50 mL/phút, tốc độ dòng khí mang nitơ (N₂) đặt ở mức 1,0 mL/phút. Nhiệt độ công phun và máy dò được đặt ở nhiệt độ 180°C. Nhiệt độ cột được đặt ở 50°C trong 3 phút; tăng lên 160°C với tốc độ 10°C/phút, giữ ở mức này trong 3 phút; tăng lên 230°C ở tốc độ 30°C/phút, giữ ở mức này trong 3 phút và cuối cùng tăng lên 300°C với tốc độ 15°C/phút, giữ ở mức này trong 5 phút. Thể tích tiêm là 1 µL (chế độ không chia dòng), sử dụng cột RTX-5MS (Chun et al., 2015).

2.2.5. Trích ly dịch chiết từ củ tỏi Lý Sơn

Mẫu tỏi tươi được lột vỏ và cho vào máy xay cầm tay xay nhuyễn với kích thước tòi sau xay khoảng 0,5 x 0,5 mm. Các hoạt chất có trong củ tòi

Lý Sơn được trích bằng quy trình ngâm dầm. Quy trình trích ly được tiến hành khảo sát các yếu tố ưu ảnh hưởng bao gồm: tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (rắn – lỏng), tỉ lệ dung môi ngâm trích, thời gian trích, nhiệt độ của dung môi, số lần trích và so sánh hiệu suất với quy trình có sự bổ sung của sóng siêu âm (Mathialagan et al., 2016). Tỉ lệ giữa nguyên liệu/dung môi (w/v) cho quá trình trích được khảo sát với 3 tỉ lệ là 15 mg/mL, 20 mg/mL và 100 mg/mL. Các giá trị khác được giữ cố định: dung môi nước cất đã được làm lạnh (nhiệt độ 5°C), thời gian ngâm 24 giờ, nhiệt độ của quá trình ngâm là 5°C, số lần trích là 1 lần. Sau đó, các yếu tố đã tối ưu được cố định và tiến hành khảo sát các yếu tố còn lại. Tỉ lệ dung môi được tiến hành khảo sát với các tỉ lệ lần lượt là nước cất, nước cất:ethanol (3:1, v/v), nước cất:ethanol (1:1, v/v), nước cất:ethanol (1:3, v/v) và ethanol 99,5%. Thời gian chiết được khảo sát ở 0,5; 1; 2; 4; 8 và 24 giờ. Nhiệt độ của quá trình chiết được khảo sát ở 5°C và 30°C. Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) và kết quả phân tích GC/MS được dùng để đánh giá điều kiện tối ưu cho quy trình ngâm trích.

2.2.6. Khảo sát số lần chiết

Sau khi đã khảo sát và cố định các yếu tố như chiết bằng phương pháp ngâm dầm trong dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) với tỷ lệ giữa khối lượng khô củ tỏi và thể tích dung môi là 20 mg/mL, được chiết xuất trong 2 giờ ở 30°C. Yếu tố số lần chiết trong nghiên cứu tiếp tục được khảo sát ở 1, 2 và 3 lần chiết theo quy trình như sau: mẫu chiết 1 lần được chiết ở các điều kiện cố định đã được nêu bên trên sau đó thu lấy dịch lọc bằng phương pháp lọc thường. Đối với mẫu chiết 2 lần, xác tỏi đã chiết 1 lần được ngâm với dung môi ở các điều kiện cố định như trên và thu lấy dịch lọc bằng phương pháp lọc thường. Tương tự đối với mẫu chiết 3 lần, xác tỏi sau khi chiết 2 lần được ngâm ở các điều kiện chiết xuất đã cố định và thu lấy dịch lọc bằng phương pháp lọc thường. Lượng dịch chiết thu được ở mẫu chiết 3 lần sẽ được đo để xác định thể tích cụ thể. Để đánh giá hiệu quả của số lần chiết khác nhau đối với dịch chiết từ củ tỏi, dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) được thêm vào ở các mẫu chiết 1 lần và 2 lần tương ứng để bằng với thể tích dịch chiết thu được ở mẫu chiết 3 lần và sau đó xác định hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E.coli* để đánh giá hiệu quả chiết xuất (Tran et al., 2021; Nguyen et al., 2021; Hoang et al., 2024).

2.2.7. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của mẫu dịch trích

Nồng độ ức chế tối thiểu của dịch trích tỏi được xác định bằng phương pháp pha loãng liên tiếp: dùng micropipette rút 1 mL dung dịch môi trường nuôi cấy cho vào các lọ từ thứ 2 đến 10. Rút 1 mL dịch trích cho vào lọ 1 và lọ 2. Sau đó, 1 mL dung dịch được rút từ lọ thứ 2 sang lọ thứ 3. Thực hiện thao tác tương tự cho đến lọ thứ 9, rút bỏ 1 mL dung dịch ở lọ 9. Dùng micropipette rút 0,1 mL huyền dịch vi khuẩn *E.coli* sinh men đề kháng kháng sinh (Extended spectrum beta-lactamase - ESBL) nồng độ 10^6 CFU/mL cho vào các lọ từ 1 đến 10, lắc đều và đóng nắp, sau đó đem ủ ở 37°C từ 16-24 giờ (Oonmetta-aree et al., 2006). Nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ dịch chiết thấp nhất có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn mà có thể nhìn thấy bằng mắt thường (lọ có dung dịch trong).

2.2.8. Trích ly với sự hỗ trợ của sóng siêu âm

Quy trình trích ly với sự hỗ trợ của sóng siêu âm được tham khảo từ nghiên cứu của Mathialagan et al. (2016):

Tỏi sau khi được xay nhuyễn được định mức với dung môi bằng bình định mức 100 mL với tỉ lệ giữa nguyên liệu khô tỏi/dung môi là 20 mg/mL sẽ được sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 35 KHz trong thời gian 90 phút ở 25°C, sau đó ly tâm ở nhiệt độ phòng trong 2 phút với vận tốc 3000 vòng/phút. Sau khi ly tâm, dịch được thu bằng cách lọc thường qua giấy lọc. Các mẫu dịch trích được giữ ở nhiệt độ phòng dùng để phân tích sự ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hoạt tính kháng khuẩn của mẫu dịch trích tỏi.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả hàm lượng vật chất khô

Kết quả xác định vật chất khô của tỏi Lý Sơn sau 3 lần lặp lần lượt là 34,0%; 33,6% và 34,2%. Như vậy, giá trị trung bình lượng vật chất khô có trong củ tỏi Lý Sơn sau 3 lần lặp là 33,94%, giá trị này thấp hơn hàm lượng vật chất khô có trong củ tỏi Hải Dương là 35,8% và trong củ tỏi Cô Đơn là 38,81% (Bui et al., 2023). Kết quả hàm lượng vật chất khô này sẽ được sử dụng để tính toán lượng tỏi tươi dùng cho các thí nghiệm khảo sát phía sau.

3.2. Khảo sát các yếu tố của quy trình trích ly ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết tỏi Lý Sơn

3.2.1. Khảo sát sự ảnh hưởng giữa tỉ lệ nguyên liệu tỏi khô và dung môi chiết xuất

Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là yếu tố ảnh hưởng đến khả năng trích ly. Lượng dung môi tối thiểu phải vừa ngập qua bề mặt của lớp nguyên liệu với khoảng lớn hơn 1 cm, khi đó các lớp nguyên liệu bên dưới mới có thể tiếp xúc hết được với dung môi (Tân, 2019). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng các tỉ lệ khảo sát khác nhau để khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch trích tỏi khi được trích xuất ở các tỉ lệ này.

Bảng 1. Khối lượng tỏi tương ứng với các tỉ lệ nguyên liệu khô tỏi/dung môi khác nhau

Tỉ lệ nguyên liệu khô tỏi/dung môi(mg/mL)	Khối lượng tỏi (g)
15	4,42
20	5,90
100	29,46

Từ khối lượng tỏi tương ứng với các tỉ lệ nguyên liệu khô tỏi/thể tích dung môi khác nhau đã tính được ở bảng 1, tiến hành trích ly theo quy trình trích ly dịch trích tỏi. Hiệu quả kháng khuẩn của các tỉ lệ khảo sát trên được đánh giá thông qua kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E.coli* trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi giữa các tỉ lệ nguyên liệu khô củ tỏi và dung môi chiết xuất khác nhau

Tỉ lệ nguyên liệu khô tỏi/dung môi(mg/mL)	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
15	15,0	15,0	15,0
20	10,0	10,0	10,0
100	12,5	12,5	12,5

Giá trị MIC thể hiện nồng độ thấp nhất của mẫu dịch trích ức chế sự phát triển của vi khuẩn có thể nhìn thấy được sau 18 – 24 giờ nuôi cấy. Do đó, giá trị MIC thể hiện giá trị càng thấp thì tại điều kiện trích xuất đó cho hiệu quả càng tối ưu (Bui & Ha, 2022).

Kết quả sau khi khảo sát cho thấy tỉ lệ giữa khối lượng khô củ tỏi và thể tích dung môi trích xuất 15 mg/mL cho giá trị MIC là 15 mg/mL, giá trị này giảm còn 10 mg/mL khi tỉ lệ nguyên liệu khô/dung môi là 20 mg/mL. Tuy nhiên, khi tỉ lệ này là 100

mg/mL thì giá trị MIC lại có xu hướng tăng lên. Việc tăng tỉ lệ nguyên liệu khô/dung môi qua tỉ lệ tối ưu không làm gia tăng thêm khả năng kháng khuẩn, điều này gây hao tổn dung môi và chi phí nhiên liệu. Kết quả này có thể là do khi tăng lượng dung môi tạo cơ hội cho các chất tan tiếp xúc tốt hơn, thúc đẩy một gradient nồng độ càng tăng, dẫn đến tốc độ khuếch tán cho phép quá trình trích ly chất rắn bằng dung môi được tốt hơn (Tran & Nguyen, 2014). Tuy nhiên, khi ngâm chiết với lượng dung môi quá nhiều, trong khi hàm lượng hoạt chất của nguyên liệu là một số cố định nên sẽ nhanh chóng dẫn đến sự cân bằng giữa các pha, làm hiệu quả trích ly không tăng (Dang, 2023). Do đó, tỉ lệ khối lượng khô tỏi và thể tích dung môi sử dụng trích xuất được chọn cố định cho các thí nghiệm về sau là 20 mg/mL.

3.2.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi khác nhau

Dung môi ngâm trích là một trong những yếu tố quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất trích ly. Việc sử dụng dung môi phù hợp giúp chiết xuất được nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học trong củ tỏi hơn (Nguyen, 2022). Hiệu quả của quá trình trích xuất các hoạt chất có tính kháng khuẩn trong dịch trích tỏi được đánh giá thông qua kết quả kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E.coli* và kết quả này được trình bày trong Bảng 3.

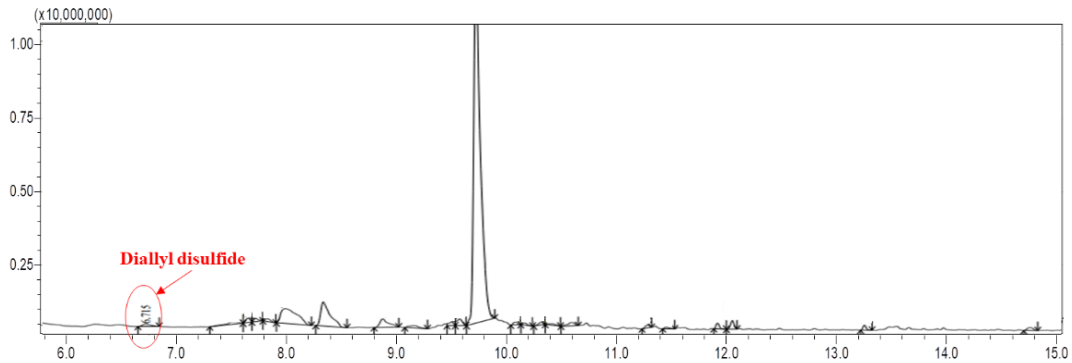
Bảng 3. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi được trích bằng các tỉ lệ dung môi khác nhau

Tỉ lệ dung môi	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
Nước cất	10,0	10,0	10,0
Nước cất:ethanol (3:1, v/v)	5,0	5,0	5,0
Nước cất:ethanol (1:1, v/v)	2,5	2,5	2,5
Nước cất:ethanol (1:3, v/v)	2,5	2,5	2,5
Ethanol 99,5%	2,5	2,5	1,25

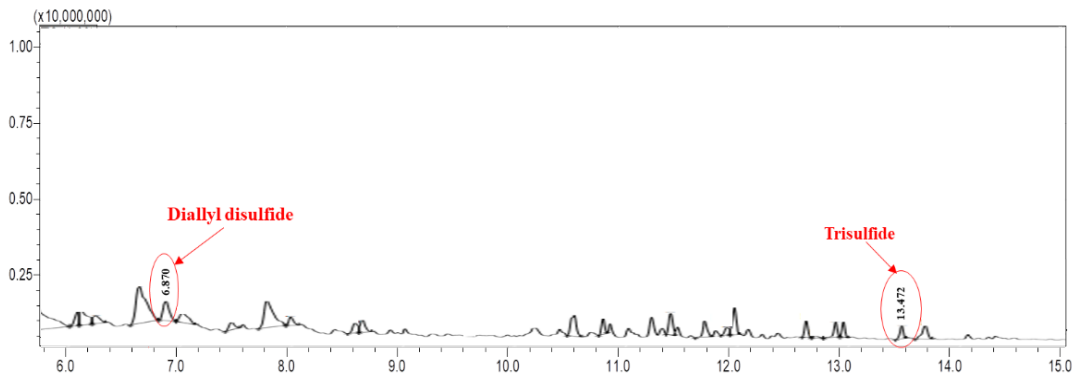
Kết quả sau khi khảo sát hoạt tính sinh học đối với vi khuẩn *E.coli* cho thấy các mẫu được trích bằng dung môi có bổ sung ethanol cho hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E.coli* cao hơn so với mẫu được trích hoàn toàn bằng nước cất. Trong các kết quả được trình bày ở Bảng 5, mẫu trích bằng dung môi ethanol 99,5% tuy cho giá trị MIC thấp nhất nhưng lại không ổn định. Do đó, cần phân tích các mẫu dịch trích tỏi trên bằng phương pháp GC/MS nhằm xác định thành phần và hàm lượng

các hoạt chất có trong mỗi mẫu dịch trích để lựa chọn tỉ lệ dung môi tối ưu. Các kết quả phân tích GC/MS của mẫu dịch trích được ngâm bằng các tỉ lệ dung môi khác nhau được trình bày từ Hình 3 đến

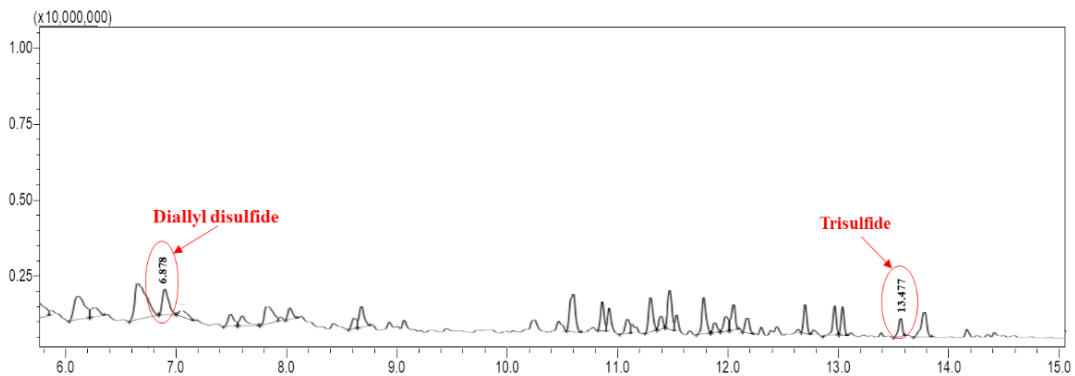
Hình 7, phổ khối lượng (MS - Mass Spectrum) của các hoạt chất phân tích được trong mẫu dịch chiết được trình bày từ Hình 8 đến Hình 9.



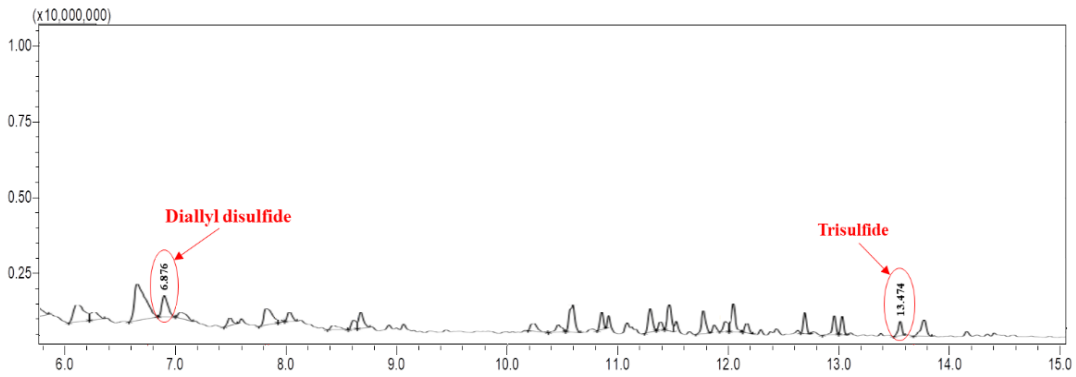
Hình 3. Sắc kí đồ của mẫu dịch trích tỏi Lý Sơn được trích bằng dung môi nước cất



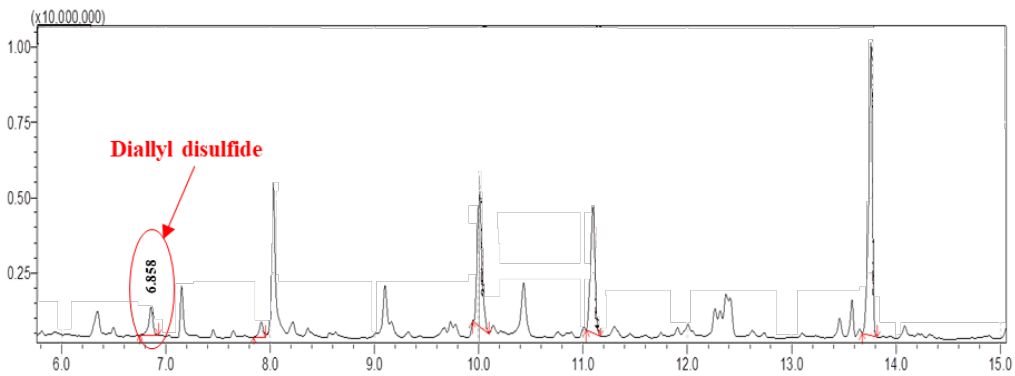
Hình 4. Sắc kí đồ của mẫu dịch trích tỏi Lý Sơn được trích bằng dung môi nước cất:ethanol (3:1, v/v)



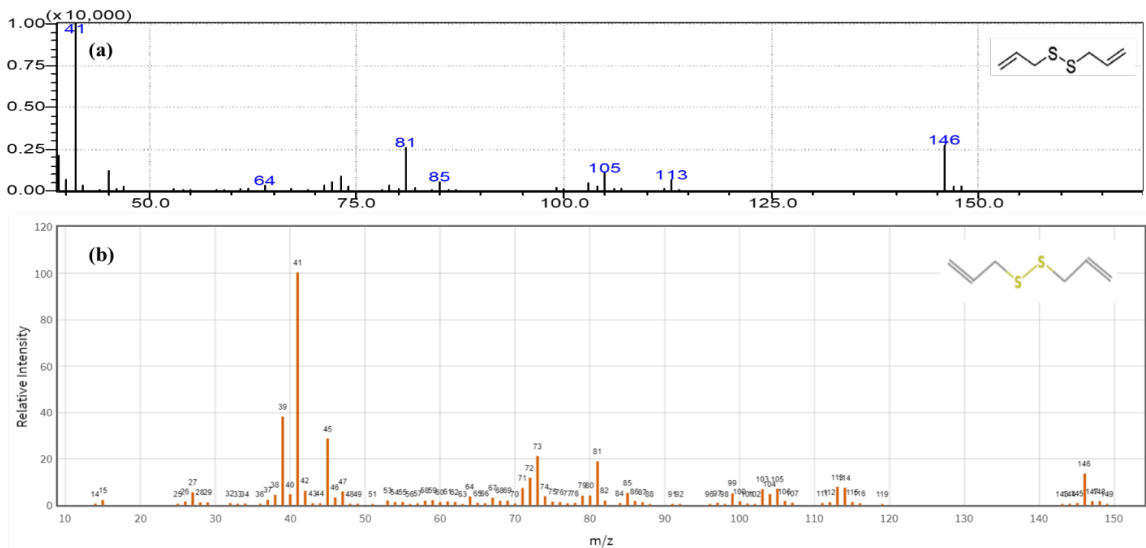
Hình 5. Sắc kí đồ của mẫu dịch trích tỏi Lý Sơn được trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v)



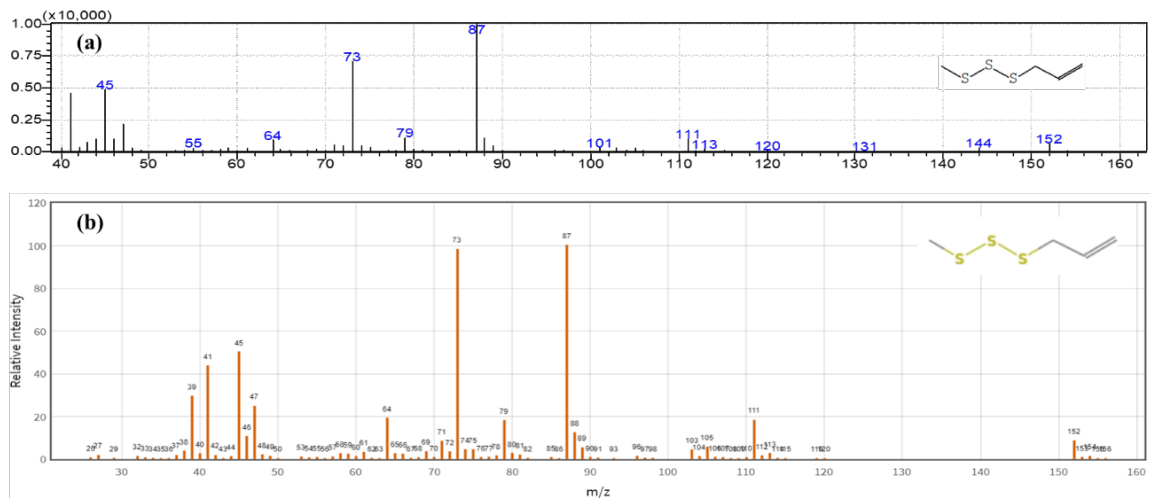
Hình 6. Sắc kí đồ của mẫu dịch trích tỏi Lý Sơn được trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:3, v/v)



Hình 7. Sắc kí đồ của mẫu dịch trích tỏi Lý Sơn được trích bằng dung môi ethanol 99,5%



Hình 8. Phổ khối lượng diallyl disulfide của: (a) mẫu phân tích và (b) tham khảo từ dữ liệu phổ khối lượng của Viện Tiêu chuẩn và Công nghệ Quốc gia Mỹ (U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America, 2023)



Hình 9. Phổ khối lượng trisulfide, methyl-2-propenyl của: (a) mẫu phân tích và (b) tham khảo từ dữ liệu phổ khối lượng của Viện Tiêu chuẩn và Công nghệ Quốc gia Mỹ (U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America, 2023)

Bảng 4. So sánh hàm lượng hoạt chất được trích xuất từ tỏi Lý Sơn với các tỉ lệ dung môi khác nhau (Yang et al., 2012; Kathryn et al., 2016; El-Fiki et al., 2020; Song et al., 2023)

Tỉ lệ dung môi	Tên chất	Diện tích peak	Thời gian lưu (phút)	Tài liệu tham khảo
Nước cất	Diallyl disulfide	407.040	6,715	Trong nghiên cứu này
Nước cất:ethanol (3:1, v/v)	Diallyl disulphide	2.339.384	6,870	Trong nghiên cứu này
	Trisulfide, methyl-2-propenyl	841.258	13,472	
Nước cất:ethanol (1:1, v/v)	Diallyl disulfide	3.118.937	6,876	Trong nghiên cứu này
	Trisulfide, methyl-2-propenyl	1.379.486	13,477	
Nước cất:ethanol (1:3, v/v)	Diallyl disulfide	2.441.977	6,876	Trong nghiên cứu này
	Trisulfide, methyl-2-propenyl	1.031.007	13,474	
Ethanol 99,5%	Diallyl disulfide	2.645.593	6,858	Trong nghiên cứu này
Methanol 99,9%	Diallyl disulfide	Không đề cập	6,270	<i>El-Fiki et al., 2020</i>
Ethanol 95%	Diallyl disulfide	258.134	6,770	<i>Yang et al., 2012</i>
Nước cất	Trisulfide, methyl-2-propenyl	Không đề cập	12,480	<i>Kathryn et al., 2016</i>
Nước cất	Trisulfide, methyl-2-propenyl	Không đề cập	13,3073	<i>Song et al., 2023</i>

Kết quả phân tích GC/MS cho thấy khi tăng nồng độ ethanol trong dung môi ngâm trích lên thì lượng hoạt chất disulfide và trisulfite trong dịch trích thu được cũng tăng lên so với mẫu được ngâm trích hoàn toàn bằng nước cất lạnh. Mẫu được trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) cho hàm lượng hoạt chất diallyl disulfide và trisulfide lớn nhất so với các mẫu được ngâm trích bằng các tỷ lệ dung môi còn lại.

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E. coli* và kết quả phân tích GC/MS cho

thấy tỉ lệ dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) được lựa chọn sử dụng làm dung môi trích ly.

3.2.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian ngâm

Bản thân dung môi ethanol đã có mang hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E. coli* vì khi dung môi ethanol sử dụng với nồng độ trên 20% thì dung dịch có tác dụng ức chế vi khuẩn và nấm phát triển (Nguyen, 2022). Do đó, kết quả MIC thể hiện khi trích xuất bằng dung môi môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) thể hiện chủ yếu là hoạt tính của ethanol. Tuy

nhiên, ngoài tác dụng đóng góp vào việc tăng hoạt tính kháng khuẩn, việc ethanol sử dụng làm dung môi trích xuất còn có tác dụng làm tăng hiệu quả trích xuất các hoạt chất có trong tỏi do allicin dễ dàng hòa tan trong ethanol (Jiang et al., 2020). Do đó, để làm rõ sự ảnh hưởng của các điều kiện trích xuất đối với hiệu quả trích xuất các hoạt chất có trong tỏi Lý Sơn và hoạt tính kháng khuẩn của dịch trích tỏi. Đối với các thí nghiệm khảo sát các điều kiện trích xuất còn lại, khảo sát song song được tiến hành giữa mẫu được trích bằng dung môi nước cất và dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v). Do dung môi nước cất không có tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E.coli* (Nguyen & Pham, 2022) nên sự thay đổi giá trị MIC sẽ được thể hiện rõ trên nên mẫu được trích bằng dung môi nước cất hơn so với mẫu được trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v). Tại các mốc khảo sát được ngâm trích bằng dung môi nước cất cho giá trị MIC tăng, các điều kiện trích xuất này sẽ được cố định. Mẫu được trích xuất ở điều kiện tối ưu sẽ được phân tích GC/MS để so sánh hàm lượng các hoạt chất có trong dịch trích tỏi.

Bảng 5. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi được trích bằng dung môi nước cất ngâm trích ở các thời gian khác nhau

Thời gian trích (giờ)	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
0,5	20,0	20,0	20,0
1	20,0	20,0	20,0
2	10,0	10,0	10,0
4	10,0	10,0	10,0
8	10,0	10,0	10,0

Bảng 6. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi được trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) ngâm trích ở các thời gian khác nhau

Thời gian trích (giờ)	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
0,5	2,5	2,5	2,5
1	2,5	2,5	2,5
2	2,5	2,5	2,5
4	2,5	2,5	2,5
8	2,5	2,5	2,5

Kết quả sau khi khảo sát hoạt tính sinh học đối với vi khuẩn *E.coli* cho thấy đối với dung môi nước cất ở thời gian ngâm trích là 2 giờ thì hoạt tính của mẫu dịch trích tăng và giá trị này ổn định ở các mốc thời gian 2, 4, 8 giờ. Giá trị MIC ở các mốc thời

gian này bằng với giá trị MIC khi ngâm trích bằng nước cất trong 24 giờ. Bên cạnh đó, mẫu được trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) cũng cho giá trị MIC thấp và ổn định ở các mốc thời gian khảo sát trên. Do đó, cố định thời gian ngâm của dịch trích ở 2 giờ.

3.2.4. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ ngâm trích

Các hợp chất có hoạt tính sinh học là các thông số chất lượng quan trọng trong tép tỏi. Việc trích xuất các hợp chất này bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, trong đó có nhiệt độ trích xuất (Bloem et al., 2011). Nhiệt độ tăng làm tăng khả năng hòa tan và khuếch tán của các hợp chất, giảm độ nhớt dung môi, tăng khả năng truyền khối và xâm nhập của dung môi vào trong tế bào. Allicin là thành phần chính quyết định mùi thơm và giá trị dược lý của tỏi nhưng lại rất kém bền dưới tác động của nhiệt độ (Mai et al., 2000). Việc tăng nhiệt độ chiết xuất vượt quá giới hạn nhất định sẽ làm biến tính và phân hủy các hợp chất mong muốn dẫn đến giảm hàm lượng hợp chất mục tiêu (Tran & Nguyen, 2014).

Do đó, việc khảo sát nhiệt độ ngâm đối với quá trình ngâm trích các hoạt chất có trong củ tỏi Lý Sơn được thực hiện là cần thiết để tối ưu quá trình ngâm trích. Trong nghiên cứu này, khảo sát hiệu quả trích ly dịch trích tỏi từ củ tỏi Lý Sơn được thực hiện ở nhiệt độ ngâm là 5°C và 30°C, các kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 7 và Bảng 8.

Bảng 7. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi được trích bằng dung môi nước cất ngâm ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ ngâm	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
5 °C	10,0	10,0	10,0
30 °C	10,0	10,0	10,0

Bảng 8. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi được trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) ngâm ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ ngâm	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
5 °C	2,5	2,5	2,5
30 °C	2,5	2,5	2,5

Kết quả sau khi khảo sát hoạt tính sinh học đối với vi khuẩn *E.coli* cho thấy đối với dung môi nước cất, ngâm trích ở nhiệt độ 5°C và 30°C thì giá trị MIC không thay đổi. Đối với dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) giá trị MIC cũng không thay

đôi ở hai mức nhiệt độ khảo sát. Vì vậy, để tiết kiệm chi phí và đơn giản thao tác cho quá trình trích xuất, ta cố định nhiệt độ ngâm khoảng 30°C.

3.2.5. Khảo sát sự ảnh hưởng giữa số lần trích

Số lần chiết xuất cũng ảnh hưởng lớn đến hàm lượng hoạt chất có trong tỏi. Chiết xuất là quá trình khuếch tán phân tử, chất cần chiết xuất hòa tan vào dung môi và khuếch tán ra khỏi tế bào. Khi chất tan đạt nồng độ cân bằng giữa trong và ngoài tế bào thì quá trình chiết kết thúc. Qua đó, việc khảo sát số lần chiết được thực hiện là rất cần thiết để đảm bảo nguyên liệu được chiết kiệt cũng như tiết kiệm được thời gian và chi phí (Phung & Phan, 2023). Nghiên cứu khảo sát hiệu quả trích ly dịch trích tỏi từ củ tỏi Lý Sơn được thực hiện ở số lần chiết lần lượt là 1 lần, 2 lần và 3 lần. Các kết quả khảo sát được thể hiện trong Bảng 9 và Bảng 10.

Bảng 9. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi trích bằng dung môi nước cất với số lần trích khác nhau

Số lần trích (lần)	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
1	10,0	10,0	10,0
2	20,0	20,0	20,0
3	20,0	20,0	20,0

Bảng 10. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) với số lần trích khác nhau

Số lần trích (lần)	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
1	2,5	2,5	2,5
2	2,5	2,5	2,5
3	2,5	2,5	2,5

Kết quả sau khi khảo sát hoạt tính sinh học đối với vi khuẩn *E.coli* cho thấy đối với mẫu được trích bằng dung môi nước cất, sau khi sang lần trích thứ 2, 3, thì hoạt tính của mẫu dịch trích giảm. Đối với dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) khi thay đổi số lần trích thì không làm tăng hoạt tính kháng khuẩn, kết quả này thể hiện qua giá trị MIC cũng không thay đổi. Do đó, số lần ngâm trích tối ưu được lựa chọn là 1 lần ngâm trích.

3.2.6. Khảo sát sự ảnh hưởng của việc kết hợp sóng siêu âm trong quy trình trích ly

Ngâm đơn giản là quá trình chiết xuất chậm. Để rút ngắn thời gian và tăng hiệu suất chiết, có nhiều biện pháp đặc biệt được áp dụng, trong đó phải kể

đến chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Công nghệ chiết bằng sóng siêu âm được đánh giá là thân thiện với môi trường do sử dụng dung môi là nước, ethanol, thời gian chiết ngắn, thường cho năng suất và độ ổn định cao hơn so với phương pháp chiết thông thường (Nguyen, 2022). Do đó, để đánh giá hiệu quả của việc kết hợp sóng siêu âm vào quy trình trích ly các hoạt chất có trong tỏi Lý Sơn, nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát hiệu quả kháng khuẩn đối với mẫu dịch trích có và không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Các kết quả khảo sát được thể hiện trong Bảng 11 và Bảng 12.

Bảng 11. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi bằng dung môi nước cất ngâm kết hợp siêu âm

Siêu âm	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
Có	10,0	10,0	10,0
Không	10,0	10,0	10,0

Bảng 12. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của các mẫu dịch trích tỏi bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) ngâm kết hợp siêu âm

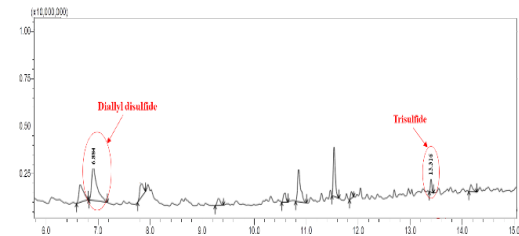
Siêu âm	MIC (mg/mL)		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
Có	2,5	2,5	2,5
Không	2,5	2,5	2,5

Kết quả sau khi khảo sát hoạt tính sinh học đối với vi khuẩn *E.coli* cho thấy đối với dung môi nước cất, có và không có siêu âm thì giá trị MIC không thay đổi. Còn đối với dung môi nước cất:ethanol (1:1 v/v) giá trị MIC cũng không thay đổi. Vì vậy, để đơn giản, quy trình trích ly dịch chiết tỏi Lý Sơn không kết hợp siêu âm. Đây là một điểm khác biệt so với nhiều nghiên cứu khác vì chiết siêu âm thường sẽ cho hiệu quả cao hơn. Tuy nhiên, kết quả trên tương đồng với nghiên cứu trước đó của (Nguyen et al., 2023) về trích xuất các hợp chất organosulfua thường xuất hiện nhiều trong chi *Allium*. Điều này cho thấy chiết siêu âm sẽ làm giảm hiệu quả chiết so với phương pháp chiết nóng. Kết quả trên có thể do chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm sẽ hình thành các bọt khí ở trong lòng chất lỏng là một tác nhân trung gian để nhận năng lượng và tập trung năng lượng của sóng siêu âm. Việc này giúp tác động đến thành tế bào giúp cho dung môi thâm nhập sâu vào nguyên liệu để giải phóng các vật chất bên trong một cách dễ dàng làm tăng hiệu quả chiết và rút ngắn thời gian chiết so với các phương pháp chiết truyền thống ở cùng nhiệt độ chiết. Tuy nhiên, nếu các bọt khí này hình thành quá nhiều hoặc

quá mạnh liệt thì có thể làm phân hủy hoạt chất làm ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của dịch chiết (Tran et al., 2018).

Như vậy, ở điều kiện tối ưu: tỉ lệ nguyên liệu khô tỏi/dung môi 20 mg/mL, trích bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v), được ngâm trong 2 giờ ở nhiệt độ khoảng 30°C và không bổ sung sóng siêu âm. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng *E.coli* của mẫu dịch trích tỏi Lý Sơn cho giá trị MIC là 2,5 mg/mL. Hoạt tính kháng *E.coli* của dịch trích tỏi Lý Sơn được trích xuất theo quy trình tối ưu trong nghiên cứu này cao hơn so với hoạt tính kháng *E.coli* của tỏi Lý Sơn trong nghiên cứu của (Bui et al., 2023) với giá trị MIC là 25 mg/mL.

Kết quả sắc ký GC/MS của mẫu dịch trích tỏi ở điều kiện tối ưu được trình bày ở Hình 10.



Hình 10. Sắc ký đồ của mẫu dịch trích tỏi được trích ở điều kiện tối ưu

Bảng 13. Hàm lượng các hoạt chất được trích xuất từ củ tỏi Lý Sơn ở điều kiện tối ưu

Tên chất	Diện tích peak	Thời gian lưu
Diallyl disulfide	12.905.720	6,884
Trisulfide, methyl-2-propenyl	1.469.744	13,316

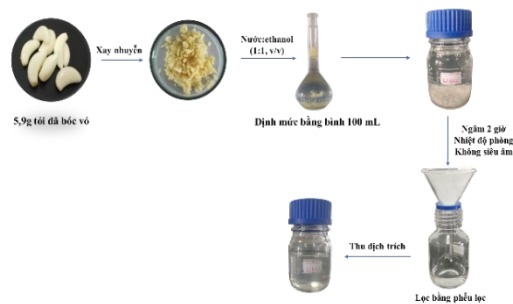
Kết quả phân tích GC/MS của mẫu dịch trích tỏi Lý Sơn được trích xuất ở điều kiện tối ưu: tỉ lệ khối lượng khô tỏi/dung môi là 20 mg/mL, trích ly bằng dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v), ngâm trong 2 giờ ở nhiệt độ khoảng 30°C và không bổ sung sự hỗ trợ của sóng siêu âm cho hàm lượng hoạt chất diallyl disulfide và trisulfide tăng so với mẫu được dịch trích tỏi được trích xuất bằng phương pháp trích xuất

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Adrian, H. (2019). *Nutrient Agar and Nutrient Broth: Composition, Preparation and Difference*. <https://labmal.com/2019/08/13/nutrient-agar-and-nutrient-broth/>

Anna, M., Ilkay, E. O., & Maria, D. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*,

được tham khảo từ nghiên cứu trước đó của Wanyika et al. (2011). Quy trình trích ly dịch trích tỏi Lý Sơn sau khi khảo sát các yếu tố được tóm tắt ở Hình 11.



Hình 11. Quy trình dịch chiết tỏi Lý Sơn tối ưu

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu, khảo sát đã được thực hiện và kết luận đã đưa ra được sự ảnh hưởng của các điều kiện trích ly đến khả năng kháng khuẩn *E.coli* của dịch chiết tỏi Lý Sơn thông qua phương thức ngâm trích. Kết quả của quá trình khảo sát cho thấy điều kiện tối ưu nhất cho quá trình trích ly dịch trích tỏi Lý Sơn là: nguyên liệu tỏi đã qua xử lý được ngâm trong dung môi nước cất:ethanol (1:1, v/v) với tỉ lệ nguyên liệu khô tỏi/dung môi là 20 mg/mL, chiết xuất trong 2 giờ 30°C và chỉ chiết 1 lần mà không bổ sung sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Các mẫu dịch trích được chứng minh là có khả năng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E.coli* thông qua giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Bên cạnh đó, các hoạt chất trong dịch trích tỏi đã được định tính bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC/MS) để chứng minh rằng có sự hiện diện của các hoạt chất có hoạt tính kháng khuẩn đến từ tỏi trong dịch trích. Từ đó cho thấy dịch trích từ tỏi Lý Sơn có giá trị kháng khuẩn tốt đối với vi khuẩn *E.coli* và quy trình trích xuất cũng đã trích xuất được các hoạt chất có giá trị ứng dụng cao từ củ tỏi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào Tạo, mã số B2023-TCT-17.

210, 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>

Anh, N. T. K., & Nhu, P. T. K. (2022). Antibacterial activity of nano berberine produced by grinding method against *E.coli* and *S.aureus*. *Journal of science and technology – Industrial University of Ho Chi Minh city*, 55(01),143-149 (in Vietnamese). <http://dx.doi.org/10.46242/jstih.v55i01.4267>

- Bayan, L., Koulivand, P. H., & Gorji, A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(1), 1-14. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25050296/>
- Bloem, E., Haneklaus, S., & Schnug, E. (2011). Storage life of field-grown garlic bulbs (*Allium sativum* L.) as influenced by nitrogen and sulfur fertilization. *J Agric Food Chem*, 59(9), 4442-4447. <https://doi.org/10.1021/jf104815f>
- Borlinghaus, J., Foerster, J., Kappler, U., Antelmann, H., Noll, U., Gruhlke, M. C., & Slusarenko, A. J. (2021). Allicin, the odor of freshly crushed garlic: A review of recent progress in understanding allicin's effects on cells. *Molecules*, 26(6), 1505. <https://doi.org/10.3390/molecules26061505>
- Chakraborty, B., Horn, P., & Csaba, H. (2023). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6(05), 1-19. <https://doi.org/10.1111/raq.12021>
- Dung, N. N. X., & Manh, L. H. (2013). *Textbook of animal nutrition diseases*. Can Tho University Publishing House (in Vietnamese).
- Du, G. H., Zhou, W., & Liu, A. L. (2018). *Allicin, Natural Small Molecule Drugs from Plants* (pp. 569- 573) . People's Medical Publishing House <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciadv.aap9096>
- Dixit, V., Chaudhary, B. R. (2015). Colchicine- induced tetraploidy in garlic (*Allium sativum* L.) and its effect on allicin concentration. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 89 (5), 585-591. <http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2014.11513124>
- Dai, N. V., Tu, N. T. N., Bao, M. N., Mai, N. H. T., & Trang, N. T. K. (2013). *Allicin is the natural antioxidant in garlic* (Master's thesis). Ho Chi Minh City Open University (in Vietnamese).
- El-Fiki, A., & Adly, M. (2020). Morphological, molecular, and organosulphur compounds characterization in irradiated garlic (*Allium sativum*) by GC–MS and SCoT markers. *Journal of radiation research and applied sciences*, 13(01), 61-70. <https://doi.org/10.1080/16878507.2019.1697079>
- Hai, T. H., Ngan, N. T. T., Chi, H. T., Thuong, N. T. L. T., & Ly, B. T. K. (2021). Investigation into the cytotoxic effects of oriental motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt.) methanol extract on k562 leukaemia cells And the artemia acute toxicity test. *The University of Danang - Journal of Science and Technology*, 19(03), 37-40 (in Vietnamese).
- Han, N. V. (2022). *Medicinal extraction techniques*. Medical Publishing House (in Vietnamese).
- Hong, H. T., Long, N. D., Nhi, T. N. T., & Ngan, Đ. K. (2024). Preliminary investigation of chemical composition and evaluation of the antioxidant activity of *Sesbania grandiflora* L. seed extract. *Journal of Science and Technology – NTTU*, 7(02), 32-37 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.55401/sr1g303>
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570-581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Jiang, H., Xing, Z., Wang, Y., Zhang, Z., Mintah, B. K., Dabbour, M., & Ma, H. (2020). Preparation of allicin-whey protein isolate conjugates: Allicin extraction by water, conjugates' ultrasound-assisted binding and its stability, solubility and emulsibility analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104981. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104981>
- Kathryn, L. W. (2016). *Gas Chromatography/ Mass Spectrometry*. PerkinElmer.
- Linh, T. T. L., & Thuy, N. M. (2014). Factors affecting the extraction of bioactive compounds in *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn. *Can Tho University Journal of Science*, 2014(1), 68-75 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctujos.2023.171>
- Lee, J., Gupta, S., Huang, J. S., Jayathilaka, L. B., & Lee, B. S. (2013). Anticancer activity of aqueous garlic extract is from allicin. *Analytical biochemistry*, 436(2), 187-189. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.033>
- Londhe, VP., Gavasane A. T., Nipate S. S., Bandawane D. D., & Chaudhari P. D. (2011). Role of garlic (*allium sativum*) in various disease: an overview. *Journal of Pharmaceutical Research And Opinion*, 1(4), 129-134. <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/5094>
- Long, P. T., & Mai, P. T. (2023). Development of Flavonoid-rich extract process from honeysuckle. *The University of Hoabinh - Journal of Science and Technology*, 10, 138- 144 (in Vietnamese).
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., ... & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Mathialagan, R., Mansor, N., Shamsuddin, M. R., Uemura, Y., & Majeed, Z. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted extraction (uae) of allicin from garlic (*allium sativum* l.). *Chemical Engineering Transactions*, 56, 1747-1752. <https://doi.org/10.3303/CET1756292>
- Mastovska, K., & Lehotay, S. J. (2006). Rapid sample preparation method for LC– MS/MS or GC– MS analysis of acrylamide in various food matrices.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7001-7008.
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf061330r>
- Minh, B. T. L., Minh, N. H. Q., Trang, H. N., & Thuan, N. K. (2023). The sensitivity of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from animal feces to antibiotics and Vietnamese garlic (*Allium staviu* L.) aqueous extracts in vitro. *Veterinary Integrative Sciences*, 22(03), 815–822.
<https://doi.org/10.12982/VIS.2024.054>.
- Nho, N. T., Dao, L. T. A., Chi, N. T. K., & Hau, N. C. (2021). Molecular absorption spectrophotometric method for determining total polyphenol contents in roasted ground coffee products. *TNU Journal of Science and Technology*, 226(16), 124 – 132 (in Vietnamese).
<https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4910>
- Oonmetta-Aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1214-1220.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.06.015>
- Quyên, M. V., Nhi, L. T. V., Vinh, N. Q., Hoa, N. T., & Kiet, N. T. (2000). Popular herbs in Vietnam. *Ho Chi Minh City Agricultural Publishing House (in Vietnamese)*.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2008). Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria of chives (*Allium schoenoprasum*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(11), 2987-2991.
- Song, Z., Wang, Y., Li, C., Tan, Y., Wu, J., & Zhang, Z. (2023). Fumigant toxicity and behavioural inhibition of garlic against red imported fire ants (*Solenopsis invicta*). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(1), 1889-1897.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-22091-z>
- Son, N. H., Diep, N. T., Tuyen, V. K., Thuy, N. T., Duong, V. B., & Hien, P. V. (2023). Study on the preparation of cyclophilin-rich liquid extracted from black shallot. *Journal of Military Pharmacology*, 48, 23 -36 (in Vietnamese).
<https://doi.org/10.56535/jmpm.v48.456>
- Susan, S. P. (2015). Aged Garlic Extract Modifies Human Immunity. *The Journal of Nutrition*, 146(2), 433S-436S.
<https://doi.org/10.3945/jn.115.210427>
- Thien, D. B. T. (2023). *Research on obtaining polyphenols, chlorophyll from pennywort (Centella asiatica (L.) Urb), and application in beverages* (Master's thesis). Nha Trang University (in Vietnamese).
- Tan, N. D. (2019). Research on the effect of ethanol concentration and solvent/raw material ratio on the content of biological compounds, colors and antioxidant capacity of extracts from the mixture of moringa/turmeric/lemongrass. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15(4), 33-44 (in Vietnamese).
- Thu, T. R. T. N., Hanh, T. R. T. M., Vung, B. X., Phuong, N. T. D., & Anh, L. T. T. (2018). The effect of time and ultrasound power level on the efficiency of Isoflavones extraction from soybean. *The University of Danang - Journal of Science and Technology*, 11(132), 157-161(in Vietnamese).
- Tung, B.H. & Minh, H.T.M., (2022). *Advanced Microbiology Textbook*. Hanoi Medical College (in Vietnamese).
- U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. (2023). *Diallyl disulphide*.
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C2179579&Mask=200#>
- Vinh, B. M., Mien, L. T. H., Linh, V. T. D., & Tri, N. M. (2023). Antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activity of garlic Ly Son, Quang Ngai. *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, 33(6), 355-361 (in Vietnamese).
<https://doi.org/10.51403/0868-2836/2023/1438>
- Wanyika, H. N., Gachanja, A., Kenji, G. M., Keriko, J. M., & Mwangi, A. (2011). A rapid method based on UV spectrophotometry for quantitative determination of allicin in aqueous garlic extracts. *Journal of Agriculture, Science and Technology*, 12(01), 74-82.
- Yang, L., Lingling, H., & Zhuo, Y. (2012). Microwave-Assisted Extraction of Garlic Essential Oil from Garlic. *Applied Mechanics and Materials*, 117-119, 1022-1026.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.117-119.1022>
- Zhou, C. L., Hu, X. Y., Chao, C., Li, H., Zhang, S. Y., Yan, X. M., & Li, Q. H. (2015). Quantitation of allicin in Garlic-based Products: Comparisons among Spectrophotometry, GC and HPLC. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 9(4), 269-277.
<http://dx.doi.org/10.19026/ajfst.9.2007>
- Zaini, A., Putra, N., Idham, Z., Norodin, N. M., Rasidek, N. M., & Yunus, M. C. (2022). Mini review: Extraction of allicin from allium sativum using subcritical water extraction. *International Conference on Science, Engineering and Technology*, 932(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X%2F932%2F1%2F012023>