

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Duy Diệu

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN
Helicobacter pylori CỦA CAO CHIẾT TỪ LÁ BƠ BOOTH
THU THẬP TẠI TỈNH ĐẮK LẮK**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Duy Diệu

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN
Helicobacter pylori CỦA CAO CHIẾT TỪ LÁ BƠ BOOTH
THU THẬP TẠI TỈNH ĐẮK LẮK**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. PGS.TS Lê Thị Nhi Công

2. TS. Nguyễn Việt Linh

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Vũ Duy Diệu

LỜI CẢM ƠN

Để có thể hoàn thành đề tài luận văn thạc sĩ một cách hoàn chỉnh, bên cạnh sự nỗ lực cố gắng của bản thân còn có sự hướng dẫn nhiệt tình của quý thầy cô, cũng như sự động viên ủng hộ của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập nghiên cứu và thực hiện luận văn thạc sĩ.

Tôi xin chân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và các thầy cô giáo Khoa Công Nghệ Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập. Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn đến PGS. TS. Lê Thị Nhi Công, TS. Nguyễn Việt Linh người đã hết lòng giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành luận văn này.

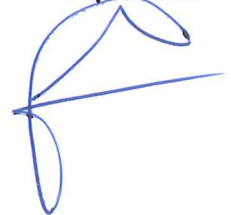
Tôi cũng xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn đến các cán bộ, học viên của Phòng Công nghệ sinh học môi trường và Phòng Công nghệ sinh học động vật, Viện Công nghệ sinh học (nay là Viện Sinh học), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những người đã giúp đỡ tôi rất nhiều để thực hiện luận văn này.

Tôi xin cảm ơn Đề tài: “Nghiên cứu chiết xuất, bào chế tạo sản phẩm hỗ trợ điều trị viêm loét dạ dày do nhiễm vi khuẩn Hp (*Helicobacter pylori*) từ nguồn nguyên liệu lá Bơ, nâng cao giá trị chuỗi sản phẩm đầu ra cho phát triển cây Bơ tại tỉnh Đắk Lắk” (Sở Khoa học và Công nghệ - tỉnh Đắk Lắk) đã cung cấp số liệu để tôi hoàn thành Luận văn.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn đến gia đình, các anh chị và bạn bè đã hỗ trợ cho tôi rất nhiều trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện đề tài luận văn thạc sĩ một cách hoàn chỉnh.

Hà Nội, ngày 06 tháng 03 năm 2025

Học viên



Vũ Duy Diệu

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	i
DANH MỤC CÁC BẢNG	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH	iii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Vi khuẩn <i>H. pylori</i> trong các bệnh lý dạ dày	3
1.1.1 Cấu trúc, đặc điểm, khả năng gây bệnh.....	3
1.1.2 Tình hình bệnh do vi khuẩn <i>H. pylori</i>	4
1.2 Giới thiệu về cây bơ.....	6
1.2.1. Đặc điểm.....	6
1.2.2 Bơ Booth.....	7
1.2.3 Một số thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây bơ ...	8
1.3. Các phương pháp chiết xuất hợp chất từ lá bơ.....	9
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	12
2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.....	12
2.1.1. Vật liệu, đối tượng nghiên cứu.....	12
2.2 THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ HÓA CHẤT	12
2.2.1 Thiết bị, dụng cụ.....	12
2.2.2 Hóa chất	13
2.3 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	13
2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	14
2.4.1. Sơ đồ nghiên cứu chung.....	14
2.4.2 . Phương pháp tách chiết [23]	14
2.4.3. Thử hoạt tính ức chế <i>H. pylori</i> của dịch chiết [12].....	16
2.4.4. Phương pháp xác định nồng độ ức chế <i>H. pylori</i> tối thiểu	16
2.4.5. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nồng độ, tỷ lệ dung môi đến quy trình chiết xuất cao chiết.....	17
2.4.6. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quy trình chiết xuất cao chiết.....	17
2.4.7. Phương pháp phân lập, xác định thành phần hóa học các hợp chất có trong lá bơ.....	18
2.4.7.1. Xác định các thành phần hoạt tính sinh học bằng sắc ký lớp mỏng (TLC).....	18

2.4.7.2. Phân tích sắc ký khí/phổ khối (GC/MS) [29]	18
2.4.8. Phương pháp phân tích thống kê.....	18
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	19
3.1. Tách chiết và đánh giá khả năng kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> và xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết lên vi khuẩn <i>H. pylori</i>	19
3.1.1. Khả năng kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> của các loại cao chiết từ lá bơ Booth	19
3.1.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu -MIC	22
3.2. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ, tỷ lệ dung môi đến quy trình chiết xuất cao chiết để có được hoạt tính tốt nhất	24
3.2.1. Khả năng kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> tại các nồng độ cao chiết khác nhau từ lá bơ Booth	24
3.2.2. Khả năng kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> của các cao chiết từ lá bơ Booth ở các nhiệt độ khác nhau	26
3.2.3. Khả năng kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> của các cao chiết từ lá bơ Booth ở các thời gian khác nhau.....	29
3.3 Xác định sơ bộ thành phần hóa học của dịch chiết thô và các dịch chiết phân đoạn làm cơ sở xác định những phân đoạn có tiềm năng ..	32
3.3.1 Xác định các thành phần hoạt tính sinh học bằng sắc ký lớp mỏng (TLC)	32
3.3.2 Phân tích sắc ký khí khối phổ	33
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	37
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	38
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	39

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ Tiếng Anh	Chữ viết đầy đủ Tiếng Việt
1	GC/MS	Gas chromatography-mass spectrometry	Sắc ký khí/Khối phổ
2	HP		<i>Helicobacter pylori</i>
3	HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
4	HTKK		Hoạt tính kháng khuẩn
5	IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
6	MAE	Microwave-assisted extraction	Chiết xuất hỗ trợ vi sóng
7	MBC	Minimum bactericidal concentration	Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu
8	MIC	Minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
9	OHAЕ	Ohmic heating assisted extraction	Công nghệ chiết xuất hỗ trợ gia nhiệt Ohmic
10	PBP _s	Penicillin binding proteins	Penicillin protein liên kết
11	SCE	Solution of hydroalcoholic extraction	Dịch chiết hydroalcoholic
12	SEAP	Solution of ethylacetate portion	Dịch chiết phân đoạn etyl axetat
13	SEM	Scanning electronic microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
14	SHP	Solution of hexane portion	Dịch chiết phân đoạn hexan
15	TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
16	UTDD		Ung thư dạ dày

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.....	12
Bảng 3.1. Kết quả chiết lá bơ với 3 loại dung môi khác nhau.....	19
Bảng 3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> của các cao chiết trên các dung môi khác nhau.....	20
Bảng 3.3. Kết quả thử khả năng kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> của các cao chiết.....	24
Bảng 3.4. Kết quả thử khả năng kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> của các cao chiết với các điều kiện nhiệt độ khác nhau.....	27
Bảng 3.5. Kết quả thử khả năng kháng vi khuẩn <i>H. pylori</i> của các cao chiết với các thời gian chiết khác nhau.....	29

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh hiển vi điện tử quét của <i>H. pylori</i> [2].....	3
Hình 1.2. Hình ảnh quả và lá bơ Booth [13].....	8
Hình 1.3. Một số chất tiêu biểu trong lá cây bơ [14].....	8
Hình 2.1. Sơ đồ các nội dung nghiên cứu chính của đề tài.....	14
Hình 2.2. Sơ đồ tách chiết lá bơ bằng các dung môi khác nhau.....	15
Hình 3.1. Ba dịch chiết từ lá bơ Booth với B1 được chiết xuất bằng nước cất; B2 được chiết xuất bằng etanol; B3 chiết xuất bằng <i>n</i> -hexan.....	19
Hình 3.2. Khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết từ lá bơ.....	21
Hình 3.3. Nồng độ ức chế tối thiểu vi khuẩn <i>H. pylori</i> HP09 của cao chiết <i>n</i> -hexan.....	23
Hình 3.4. Thử nghiệm khả năng kháng <i>H. pylori</i> của các cao chiết EB, EB1, EB2, EB3 và EB4.....	25
Hình 3.5 Thử nghiệm khả năng kháng <i>H. pylori</i> của các cao chiết TE1, TE2, TE3, TE4 và TE5.....	27
Hình 3.6. Thử nghiệm khả năng kháng <i>H. pylori</i> của các cao chiết TG1, TG2, TG3, TG4 và TG5.....	30
Hình 3.7 Phân tích chiết xuất <i>n</i> -hexane lá bơ bằng TLC.....	33
Hình 3.8. Các mảnh Ion của hợp chất giả định.....	34
Hình 3.9. Phổ khối của hợp chất tổng hợp được.....	34

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một nước nằm trong vùng nhiệt đới có hệ thực vật phong phú, đặc biệt có rất nhiều loại thảo dược quý có vai trò lớn trong đời sống xã hội. Nghiên cứu thành phần hóa thực vật và hoạt tính sinh học là một bước đi cần thiết và quan trọng không thể thiếu được trong việc từng bước phát triển thuốc và thực phẩm chức năng từ thực vật. Tại Việt Nam, nhu cầu tiêu dùng các sản phẩm tự nhiên, có nguồn gốc từ thực vật giúp tăng cường bảo vệ sức khỏe ngày càng nhiều. Trong số các loại cây được trồng phổ biến ở Việt Nam, bơ cũng là một loại cây có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, bơ thường được biết đến là loại cây ăn quả, rất ít các nghiên cứu về các hoạt tính của lá bơ. Trong khi đó, hằng năm, sau mỗi vụ thu hoạch, bà con thường tia lá để chuẩn bị cho vụ mùa tiếp theo. Đây là một nguồn nguyên liệu vô cùng dồi dào và chưa được khai thác. Bên cạnh đó, theo các tài liệu đã công bố, các cao chiết từ lá bơ có chứa nhiều lớp chất thứ cấp với hàm lượng khá cao, đặc biệt là nhóm anthocyanin và axit phenolic đơn vòng, do vậy hoạt tính sinh học của bơ cũng khá đa dạng. Các hoạt chất phân lập từ lá bơ thể hiện khả năng ức chế một số chủng vi khuẩn: *Helicobacter pylori*, *Micrococcus pyogenes var aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*,...

Tại Đắk Lắk, bơ được trồng khá phổ biến từ những năm 1958 với 3 giống: West Indian, Guatemalan, Mexican và cả giống lai. Tỉnh Đắk Lắk đã chú trọng vào việc phát triển trồng cây bơ và tạo các sản phẩm từ cây thuốc từ đó góp phần đa dạng hóa cây trồng của ngành nông nghiệp, phát triển kinh tế nông thôn, tạo việc làm, tăng thu nhập và cải tạo đời sống cho nhân dân, đặc biệt là vùng sâu, vùng xa, vùng biên giới, góp phần đảm bảo an ninh quốc phòng. Hơn nữa, đây là loại cây dễ trồng, đầu tư thấp, thích nghi với nhiều vùng sinh thái, đặc biệt sinh trưởng và phát triển tốt vùng đất xấu, khô cằn mà các cây lương thực truyền thống hiệu quả không cao. Trong đó, bơ Booth là một trong những giống bơ được trồng khá phổ biến ở Đắk Lắk. Bơ Booth là loại bơ được lai ghép giữa giống bơ Tây Ấn Độ và giống bơ Guatemalan.

Vi khuẩn *H. pylori* (HP) lần đầu tiên được phát hiện bởi Marshall năm 1982 và chính thức đặt tên *H. pylori* vào năm 1989. HP được xem là nguyên nhân gây viêm dạ dày mạn tính và loét dạ dày – tá tràng, đặc biệt là ung thư dạ dày. Hiện nay, tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã xếp HP là tác nhân số một gây bệnh ung thư dạ dày. Tỷ lệ nhiễm HP cao nhất trong tất cả các loại nhiễm các

nguồn vi sinh vật gây bệnh, có đến 50% dân số nhiễm HP. Trong đó, Việt Nam là một trong những quốc gia có tỉ lệ nhiễm HP rất cao, lên tới 70% và ung thư dạ dày hiện đang là vấn đề lớn trong các bệnh ung thư đường tiêu hoá. Để điều trị HP, các phác đồ kháng sinh khá phức tạp đã được đặt ra. Tuy nhiên, với xu hướng sử dụng các thực phẩm hữu cơ hiện nay, việc sử dụng dược liệu để phòng bệnh do HP gây ra đã và đang được chú trọng. Trong đó, lá bơ được chứng minh là có các hoạt chất có tác dụng ức chế vi sinh vật nói chung và HP nói riêng đã và đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu nhưng ở Việt Nam lại chưa có nhiều công bố về vấn đề này.

Vì vậy, đề tài “Nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *Helicobacter pylori* của cao chiết từ lá bơ Booth thu thập tại tỉnh Đắk Lắk” đã được thực hiện.

Mục tiêu của Đề tài:

Xác định được hoạt tính kháng vi khuẩn *Helicobacter pylori* của cao chiết từ lá bơ Booth thu thập tại tỉnh Đắk Lắk nhằm định hướng làm trà túi lọc để hỗ trợ phòng bệnh viêm loét dạ dày do vi khuẩn này gây ra.

Nội dung Đề tài:

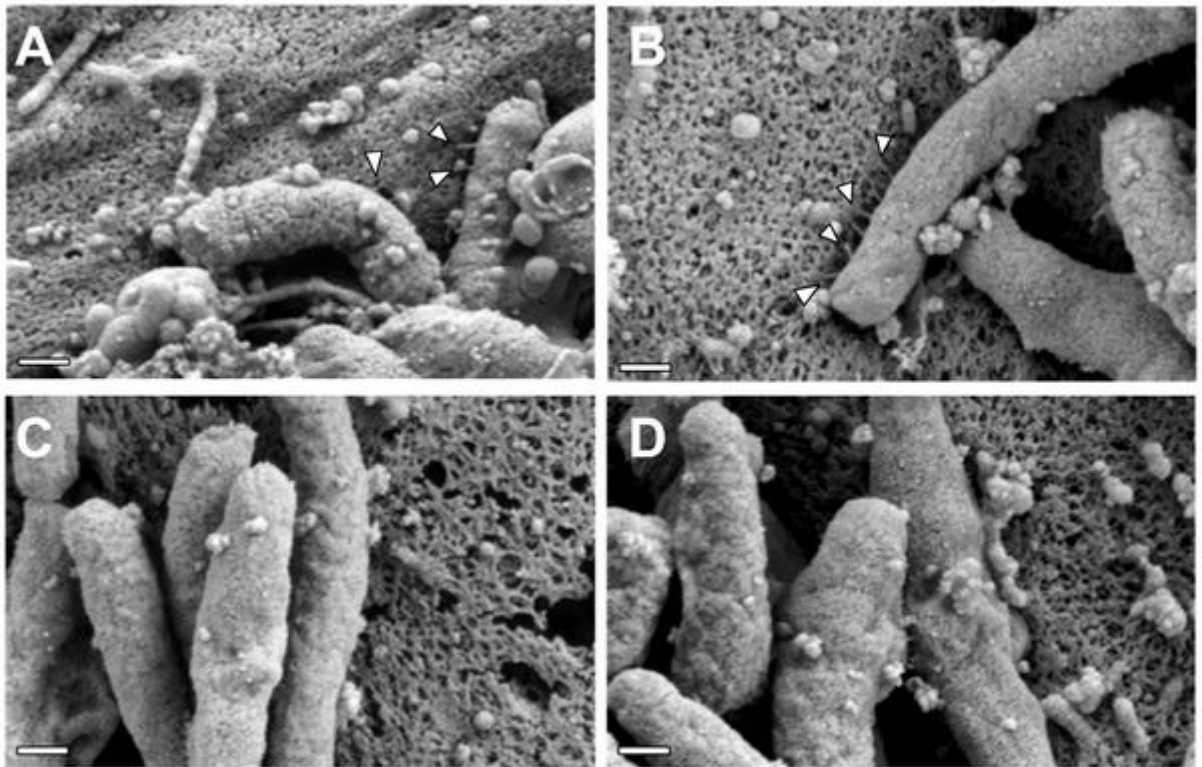
- Đánh giá hoạt tính sinh học của 3 dịch chiết (cao chiết – từ cò, nước và *n*-hexane) trên thử nghiệm *in vivo* về khả năng kháng/ức chế vi khuẩn HP (*Helicobacter pylori*). Và xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao chiết lên vi khuẩn HP.
- Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết xuất đến hoạt tính kháng HP của cao chiết.
- Phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật của dịch chiết thô và các dịch chiết phân đoạn làm cơ sở xác định những phân đoạn có tiềm năng

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Vi khuẩn *H. pylori* trong các bệnh lý dạ dày

1.1.1 Cấu trúc, đặc điểm, khả năng gây bệnh

Vi khuẩn *H. pylori* được Marshall - một nhà khoa học người Úc tìm ra năm 1982 và chính thức được đặt tên là *H. pylori* năm 1989. *H. pylori* là một vi khuẩn Gram âm tăng trưởng chậm, hình xoắn dạng que cong hay chữ S, có 1- 6 lông roi ở một đầu, có thể di động, kích thước (0.5 - 1µm) x (2.5 - 3.5 µm). Chúng sống ở lớp nhầy niêm mạc dạ dày hoặc giữa lớp nhầy với lớp biểu mô dạ dày. Nhiệt độ thích hợp 35 - 37 °C, pH thích hợp 3 - 5, chịu được pH từ 3 - 8, khi pH nhỏ hơn 2 thì *H. pylori* ngưng sinh trưởng và pH lớn hơn 7 sẽ ngưng hoạt động [1].



Hình 1.1 Hình ảnh hiển vi điện tử quét của *H. pylori* [2]

Đây là nguyên nhân của đa số các trường hợp viêm, loét dạ dày tá tràng và là một yếu tố nguy cơ của ung thư dạ dày. *H. pylori* được coi là “thủ phạm” của hơn 90% các trường hợp loét dạ dày tá tràng và khoảng 1 – 2% trong số đó có nguy cơ phát triển thành ung thư dạ dày. Nhiễm *H. pylori* đã được khẳng định là nguyên nhân chủ yếu gây viêm dạ dày mạn và loét dạ dày - tá tràng, đặc biệt là ung thư dạ dày (UTDD). Khi xâm nhập vào dạ dày, HP sử dụng enzyme urease để phân giải ure thành amoniac, giúp trung hòa acid xung quanh và tạo

điều kiện sống sót trong môi trường acid khắc nghiệt. Nhờ các roi (flagella), HP di chuyển xuyên qua lớp nhầy bảo vệ niêm mạc và bám dính lên tế bào biểu mô nhờ các phân tử bám dính như BabA, SabA. Sau khi bám vào tế bào, HP tiết ra nhiều enzyme và yếu tố độc lực như urease, protease, lipase, *VacA* và *CagA*. Trong đó, *VacA* gây hình thành các không bào làm chết tế bào, còn *CagA* được tiêm trực tiếp vào tế bào chủ, làm rối loạn tín hiệu nội bào, thúc đẩy phản ứng viêm và có khả năng gây biến đổi tiền ung thư. Quá trình nhiễm HP kích thích tế bào niêm mạc dạ dày tiết cytokine tiền viêm (đặc biệt là IL-8), thu hút bạch cầu và đại thực bào đến, làm giải phóng các gốc tự do và enzyme tiêu diệt vi khuẩn, nhưng đồng thời cũng gây tổn thương chính niêm mạc dạ dày. Hậu quả lâu dài của tình trạng viêm mạn tính là teo niêm mạc, loét dạ dày – tá tràng, và làm tăng nguy cơ phát triển ung thư dạ dày hoặc lymphoma MALT. Như vậy, cơ chế gây bệnh của HP là sự phối hợp giữa khả năng sống sót trong môi trường acid, bám dính, tiết độc tố, gây viêm và tổn thương mạn tính dẫn đến biến chứng nặng nề nếu không được điều trị. [3,4].

1.1.2 Tình hình bệnh do vi khuẩn *H. pylori*

Hiện nay, tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã xếp *H. pylori* là tác nhân số một gây UTDD. Tỷ lệ nhiễm *H. pylori* cao nhất trong tất cả các loại nhiễm trùng dạ dày, có đến 50% dân số trên thế giới nhiễm *H. pylori* [21]. Tại các nước phát triển, điều kiện vệ sinh tốt, tỷ lệ nhiễm HP vào khoảng 25-35%. Trong khi đó, tại các nước đang phát triển, điều kiện vệ sinh còn kém nên tỷ lệ nhiễm HP vào khoảng 40 – 75%. Trong đó, Việt Nam là một trong những quốc gia có tỷ lệ nhiễm *H. pylori* cao (khoảng 70%) và UTDD hiện đang là một vấn đề lớn trong các bệnh ung thư đường tiêu hóa. Nguyên nhân là do các chủng *H. pylori* độc lực cao gây ra. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *H. pylori* tăng cao trong những gia đình đã có người bị nhiễm vi khuẩn *H. pylori* trước hoặc điều kiện sống ở mức kinh tế thấp như: nơi có điều kiện vệ sinh kém, nước và thức ăn bị nhiễm là nguồn lây lan quan trọng ban đầu. Vi khuẩn *H. pylori* có thể được lây truyền qua nhiều đường như: miệng - miệng, phân - miệng, dạ dày - miệng. Bố mẹ và anh chị em đóng vai trò là nguồn lây nhiễm tiên phát [6].

Ở các khu vực đang phát triển trên thế giới 80 % dân số có thể bị nhiễm khuẩn trước 20 tuổi, tỉ lệ này là 20 % - 30 % các nước công nghiệp [6]. Tại Việt Nam trong quần thể khoảng 40 % - 70 % với tỷ lệ nhiễm ở nam và nữ như nhau.

Trẻ nhỏ nhiễm *H. pylori* thấp hơn người lớn, xuất hiện ở cả 1 - 2 tuổi. Việc loại bỏ *H. pylori* bằng các loại thuốc kháng sinh như hiện nay có thể giúp làm lành vết loét và giảm nguy cơ loét tái phát và các biến chứng. Tuy nhiên, với xu hướng dùng thảo dược hiện nay, lá bơ được xem là nguồn nguyên liệu sẵn có và tiềm năng để phòng bệnh viêm loét dạ dày do *H. pylori* gây ra.

1.1.3 Các hợp chất thiên nhiên ức chế vi khuẩn *H. pylori*

Các nghiên cứu của Raymond Chia và Dykes năm 2010 đã chỉ ra phenolic hợp chất trong lá bơ có hoạt tính kháng khuẩn [7]. Hiện nay, *H. pylori* được công nhận là tác nhân gây viêm dạ dày mãn tính và loét dạ dày, tá tràng. Khả năng gây bệnh của *H. pylori* là do các yếu tố độc lực, trong đó có việc sản sinh urease, cô lập axit dạ dày. Trong các nghiên cứu đã công bố cũng đã đánh giá được dịch chiết hydroalcoholic (SCE) từ lá bơ và các phân đoạn hexan (SHP) và etyl axetat (SEAP) có tác dụng kháng vi khuẩn HP trong dạ dày, ức chế urease và hoạt động chống khối u. Dịch chiết xuất chiết xuất thu được bằng cách tăng 70% cồn và phân đoạn với hexan và etylaxetat. Chủng *H. pylori* được kiểm nghiệm là *H. pylori* ATCC 43504 và 43629; nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đã được thử nghiệm. Phân tích hình thái học của *H. pylori* được thực hiện bằng cách quét kính hiển vi điện tử (SEM). Sự ức chế urease được xác định bằng cách sản xuất amoniac chuyển hóa bởi urease. Khả năng gây độc tế bào trong tế bào ung thư biểu mô tuyến dạ dày ở người (ATCC CRL -1739) được thực hiện bằng xét nghiệm MTT ở mức 3,125-100 $\mu\text{g/ml}$. Các thử nghiệm đã được thực hiện trong ba lần và kết quả được biểu thị bằng phần trăm ức chế. Kết quả SEAP và SHP ở *H. pylori* ATCC 43504 cho thấy MIC và MBC là 128 $\mu\text{g/ml}$ và đối với ATCC 43629, SEAP cho thấy MIC là 256 $\mu\text{g/ml}$ và không có MBC, trong khi SHP đưa ra MIC là 256 và MBC là 1024 $\mu\text{g/ml}$ [8]. Trong hoạt tính chống khối u chống lại các tế bào ung thư biểu mô tuyến, SEAP có kết quả IC_{50} là $55,43 \pm 6,20$ $\mu\text{g/ml}$, SHP thu được IC_{50} là $11,80 \pm 1,75$ $\mu\text{g/m}$ và chất chuẩn chống ung thư, cisplatin, cho thấy IC_{50} là $7,70 \pm 1,51$ $\mu\text{g/ml}$. Phân số cho thấy có hiệu quả đối với chất chống ung thư dạ dày hoạt động. SCE chỉ ức chế được $18,23\% \pm 6,88$ tế bào ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$. SEM cho thấy *H. pylori* được xử lý bằng SHP hiện diện các tế bào đang trong quá trình chuyển đổi từ trực khuẩn thành dạng không hoạt động, với sự xuất hiện của bong nước, vách ngăn và dạng hình cầu, tương tự như dạng được

tìm thấy trong các nghiên cứu khác. Những thay đổi này tương ứng với tổn thương thành tế bào và tương tác trên PBPs (penicillin protein liên kết) tác động lên sự hình thành peptidoglycan, cụ thể hơn là PBP1 (66-kDa) ở dạng cầu khuẩn và PBPs 3 (60-kDa) và 2 (63- kDa) ở dạng trực khuẩn. Điều trị bằng SEAP có thể đem lại kết quả trên PBP2. SEAP đã được chứng minh có những tác dụng tích cực trong điều trị chống lại HP dạ dày. Những kết quả này cho thấy hạt từ cây bơ có thể trở thành một sự thay thế cho điều trị bệnh dạ dày do *H. pylori* và kháng u [9]. Dịch chiết lá bơ có tác dụng kháng khuẩn trên *H. pylori*, *Micrococcus pyogenes var aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*

1.2 Giới thiệu về cây bơ

1.2.1. Đặc điểm

Cây bơ tên khoa học: *Persea americana* Miller, tên khác là cây thủy kiến, cây lể dẩu thuộc họ Long não (Lauraceae), bộ Long não (Lauraceae). Cây có đặc điểm là cây gỗ, cao 10 – 15 m. Lá cây mọc so le, hình bầu dục hoặc hình trứng, dài 8 – 20 cm, rộng 5 – 10 cm. Góc tròn hoặc thuôn, đầu có mũi nhọn ngắn, nếp nguyên, mặt trên màu lục sẫm, mặt dưới màu xám nhạt; cuống lá dài 4 cm. Cụm hoa mọc ở đầu cành thành chùy gồm nhiều hoa nhỏ màu lục hoặc vàng nhạt, có cuống ngắn, bao hoa có 6 thùy bằng nhau xếp thành hai vòng, thùy dài 4- 5 mm, nhị 9; bầu có 4 ô. Quả mọng to, nạc, dạng quả lê, hình trứng hoặc hình bầu dục, dài 8 – 18 cm, mùa lục vàng hoặc màu tím tía khi chín, vỏ mỏng, thịt mềm màu vàng, hạt to [10,11].

Chi *Persea americana* Miller gồm một số loài là cây gỗ hoặc cây bụi, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới, á nhiệt đới châu Mỹ và đảo Canary.

Cây bơ có nguồn gốc ở châu Mỹ và được trồng nhiều ở Bắc Mỹ và vùng Caribê. Cây du nhập sang châu Phi, Israel và nhiều nước nhiệt đới khác như Malaysia, Indonesia, Thái Lan, Việt Nam, ... Bơ ưa khí hậu nhiệt đới, nóng và ẩm. Vùng trồng bơ thường có mưa nhiều.

Các giống bơ thường được phân biệt dựa vào sự thích ứng với điều kiện khí hậu và nguồn gốc khởi nguyên. Đặc điểm các giống sinh thái được mô tả như sau:

Giống Mexican: Có nguồn gốc từ núi cao của Mexico, khả năng chịu lạnh cao nhất, lá có mùi hôi. Nhược điểm của giống này là quả nhỏ, da mềm và hạt tương đối lớn. Giống lai được chọn lọc từ những giống này có nhiều giống giá

trị như Fuerte và Zutano. Đây là giống lai giữa Mexician và Guatemalan, kích thước quả vừa phải, vỏ nhẵn [12].

Giống Guatemalan: Có nguồn gốc từ vùng cao nguyên của Mexico, chịu lạnh kém hơn chủng Mexican. Các giống nổi tiếng của giống này như: Hayes, Hopkins và Hass có quả khá lớn, vỏ dày, sần sùi, màu vỏ thay đổi từ xanh lục đến nâu khi quả trưởng thành, hạt nhỏ và khít trong thịt quả.

Giống West Indian: Giống này thích hợp ở những vùng nóng có độ cao thấp và ẩm. Những giống này có khả năng chịu lạnh kém, quả lớn, ngoại hình đẹp vỏ dai và không dày như giống Guatemalan. Những giống được trồng phổ biến là Pollock, Booth và Simmond.

Lá bơ là lá của cây bơ, có màu xanh đậm, hình dáng thuôn dài hoặc bầu dục, kích thước chiều dài từ 6-25 cm và rộng 3,5-15 cm. Ở phần đuôi, lá thu lại thành chóp nhọn. Lá bơ rất giàu giá trị dinh dưỡng, chứa nhiều protein, chất xơ, khoáng chất như magiê, natri, mangan, canxi, sắt, kẽm, kali, selen và photpho. Ngoài ra, lá bơ còn chứa nhiều hợp chất chống ung thư như flavonoid và phenol. Lá bơ còn chứa tinh dầu như methylchavicol, D- α -pen và một số alkaloid. Chính vì những thành phần dinh dưỡng và hoạt chất này mà lá bơ được đánh giá là rất tốt cho sức khỏe con người. Không có gì ngạc nhiên khi những lợi ích sức khỏe của lá bơ đang được quan tâm và nghiên cứu nhiều hơn.

1.2.2 Bơ Booth

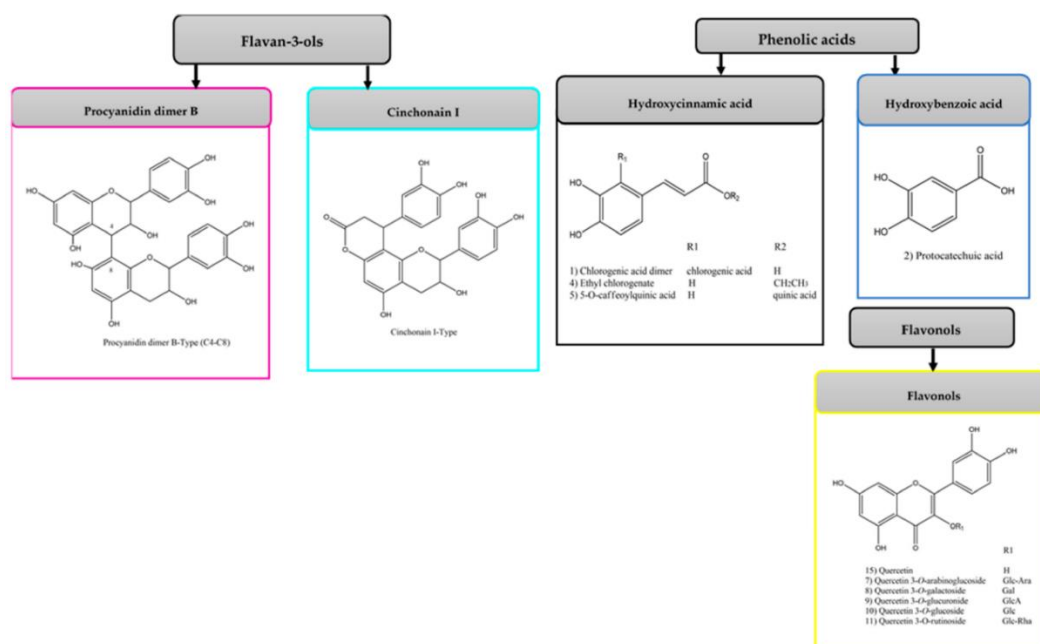
Bơ booth là loại bơ được lai ghép giữa giống bơ Tây Ấn Độ và giống bơ Guatemala, do chủ trang trại tên là Willam J.Krome và Will Booth ở vùng Florida phía nam của Dade Country lai tạo ra. Bơ Booth xuất hiện ở Việt Nam từ hơn 10 năm trước và được trồng ở nhiều nơi tại nước ta, từ Tây Nguyên, Đồng Bằng sông Cửu Long cho đến miền Đông Nam Bộ. Trong đó, bơ Booth được trồng ở Tây Nguyên đạt năng suất cao và có chất lượng tốt nhất nhờ điều kiện thổ dưỡng thuận lợi như hàm lượng chất dinh dưỡng cao của đất đỏ bazan và khả năng thoát nước tốt. Theo báo cáo của Sở nông nghiệp và phát triển nông thôn tỉnh Đắk Lắk, tỉnh Đắk Lắk có diện tích trồng bơ lớn đứng thứ hai cả nước, đạt khoảng 9.146 ha. Tuy nhiên, bơ thường được biết đến là loại cây ăn quả, rất ít các nghiên cứu về các hoạt tính của lá bơ. Trong khi đó, hằng năm, sau mỗi vụ thu hoạch, bà con thường tỉa lá để chuẩn bị cho vụ mùa tiếp theo. Đây là một nguồn nguyên liệu vô cùng dồi dào và chưa được khai thác.



Hình 1.2 Hình ảnh quả và lá bơ Booth [13]

1.2.3 Một số thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây bơ

Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây lá bơ đã được các tác giả nước ngoài tập trung nghiên cứu. Thành phần hóa học của lá bơ khá đa dạng bao gồm các lớp chất flavonoid, acid phenol đơn vòng, acid hữu cơ và polysaccharide (**Hình 1.2**).



Hình 1.3 Một số chất tiêu biểu trong lá cây bơ [14]

Hoạt tính sinh học: do xuất hiện nhiều lớp chất thứ cấp với hàm lượng khá

cao, đặc biệt là nhóm anthocyanin và acid phenol đơn vòng, do vậy hoạt tính sinh học của bơ cũng khá đa dạng.

Các hoạt chất phân lập từ lá bơ thể hiện khả năng ức chế một số chủng vi khuẩn: *H. pylori*, *Micrococcus pyogenes var aureus*, *Escherichia coli*, *B. subtilis*. Dịch chiết etanol-nước của lá bơ ức chế *S. aureus*, *B. stearothermophilus*, *M. luteus*, *S. mascences*, *C. sporogenes*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *B. cereus* và *P. fluorescence* [14].

Nghiên cứu điều tra hoạt động chống loét của chiết xuất lá bơ. Bằng cách cho chuột bạch tạng được xử lý trước bằng đường uống với chiết xuất nước lá của cây trước khi việc sử dụng các loại thuốc gây loét - indomethacin và etanol. Chiết xuất đã có tác dụng đáng kể tác dụng chống loét do indomethacin- và ethanol gây ra ở chuột [15].

Theo nghiên cứu của Zhongzhi cùng cộng sự (2011) và Günnur & Nesrin (2008) indomethacin nói riêng và các thuốc chống viêm không steroid nói chung ức chế enzyme cyclooxygenase do đó làm giảm tổng hợp prostaglandin dẫn đến giảm bài tiết chất nhầy và bicarbonate, tạo điều kiện cho HCl và pepsin tấn công gây tổn thương niêm mạc và hệ thống mạch máu dưới niêm mạc, giảm lưu lượng máu nuôi dưỡng niêm mạc, giảm tái sinh niêm mạc gây loét dạ dày tá tràng. Vì thế, gây loét dạ dày bằng indomethacin được coi là mô hình kinh điển dùng để nghiên cứu tác dụng bảo vệ dạ dày theo cơ chế tăng cường yếu tố bảo vệ mà chủ yếu tăng tiết chất nhầy bảo vệ niêm mạc. Theo các nghiên cứu cho thấy sử dụng indometacin với các liều khác nhau thường từ 12,5 mg đến 50 mg, thời gian gây loét cũng khác nhau thường từ 4-6 giờ. Kết quả nghiên cứu thăm dò cho thấy, sau khi uống indometacin liều 30 mg/kg thể trọng chuột cống các vết loét dạ dày rõ nhưng không quá nặng. Người ta đã chứng minh được indomethacin là một trong những hoạt chất có trong lá bơ [16,17].

1.3. Các phương pháp chiết xuất hợp chất từ lá bơ

Do chứa hầu hết các chất có tính phân cực mạnh là anthocyanin và axit phenolic đơn vòng, dung môi thường được sử dụng để chiết xuất là etanol, nước hay hỗn hợp của chúng. Việc sử dụng loại dung môi nào để chiết xuất sẽ tùy vào mục đích của nghiên cứu, hay hoạt tính sinh học mà phân đoạn chiết thể hiện. Tác giả Yasis và cộng sự đã sử dụng etanol:nước (1:1,v/v) có bổ sung 1% HCl để chiết xuất nhóm anthocyanin từ lá bơ, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là

14:1 (v/w) cho thấy hiệu quả tốt nhất [14].

Hiện nay có rất nhiều phương pháp được sử dụng để chiết xuất các hoạt chất từ lá bơ, mỗi phương pháp có ưu điểm và nhược điểm riêng. Các phương pháp truyền thống như ngâm dầm, ngâm kiệt hay chiết nóng dễ thực hiện và không yêu cầu thiết bị phức tạp. Tuy nhiên, phương pháp ngâm dầm và ngâm kiệt có nhược điểm là tiêu tốn thời gian chiết rất dài, trong khi đó phương pháp chiết nóng yêu cầu điều kiện nhiệt độ cao có thể gây phân huỷ một số hoạt chất trong dược liệu [18]. Các phương pháp hiện đại hơn như chiết bằng hệ thống Soxhlet, chiết có sự hỗ trợ của vi sóng, gia nhiệt Ohm, hoặc siêu âm không những rút ngắn thời gian mà còn nâng cao hiệu suất chiết hoạt chất từ dược liệu nhờ khả năng gia nhiệt hiệu quả hoặc khả năng phá vỡ màng tế bào thực vật giúp dung môi thẩm thấu tốt hơn [19]. Mặc dù vậy, những phương pháp này yêu cầu thiết bị hiện đại, đồng thời vẫn có nguy cơ gây phân huỷ hoạt chất khi vận hành ở nhiệt độ tương đối cao. Phương pháp chiết bằng CO₂ siêu tới hạn có thể khắc phục nhược điểm này khi chiết xuất ở nhiệt độ thấp, hạn chế tối đa sự phân huỷ nhiệt của các hoạt chất kém bền, bên cạnh đó còn là phương pháp xanh không gây ô nhiễm môi trường [20,21]. Tuy nhiên phương pháp này yêu cầu thiết bị rất phức tạp, đắt tiền, và cần người vận hành có trình độ cao. Chính vì vậy, phương pháp chiết xuất phù cần được lựa chọn để phù hợp với điều kiện và mục đích của nghiên cứu.

Bên cạnh các phương pháp chiết, các điều kiện trong quá trình chiết xuất cũng ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất chiết. Một số điều kiện quan trọng phải kể đến như: dung môi, nhiệt độ, thời gian chiết, và tỉ lệ dung môi – dược liệu. Việc lựa chọn dung môi chiết phụ thuộc vào mục tiêu nghiên cứu dựa trên tỉ lệ hoạt chất chiết được hoặc hoạt tính sinh học mà dịch chiết thể hiện. Các dung môi có độ phân cực khác nhau có thể cho kết quả dịch chiết có thành phần hoạt chất và hoạt tính rất khác biệt, ví dụ trong nghiên cứu gần đây của Makota và cộng sự, lá bơ chiết với các dung môi tăng dần độ phân cực *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, ethanol, methanol, và nước có hoạt tính kháng khuẩn khác biệt đáng kể trên các dòng vi khuẩn *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, và *C. tropicalis* [22]. Đối với mục tiêu nghiên cứu là chiết xuất các hợp chất anthocyanin và acid phenol đơn vòng có tính phân cực mạnh, dung môi thường được sử dụng để chiết xuất là các dung môi phân cực (có proton và không proton). Ngoài ra, khi ứng dụng dịch chiết trong lĩnh vực

y được, ưu tiên lựa chọn dung môi an toàn với sức khoẻ như ethanol, nước, hoặc hỗn hợp của chúng ở các tỉ lệ khác nhau. Trên thực tế, các dịch chiết từ lá cây bơ (phần lớn là chiết bằng cồn hoặc nước) đã được sử dụng từ rất lâu để làm thuốc điều trị bệnh và cho đến nay vẫn được xem là an toàn với người dùng [21]. Các điều kiện khác như nhiệt độ và thời gian chiết thường được khảo sát tùy vào phương pháp chiết được sử dụng. Nhìn chung việc tăng nhiệt độ và thời gian chiết giúp tăng hiệu suất chiết, nhưng đến một ngưỡng nhất định hiệu suất chiết sẽ tăng không đáng kể hoặc giảm do sự phân huỷ các hoạt chất. Tỉ lệ dung môi – dược liệu tăng giúp tăng khả năng hoà tan của hoạt chất nhờ đó nâng cao hiệu suất chiết, tuy nhiên cần tối ưu hoá điều kiện này để cân bằng giữa hiệu suất chiết và chi phí.

Các dịch chiết từ lá cây bơ đã được sử dụng từ rất lâu để làm thuốc điều trị bệnh và cho đến nay vẫn được xem là an toàn với người dùng.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu, đối tượng nghiên cứu

60 kg lá bơ Booth được lấy từ huyện Cư Kuin, tỉnh Đắk Lắk (12°36'31" Bắc và 108° 7'34" Đông). Các mẫu sau đó được vận chuyển đến phòng thí nghiệm và bảo quản ở nhiệt độ phòng cho đến khi tiến hành quá trình chiết xuất.

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* HP09 do Ths Trần Thị Minh Nguyệt và TS. Phạm Bảo Yên, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

2.2 THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ HÓA CHẤT

2.2.1 Thiết bị, dụng cụ

Một số thiết bị chính được sử dụng trong nghiên cứu:

Bảng 2.1. Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

Tên thiết bị	Hãng/nước sản xuất
Cân kỹ thuật BJ 610C	Precisa, Thụy Sĩ
Lò vi sóng NN-S215WF	Panasonic, Trung Quốc
Máy chuẩn pH-CyberScan pH 620	Eutech, Singapore
Máy đo quang phổ UV-1601-220V	Shimadzu, Nhật Bản
Máy ly tâm eppendorf 5417R	Eppendorf, Đức
Máy ly tâm to	Đức
Máy phân tích GCMS QP2010	Shimadzu, Nhật bản
Máy phân tích HPLC Hewlett-Packard	HP Hewlett-Packard, Đức
Máy vortex BR-2000	Biorad, Mỹ
Nồi hấp tiệt trùng MC – 30L	Alp, Nhật Bản
Tủ lạnh sâu -80°C MDF-192	Sanyo, Nhật Bản
Tủ lạnh SJ-169S-DS	Sharp, Thái Lan
Tủ sấy dụng cụ JSOF - 100	Jsr, Hàn Quốc
Hệ thống cô quay chân không	R-205-Büchi, Thụy sĩ

Tên thiết bị	Hãng/nước sản xuất
Kính hiển vi điện tử quét S-4800	Hitachi, Nhật Bản
Kính hiển vi Eclipse LV-UDM	Nikon, Nhật Bản
Máy vortex BR-2000	Biorad, Mỹ
Nồi hấp tiệt trùng MC – 30L	Alp, Nhật Bản
Tủ âm và tủ lắc nuôi cấy NB205QF	N – Biotek, Hàn Quốc
Tủ cấy vô trùng AVC-4A1	Esco, Singapore

Và một số dụng cụ cơ bản của phòng thí nghiệm bao gồm: Đĩa petri, lam kính, lamên, falcon (50 ml), đầu côn các loại, ống Eppendorf các loại, bình chịu nhiệt, bình tam giác, các loại cốc thủy tinh để chiết mẫu, que cấy, đèn cồn, ống đong, micropipette các loại; pipetman các loại,...

2.2.2 Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm như sau:

- Môi trường thạch BA (Blood agar base-HiMedia, Ấn Độ) bổ sung 7% máu cừu bao gồm các thành phần dưới đây
 - Tryptose: 10 g/lít
 - Peptone: 10g/lít
 - NaCl: 5g/lít
 - Agar: 15g/lít

Môi trường được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất bằng cách bổ sung 40 g hỗn hợp môi trường thạch máu vào 1 lít nước cất và khử trùng ở 121°C trong 15 phút, làm ấm đến 55 °C rồi thêm 7% máu cừu đã khử sợi huyết, trộn đều.

- Các dung môi: ethanol, *n*-hexane, ethyl acetate.

2.3 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

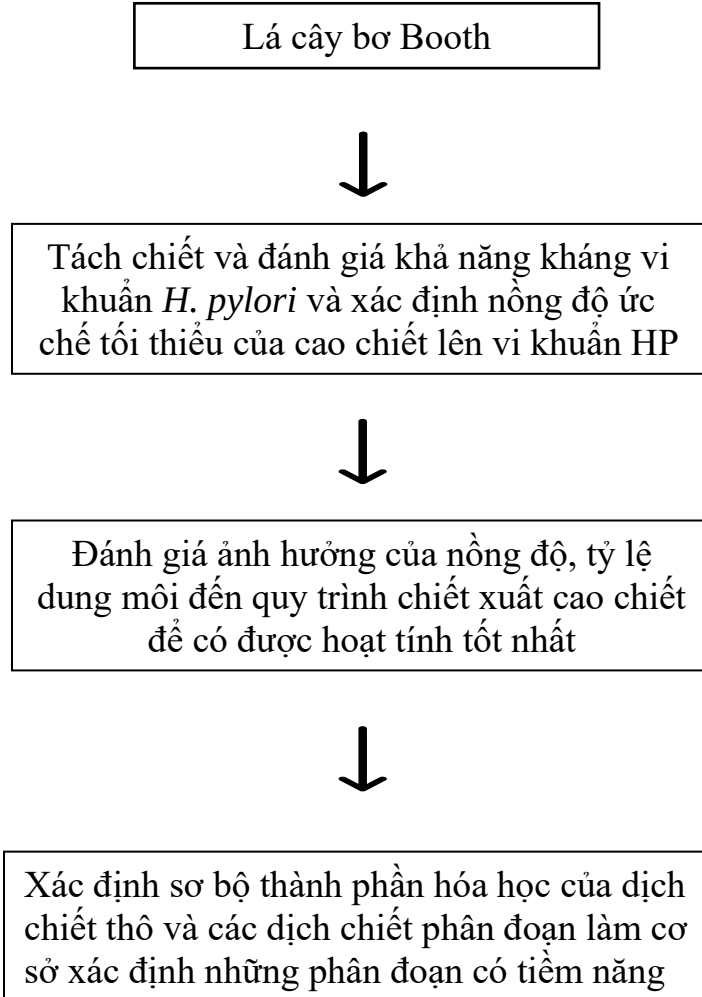
Thời gian tiến hành nghiên cứu: từ tháng 8 năm 2024 đến tháng 03 năm 2025.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng Công nghệ sinh học môi trường và Phòng Công nghệ sinh học động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Ngoài ra còn sử dụng các thiết bị và máy móc ở Viện Công nghệ hoá học, VAST, Trung tâm Chứng nhận Phù hợp, Ủy ban Tiêu

chuẩn, Đo lường Chất lượng Quốc Gia.

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

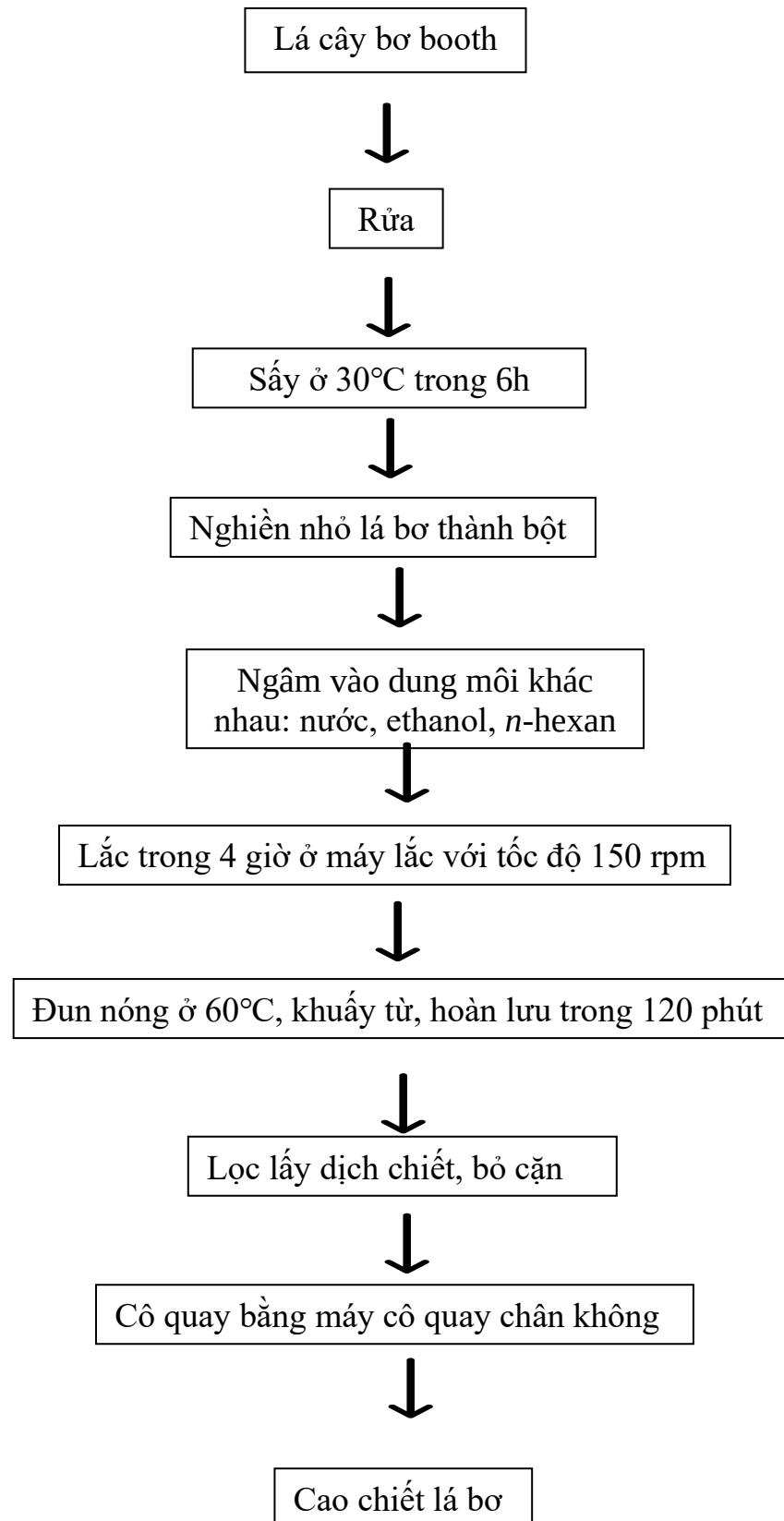
2.4.1. Sơ đồ nghiên cứu chung



Hình 2.1. Sơ đồ các nội dung nghiên cứu chính của đề tài

2.4.2 . Phương pháp tách chiết [23]

Dựa vào các tài liệu của Gomez-Flores và cộng sự (2008), Chia và Dykes (2010), Owolabi và cộng sự (2010), [24,14,25] quy trình tách chiết lá bơ bước đầu được xây dựng như sau:



Hình 2.2. Sơ đồ tách chiết lá bơ bằng các dung môi khác nhau

Lá bơ sau khi thu hái tiến hành rửa sạch và để ráo nước một cách tự nhiên tiếp đó đem đi sấy ở 30 °C trong 6 giờ. Sau khi lá bơ được sấy khô tiến hành

nghiên nhỏ lá bơ thành bột mịn và ngâm trong các loại dung môi (nước, etanol và *n*-hexan) trong 4 giờ theo tỉ lệ dung môi:lá là 15:1 (thể tích: trọng lượng). Tiến hành lắc hỗn hợp trong 4 giờ trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút (rpm) ở nhiệt độ phòng. Sau 4 giờ lắc tiến hành li tâm hỗn hợp với tốc độ 10.000 vòng/phút ở 4 °C trong 3 phút, thu dịch chiết phía trên và loại bỏ cặn. Sau đó cô quay bằng thiết bị cô quay chân không R-205-Büchi (Thụy Sĩ) ở 40 °C cho tới khi dung môi bay hết. Kết quả thu cặn hay còn gọi là dịch chiết lá bơ. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* của cao chiết.

2.4.3. Thử hoạt tính ức chế *H. pylori* của dịch chiết [12]

Từ mẫu cao chiết thu được từ phương pháp tách chiết tiến hành xác định khả năng kháng *H. pylori*. Vi khuẩn *H. pylori* HP09 được nuôi cấy trên môi trường thạch BA bổ sung 7% máu cừu hoặc ngựa và nuôi cấy trong điều kiện vi hiếu khí ở 37°C. Các thành phần của môi trường thạch BA là chất nền dinh dưỡng đặc biệt 23,0 g, tinh bột 1,0 g, NaCl 5,0 g, thạch 13,0 g, nước đã khử trùng 1000 ml. Môi trường đã được khử trùng ở 121 °C trong 15 phút. Sau đó, môi trường được làm nguội đến 45-50°C; được cung cấp 7% máu cừu và đổ vào đĩa Petri.

Dịch chiết từ nước cất, etanol và hexan đã được đo và pha loãng trong DMSO đến nồng độ 100 mg/ml. Đổ 2 µl của mỗi chiết xuất pha loãng (tương đương 200 µg) vào khoanh giấy nhỏ đã khử trùng, sau đó đợi cho đến khi giấy khô và đưa giấy vào đĩa thạch BA đã được ủ với *H. pylori*. Các đĩa được nuôi cấy trong điều kiện vi hiếu khí ở 37 °C. Đối chứng dương là giấy được bổ sung 20 mg/ml amoxicillin. Đường kính của giấy là 6 mm [26]. Đối chứng dương amoxicillin đã sử dụng có khả năng ức chế *H. pylori* và đối chứng âm là DMSO không thể ức chế *H. pylori*.

Đọc kết quả: Sau 7 ngày ủ đĩa, các khoanh giấy thấm mẫu kháng HP có thể quan sát với vòng kháng khuẩn xung quanh.

HTKK = D-d (mm) Trong đó: D: Đường kính vòng kháng khuẩn; d: Đường kính khoanh giấy; HTKK – hoạt tính kháng khuẩn [27]. Cao chiết có HTKK cao nhất được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.4.4. Phương pháp xác định nồng độ ức chế *H. pylori* tối thiểu

Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường thạch BA có bổ sung 7% máu

cừ. Dịch chiết được pha loãng tuần tự để đạt các nồng độ: 0; 28,5; 71,5; 143 và 215 $\mu\text{g/ml}$. Các nồng độ này được chuẩn bị bằng cách pha loãng dịch chiết gốc vào môi trường thạch còn lỏng (ở $\sim 50^\circ\text{C}$), sau đó rót vào các đĩa Petri và để đông đặc, tạo ra các đĩa thạch chứa sẵn dịch chiết với nồng độ tương ứng.

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* chủng HP09 được nuôi cấy, sau đó dùng tăm bông tiết trùng thu sinh khối vi khuẩn và huyền phù hóa vào 600 μl dung dịch NaCl 0,9%. Giá trị mật độ tế bào được đo bằng máy đo quang phổ tại bước sóng 600 nm (OD600). Huyền phù được điều chỉnh bằng cách pha loãng với dung dịch NaCl 0,9% đến khi đạt OD600 = 0,6, sau đó tiếp tục pha loãng thêm để đạt OD600 = 0,05.

Từ dung dịch OD600 = 0,05 này, nhỏ 20 giọt (mỗi giọt 2 μL) lên bề mặt mỗi đĩa thạch đã chứa dịch chiết. Các giọt được để khô tự nhiên ở điều kiện vô trùng, sau đó đĩa được ủ trong điều kiện vi hiếu khí ở 37°C trong vòng 7 ngày.

2.4.5. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nồng độ, tỷ lệ dung môi đến quy trình chiết xuất cao chiết

Các bước tiến hành tương tự như phương pháp tách chiết tách chiết cao chiết đến bước ngâm trong dung môi thì lựa chọn dung môi là *n*-hexan với các tỉ lệ khác nhau như 5:1; 10:1; 15:1; 20:1 và 25:1 (thể tích: trọng lượng) trong 4 giờ. Sau khi thu được cao chiết tại các nồng độ dung môi khác nhau thì tiến hành đánh giá khả năng kháng *H. pylori* của dịch cao chiết. Số liệu này dùng cho thí nghiệm tiếp theo.

2.4.6. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quy trình chiết xuất cao chiết

Tiến hành các bước tách chiết tương tự như các phương pháp trên, Trong phương pháp này, sử dụng thời gian đun là 120 phút và thay đổi nhiệt độ bếp đun từ $50-100^\circ\text{C}$ với bước nhảy là 10°C .

Sau đó, chọn được giá trị nhiệt độ tốt nhất thì sử dụng nhiệt độ này để biến thiên thời gian từ 60 – 180 phút, với bước nhảy là 30 phút. Sau khi thu được cao chiết tại các điểm nhiệt độ khác nhau thì tiến hành đánh giá khả năng kháng *H. pylori* của dịch cao chiết. Số liệu của thí nghiệm này sẽ được dùng cho các phương pháp tiếp theo.

2.4.7. Phương pháp phân lập, xác định thành phần hóa học các hợp chất có trong lá bơ

2.4.7.1. Xác định các thành phần hoạt tính sinh học bằng sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên các tấm thủy tinh 20 x 20 cm (silica gel GF254, độ dày 0,5 mm) như mô tả trong thí nghiệm của A. Cvetanović và cộng sự [28]. Trong đó các chiết xuất được chọn đã được chấm trên tấm làm điểm bắt đầu. Pha động được chuẩn bị bằng cách sử dụng hỗn hợp toluen: methylethylcetone: methanol (55:30:15, v/v/v). Quá trình được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong buồng thủy tinh bão hòa.

Apigenin được đề xuất sau khi so sánh với các tài liệu và được mua làm chuẩn. Tỷ lệ mặt trước (giá trị R_f) của chuẩn apigenin được sử dụng để xác định apigenin trong các chiết xuất được phân tích. Các chấm apigenin trên silica gel được cạo và hòa tan trong ethanol 50% (5 ml). Sau 30 phút trộn mạnh, hỗn hợp được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần chất lỏng thu được, tức là dung dịch apigenin, được bốc hơi bằng nitơ và hòa tan trong 5 ml ethanol 50%. Độ hấp thụ của dung dịch apigenin được quan sát thấy ở 340 nm. Độ hấp thụ của dung dịch quercetin được quan sát thấy ở 254 nm.

2.4.7.2. Phân tích sắc ký khí/phổ khối (GC/MS) [29]

Phân tích GC/MS được thực hiện như mô tả trong nghiên cứu trước đây [29]. Cụ thể một hệ thống ghép nối bao gồm một máy sắc ký khí GC 8000 (Fisons Instruments, Mainz, Đức) được trang bị một cột DB5-ms 30 m (0,25 mm x 0,33 μ m; J&W Scientific, Hoa Kỳ) và một máy dò chọn lọc khối lượng MD 800 (Fisons Instruments) hoạt động ở 70 eV hoặc máy quang phổ khối ba tứ cực TSQ 700 (Finnigan Corp., San Jose, California) hoạt động ở chế độ tứ cực đơn (Q1) đã được sử dụng. Tách trên cột đạt được bằng cách sử dụng chương trình nhiệt độ từ 60 đến 290 °C (10 °C/phút). Chiết xuất axit được dẫn xuất bằng cách methyl hóa với diazomethane [30].

2.4.8. Phương pháp phân tích thống kê

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện ba lần và lấy kết quả là giá trị trung bình những kết quả thu được. Số liệu được phân tích bằng chương trình Excel.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết và đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* và xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết lên vi khuẩn *H. pylori*

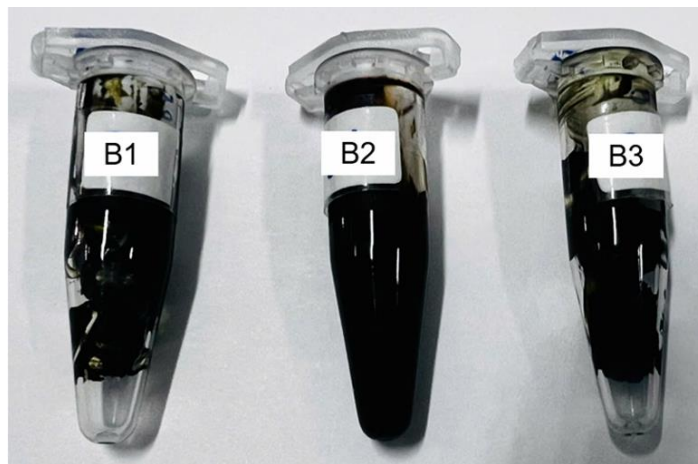
3.1.1. Khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* của các loại cao chiết từ lá bơ Booth

Từ 1 kg lá bơ booth được chiết với các dung môi khác nhau thu được cao chiết trình bày trong **Bảng 3.1**

Bảng 3.1. Kết quả chiết lá bơ với 3 loại dung môi khác nhau

Dung môi	Lượng lá bơ booth	Lượng cao chiết(gram)
Nước cất	1kg	201
Etanol	1kg	205
<i>n</i> -hexan	1kg	211

Cao chiết được dán nhãn là B1 được chiết xuất bằng nước cất; B2 được chiết xuất bằng etanol; B3 chiết xuất bằng *n*-hexan và bảo quản ở 4 °C cho đến khi sử dụng.



Hình 3.1. Ba cao chiết từ lá bơ Booth với B1 được chiết xuất bằng nước cất; B2 được chiết xuất bằng etanol; B3 chiết xuất bằng *n*-hexan

Cao chiết được kiểm tra bằng *H. pylori* HP09 và kết quả là trình bày trong **Bảng 3.2**

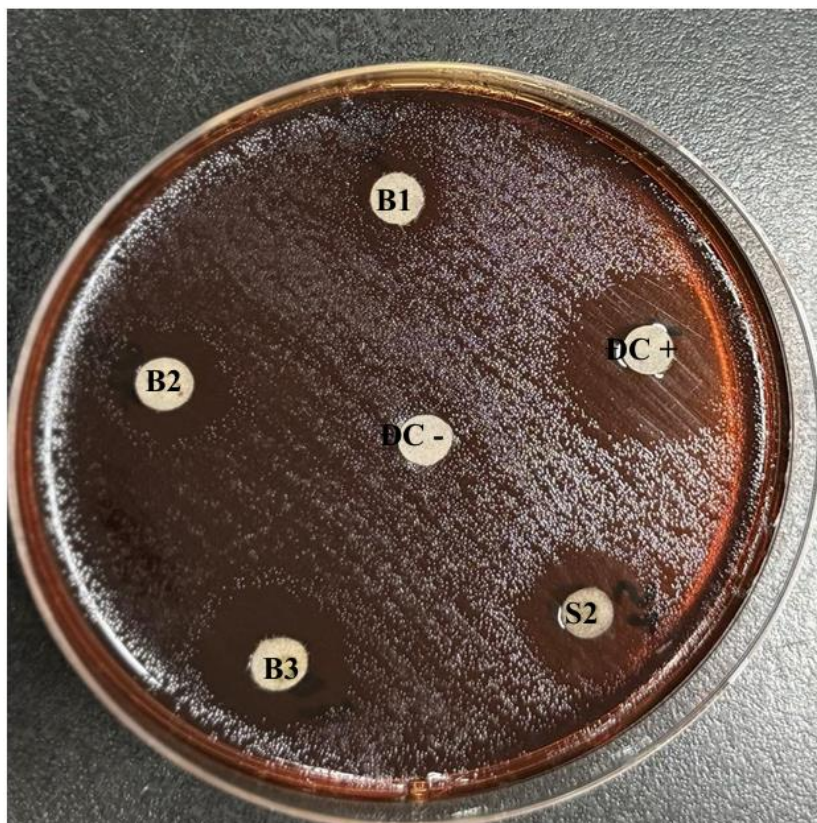
Bảng 3.2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi khuẩn *H. pylori* của các cao chiết trên các dung môi khác nhau.

Ký hiệu mẫu	Dung môi sử dụng chiết lá bơ	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Hoạt tính kháng khuẩn	So với đối chứng dương (%)
B1	nước cất	10,5±1,2	4,5±1,2	25
B2	etanol	13,2±1,4	7,2±1,4	40
B3	<i>n</i> -hexan	20±1,6	14±1,6	77,7
ĐC dương		24±0,2	18±0,2	100
ĐC âm		6	0	0

Hàm lượng hoạt chất sinh học có trong lá bơ Booth có thể kháng vi khuẩn *H.pylori* HP09 tương đương 5-17,54 mg/ml amoxicillin. Trong đó, *n*-hexane là dung môi tốt nhất để chiết xuất các hợp chất có được tính từ lá bơ. Theo Owolabi và cộng sự (2010), ethanol được sử dụng làm dung môi để chiết xuất các thành phần thực vật có hoạt tính sinh học của lá cây bơ [25]. Trong nghiên cứu này isorhamnetin, luteolin, rutin, quercetin và apigenin đã được phân lập. Do đó, kết quả thu được trong nghiên cứu này có thể phù hợp với nghiên cứu trên. Chiết xuất hexane được sử dụng để nghiên cứu trong các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả thu được ở **Hình 3.2** và **Bảng 3.2** cho thấy tất cả các cao chiết đều có khả năng kháng lại vi khuẩn *H. pylori* HP09 và cao chiết *n*-hexan (B3) có khả năng kháng khuẩn cao nhất.

Theo các công bố của Boadi và cộng sự (2015), Melgar và cộng sự (2018) và nhiều tác giả khác, trong lá bơ có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn [31,32]. Nguyen Thi Van Linh và cộng sự (2021) đã chứng minh bột lá bơ có thể kháng được một số nhóm vi sinh vật gây bệnh như *Shigella sonnei* ATCC 9290, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, và *Bacillus cereus* ATCC 11778). Tuy nhiên cho tới nay chưa có nhiều các công bố về việc dùng các cao chiết từ lá bơ để kháng vi khuẩn *H. pylori* gây bệnh viêm loét dạ dày [33].



Hình 3.2. Khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết từ lá bơ

B1 là cao chiết bằng nước cất; B2 là cao chiết bằng ethanol; B3 là cao chiết bằng *n*-hexan; S2 là một loại cao chiết lá bơ khác bằng ethanol, DC+ là đối chứng dương; DC- là đối chứng âm.

Hoạt tính kháng khuẩn có trong cao chiết của lá bơ là do sự hiện diện của các hợp chất kháng khuẩn, cụ thể là saponin, tannin và flavonoid [34]. Các hợp chất flavonoid có trong lá bơ được biết là có chức năng kháng khuẩn [35]. Flavonoid ức chế sự phát triển của vi khuẩn bằng cách làm hỏng thành tế bào, làm bất hoạt enzyme, liên kết với chất kết dính và làm hỏng màng tế bào [36,37]. Theo một nghiên cứu có báo cáo rằng saponin có thể ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn bằng cách giảm sức căng bề mặt của thành tế bào và tương tác với thành tế bào vi khuẩn dẫn đến sự ly giải. Cơ chế hoạt động của tannin như một chất kháng khuẩn là làm cho tế bào *Porphyromonas gingivalis* bị ly giải. Điều này xảy ra do tannin nhắm vào thành polypeptide của thành tế bào vi khuẩn nên sự hình thành thành tế bào trở nên kém hoàn hảo và sau đó tế bào vi khuẩn sẽ chết [38].

Tỉ lệ dung môi – dược liệu tăng giúp tăng khả năng hoà tan của hoạt chất nhờ đó nâng cao hiệu suất chiết, tuy nhiên cần tối ưu hoá điều kiện này để cân

bằng giữa hiệu suất chiết và chi phí.

3.1.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu -MIC

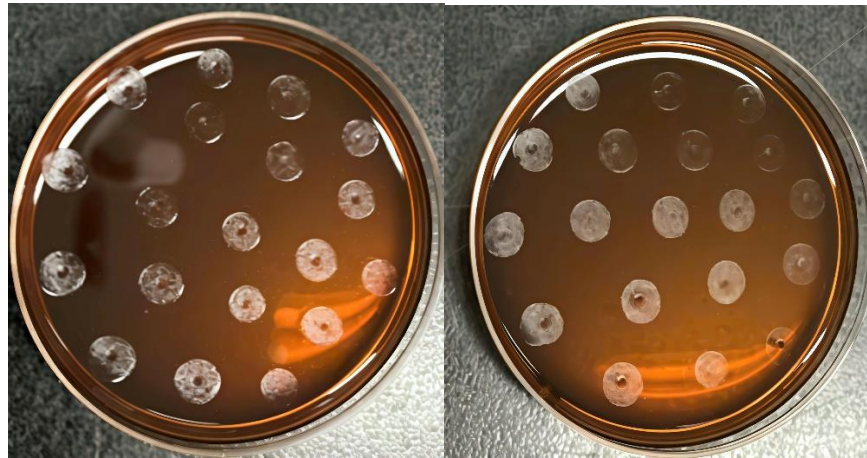
Cao chiết *n*-hexan được pha loãng thành một dải các nồng độ bao gồm: 0; 28.5; 71.5; 143 và 215 µg/ml và tiến hành thử khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* HP09. Nồng độ ức chế tối thiểu được trình bày trong **Hình 3.3**.

Kết quả ở **Hình 3.3** cho thấy nồng độ 71,5 µg/ml là nồng độ thấp nhất có khả năng kháng lại vi khuẩn *H. pylori* HP09 và nồng độ này được xác định là MIC của cao chiết hexan.

Một số nghiên cứu về các thành phần lá và hạt bơ có khả năng kháng khuẩn *H. pylori* [5,15,39,40,41]. Athaydes và cộng sự (2017) đã viết rằng chiết xuất hexan hạt bơ có thể chống lại hai chủng vi khuẩn *H. pylori* ATCC 43504 và 43629 gây loét dạ dày. Chiết xuất hydroalcoholic (SCE) và các phân đoạn hexan (SHP) và etyl axetat (SEAP) của nó đã được làm sáng tỏ MIC và MBC (Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu) với các chủng vi khuẩn *H. pylori* đó. Kết quả cho thấy SEAP và SHP có MIC và MBC là 128 µg/ml khi kiểm tra bằng ATCC 43504 và 256 µg/ml với ATCC 43629. Trong khi đó, SHP có MIC là 256 và MBC là 1024 µg/ml [15]. Wijaya (2020) đã xác nhận rằng chiết xuất lá bơ chứa các hợp chất như alkaloid, flavonoid, tannin và saponin có khả năng kháng khuẩn như chống lại *H. pylori*, *E. coli*, *B. subtilis*,... [39].

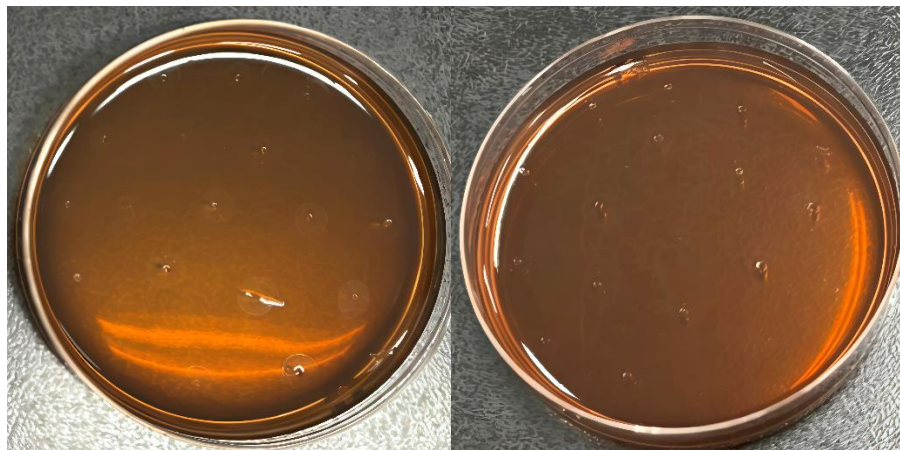
Nhiều loại cây đã được sử dụng làm thuốc trong một thời gian dài vì chúng ít tác dụng phụ [5,30,41]. Nhiều sản phẩm tự nhiên và các dẫn xuất mới của chúng đã được phát triển thành các loại thuốc mới hoặc thuốc được chấp thuận để điều trị bệnh ở người và đóng vai trò quan trọng trong việc khám phá và phát triển thuốc [15]. Hơn nữa, các sản phẩm tự nhiên có thể ức chế vi khuẩn *H. pylori* và chúng có thể được sử dụng như các giải pháp thay thế để ngăn ngừa và kiểm soát nhiễm trùng vi khuẩn *H. pylori* [41,42]. Tại Việt Nam, Vũ Nam (2000) phát hiện ra rằng thành phần hóa học của lá trà không có thể tiêu diệt vi khuẩn *H. pylori* gây loét dạ dày [42]. Tuy nhiên, có rất ít ấn phẩm về chiết xuất lá bơ có khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori*. Chiết xuất lá bơ đã được công bố là có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa, v.v. [39,41,42]. Nasri và cộng sự (2024) [43] đã đề cập rằng chiết xuất ethanol của lá bơ chống lại *K.*

pneumoniae gây bệnh và *P. mirabilis*. MIC là 3,125 mg/ml ở hai loại vi khuẩn. MBC là 200 mg/ml với *K. pneumoniae* và 100 mg/ml với *P. mirabilis*.



0 µg/ml

28.5 µg/ml



71.5 µg/ml

143 µg/ml



215 µg/ml

Hình 3.3. Nồng độ ức chế tối thiểu vi khuẩn *H. pylori* HP09 của cao chiết n-hexan

Từ kết quả của những nghiên cứu đi trước và kết quả nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết n-hexan từ lá bơ là 71,5 ug/ml có thể thấy lá bơ có tiềm năng trở thành nguồn nguyên liệu tự nhiên cho các sản phẩm kháng khuẩn, hỗ trợ điều trị bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn. Tuy nhiên, cần có nghiên cứu sâu hơn để xác định cơ chế hoạt động và ứng dụng thực tế.

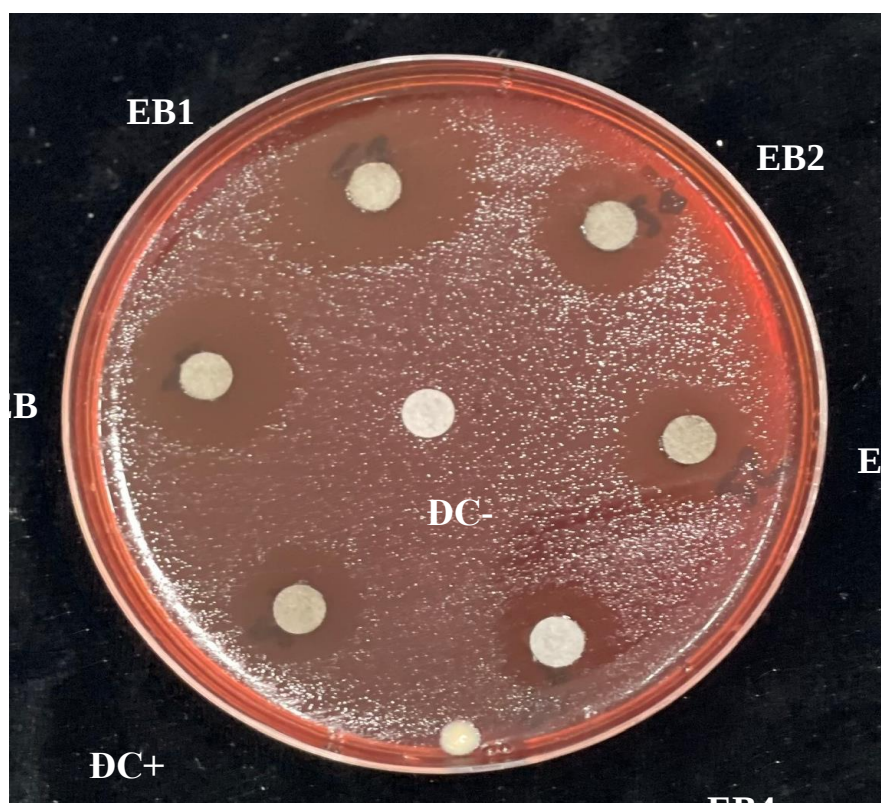
3.2. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ, tỷ lệ dung môi đến quy trình chiết xuất cao chiết để có được hoạt tính tốt nhất

3.2.1. Khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* tại các nồng độ cao chiết khác nhau từ lá bơ Booth

Kết quả thử hoạt tính của các cao chiết với tỉ lệ khác nhau (thể tích dung môi: trọng lượng mẫu) được thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn (**Bảng 3.3** và **Hình 3.4**).

Bảng 3.3. Kết quả thử khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* của các cao chiết

Ký hiệu mẫu	Tỉ lệ thể tích dung môi : khối lượng mẫu	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Hoạt tính kháng khuẩn	So với đối chứng dương (%)
EB	5:1	18,5±0,5	12,5±0,5	625
EB1	10:1	20,7±0,3	14,7±0,3	735
EB2	15:1	19,3±0,2	13,3±0,2	615
EB3	20:1	14±0,3	8±0,3	400
EB4	25:1	13,6±0,5	7±0,5	350
ĐC dương		8±0,1	2±0,1	100
ĐC âm		6±0,5	0±0,5	0



Hình 3.4. Thử nghiệm khả năng kháng *H. pylori* của các cao chiết EB, EB1, EB2, EB3 và EB4. (EB: 5:1; EB1: 10:1; EB2: 15:1; EB3: 20:1; EB4: 25:1)

Kết quả cho thấy cả 5 cao chiết EB, EB1, EB2, EB3 và EB4 đều có hoạt tính kháng HP trong đó EB, EB1 và EB2 là những chất có hoạt tính kháng HP rất mạnh so với các chất kháng HP mạnh vừa còn lại. Hàm lượng tương đương 22,05, 18,75 và 18,45 mg/ml amoxicilline. Kết quả khảo sát tỉ lệ dung môi/lá bơ cho thấy tỉ lệ dung môi/lá bơ = 10:1 (ml/g) có hoạt tính kháng HP cao nhất. Khi tăng tỉ lệ dung môi lên 15:1 (ml/g), hoạt tính kháng HP giảm, tuy nhiên lượng cao thu được tăng lên. Khi tiếp tục tăng tỉ lệ dung môi/lá bơ = 20:1 và 25:1 (ml/g), hoạt tính kháng HP và khối lượng cao thu được không có sự thay đổi đáng kể (**Hình 3.4**). Do đó chọn tỉ lệ dung môi/lá bơ = 10:1 ml/g cho các khảo sát tiếp theo để có hoạt tính kháng HP được cao hơn, đồng thời sự chênh lệch về hàm lượng cao giữa hai tỉ lệ chiết 10:1 và 15:1 là không lớn.

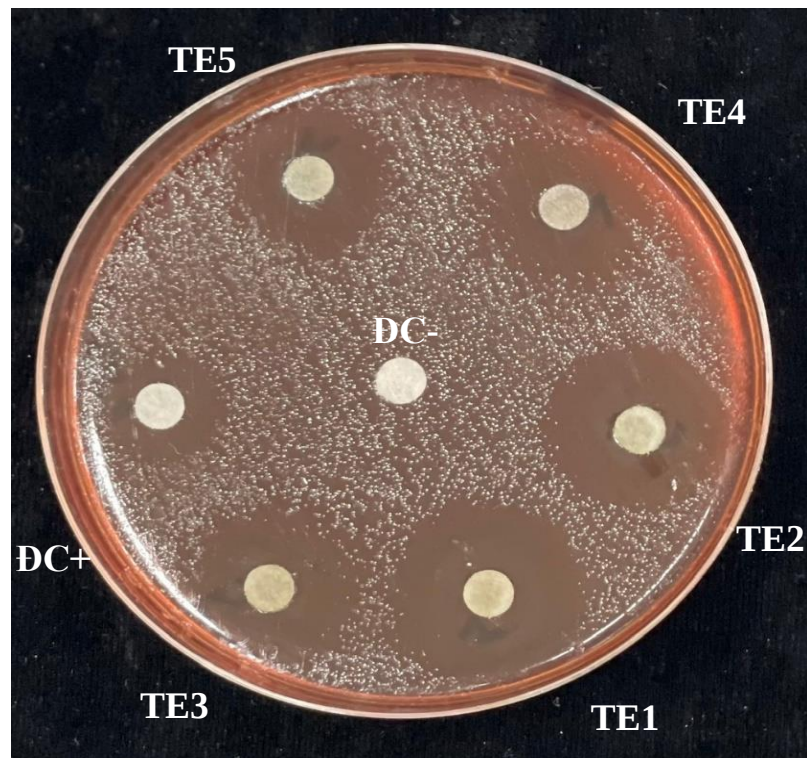
Nghiên cứu được thực hiện bởi Madhani (2020) cho biết nồng độ chiết xuất ethanol từ lá bơ càng cao thì vùng ức chế hình thành càng lớn [44]. Nồng độ chiết xuất càng cao thì độ hòa tan càng thấp (đặc như gel), do đó điều này có thể làm chậm quá trình khuếch tán các hoạt chất của chiết xuất vào môi trường và cuối cùng làm giảm khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn của các chiết xuất có nồng độ cao [45]. Do chứa hầu hết các chất có tính phân cực

mạnh là anthocyanin và acid phenol đơn vòng, dung môi thường được sử dụng để chiết xuất là etanol, nước hay hỗn hợp của chúng. Việc sử dụng loại dung môi nào để chiết xuất sẽ tùy vào mục đích của nghiên cứu, hay hoạt tính sinh học mà phân đoạn chiết thể hiện. Nghiên cứu trên các loại vi khuẩn khác nhau cho thấy dịch chiết ethanol lá bơ nồng độ 20, 40, 60, 80 và 100% được xếp vào loại kháng thuốc theo CLSI (2013) trong việc ức chế sự phát triển của vi khuẩn *S. aureus* và *S. typhi* [46,47,48]

Một nghiên cứu có liên quan khác cho thấy hoạt tính kháng cholinergic ở lá bơ. Chiết xuất hydroalcoholic của lá chứng minh khả năng ức chế mạnh các enzym acetylcholine và butyrylcholine, dao động từ 0,0168 đến 0,0171 và 0,0214 đến 0,0226 IC_{50} , $\mu g/ml$, tương ứng, có khả năng được sử dụng để điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh. Chiết xuất lá bơ cũng cho thấy hoạt động chống oxy hóa mạnh trong khoảng từ 240 đến 601 IC_{50} , $\mu g/ml$ [49]. Srianthie và cộng sự đã nghiên cứu hoạt động chống oxy hóa, kháng khuẩn và chống viêm tiềm tàng của chiết xuất lá bơ dạng nước. Chiết xuất cho thấy hoạt động chống oxy hóa thấp hơn so với axit ascorbic tham chiếu, lần lượt là 11,3–52,3% và 28,0–90,7%. Tuy nhiên, nó vẫn thể hiện tiềm năng hoạt động như một chất dọn gốc tự do trong việc bảo vệ các phân tử sinh học và ngăn ngừa nhiều bệnh khác nhau. Ngoài ra, hoạt động chống viêm của chiết xuất trong quá trình phân hủy tế bào hồng cầu của người đã được đo, dẫn đến khả năng bảo vệ màng là 48,0–60,6% trái ngược với 39,7–49,0% quan sát thấy ở aspirin, cho thấy chiết xuất lá bơ cung cấp khả năng bảo vệ màng cao hơn aspirin [50]. Dabas và cộng sự đã nghiên cứu hoạt động chống oxy hóa của chiết xuất từ hạt bơ có màu cũng như tiềm năng ức chế ung thư trong ống nghiệm của chiết xuất này [51], và theo tài liệu, chiết xuất ethanol từ lá cho thấy hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với chiết xuất bằng nước [52].

3.2.2. Khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* của các cao chiết từ lá bơ Booth ở các nhiệt độ khác nhau

Kết quả thử hoạt tính của các cao chiết ở các nhiệt độ khác nhau trên các đĩa được thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn như sau (**Bảng 3.4, Hình 3.5**):



Hình 3.5 Thử nghiệm khả năng kháng *H. pylori* của các cao chiết TE1, TE2, TE3, TE4 và TE5, (TE1: nhiệt độ đun 50 °C; TE2: nhiệt độ đun 60 °C; TE3: nhiệt độ đun 70 °C; TE4: nhiệt độ đun 80 °C; TE5: nhiệt độ đun 100 °C)

Bảng 3.4. Kết quả thử khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* của các cao chiết với các điều kiện nhiệt độ khác nhau

Ký hiệu mẫu	Nhiệt độ đun (°C)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Hoạt tính kháng khuẩn	So với đối chứng dương (%)
TE1	50	20±0,4	14±0,4	700
TE2	60	20,8±0,5	14,8±0,5	740
TE3	70	14±0,3	8±0,3	400
TE4	80	19±0,2	13±0,2	650
TE5	100	14,8±0,2	8,8±0,2	440
ĐC dương		8±0,2	2±0,2	100
ĐC âm		6±0,5	0±0,5	0

Kết quả cho thấy ở tất cả các nhiệt độ 50, 60, 70, 80 và 100 °C, các cao chiết đều có hoạt tính kháng HP trong đó các cao chiết ở nhiệt độ 50, 60 và 80 °C (tương ứng là TE1, TE2 và TE4) là những cao chiết có hoạt tính kháng *H. pylori* rất mạnh so với các cao chiết còn lại. Hàm lượng tương đương 21; 22,2 và 19,5 mg/ml amoxicilline. Đặc biệt, gia nhiệt ở nhiệt độ 60 °C cho kết quả tốt nhất (22,2 mg/ml).

Yamassaki và cộng sự trước đây đã báo cáo không có sự giảm hàm lượng phenolic hoặc hoạt động chống oxy hóa khi đun nóng dung dịch cồn hydroalcoholic lá bơ ở nhiệt độ 40–100 °C trong hơn 8 giờ và tổng hàm lượng phenolic hoặc hoạt động chống oxy hóa của các chiết xuất không giảm [53]. Theo các tài liệu nghiên cứu về công nghệ tách chiết thì công nghệ chiết xuất hỗ trợ gia nhiệt Ohmic (OHAE) và chiết xuất hỗ trợ vi sóng (MAE). OHAE cho phép chiết xuất hiệu quả hơn các hợp chất hoạt tính sinh học bằng cách tạo ra quá trình điện di trong mô tế bào [54], trong khi MAE dựa trên tác động trực tiếp lên các hợp chất phân cực bằng cách phân cực các phân tử nước phân cực trong thực phẩm và mang lại những lợi thế như gia nhiệt nhanh hơn để chiết xuất các hợp chất hoạt tính sinh học, do đó giảm thời gian chiết xuất và tạo ra năng suất cao hơn [55]. Gumustepe và cộng sự đã so sánh cả OHAE và MAE để làm tăng giá trị của lá bơ, thu được lần lượt 37,35 và 23,32 mg TPC trên 100 g chiết xuất. Từ các nghiên cứu, các tác giả tin rằng nhiệt độ cao cần thiết trong MAE ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của các hợp chất polyphenolic [56]. Ngoài ra, nhiệt độ tăng có thể dẫn đến hiệu suất chiết xuất cao hơn do độ hòa tan và tính di động của các hợp chất phenolic trong dung môi tăng lên.

Tuy nhiên Oke và cộng sự đã chỉ ra rằng nhiệt độ là yếu tố quan trọng quyết định thành phần dịch chiết. Việc sử dụng nhiệt độ rất cao có thể gây ra sự phân hủy các hợp chất phenolic, dẫn đến giảm nồng độ của chúng trong dung dịch chiết xuất. Có một khoảng nhiệt độ tối ưu giúp tăng hiệu suất thu hồi mà không làm hỏng các hợp chất phenolic [57]. Theo Maillard và Berset (1995) sự thay đổi hàm lượng phenolic trong các mẫu chịu nhiệt độ cao có thể xảy ra thông qua ba cơ chế có thể xảy ra: bằng cách giải phóng phenolic các dẫn xuất acid liên kết với các đại phân tử như axit cumaric liên kết với lignin hoặc axit ferulic liên kết với arabinoxylans; bằng cách phân hủy một phần lignin và giải phóng các acid phenolic như acid hydroxycinnamic; hoặc do suy thoái nhiệt [58]. Một số nghiên cứu đã báo cáo rằng sấy trong không khí khô với nhiệt độ từ 90°C đến 160°C, có thể tạo ra chiết xuất có chứa melanoidin, với tác dụng chống oxy hóa rất mạnh [59]. Tuy nhiên, phần lớn các báo cáo cho rằng khả năng sấy khô cao nhiệt độ có thể làm giảm nồng độ các hợp chất phenolic trong chiết xuất thực vật thông qua nhiệt như nghiên cứu của Katsube và cộng sự (2009) và Djendoubi Mrad và cộng sự (2012) [60,61]. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy khô trong không khí đến sự ổn định của polyphenol và hoạt động chống

oxy hóa trong lá dâu được mô tả bởi Katsube và cộng sự (2009) chỉ ra rằng nhiệt độ dưới 60°C không ảnh hưởng đến độ ổn định của hàm lượng phenolic [60]. Tuy nhiên, có một sự thay đổi đáng kể và hoạt tính chống oxy hóa giảm dần khi sử dụng nhiệt độ trên 70°C, cho thấy sự giảm nhiệt đó là cơ chế chính hỗ trợ cho phát hiện của Yamassaki và cộng sự (2017) [53]. Như vậy, kiểm soát chính xác nhiệt độ sấy là rất quan trọng để duy trì hàm lượng hợp chất phenolic cao và đặc tính chống oxy hóa của chiết xuất lá bơ.

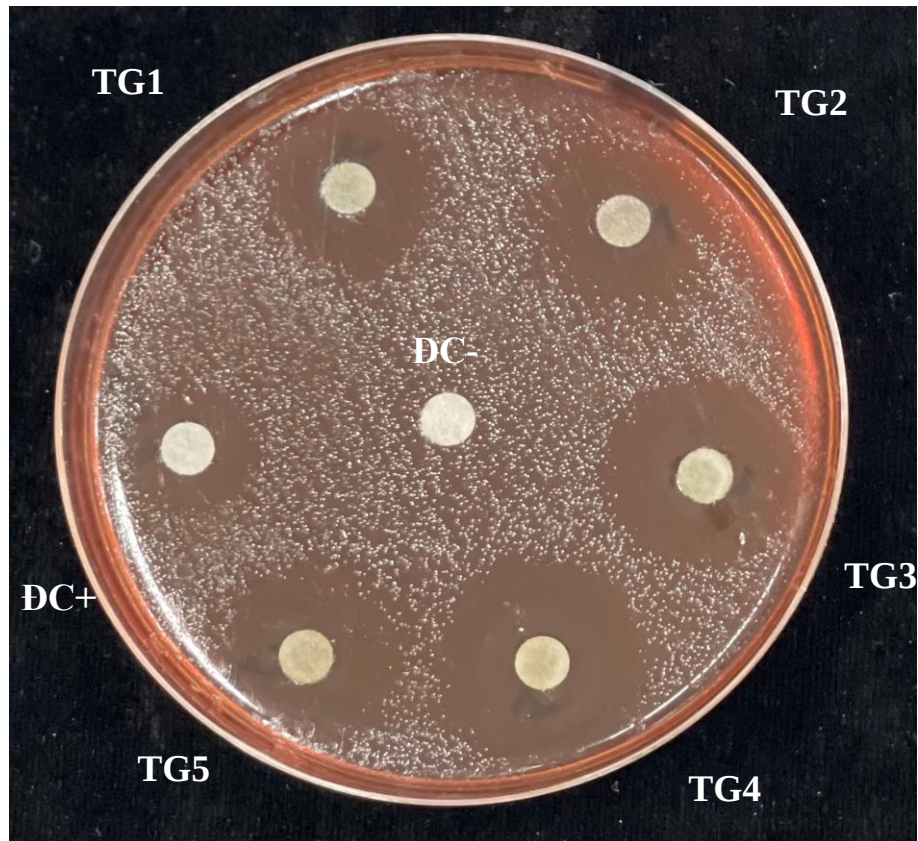
Các nghiên cứu trên hoàn toàn phù hợp với kết quả của thí nghiệm. Vì vậy việc lựa chọn nhiệt độ đun là 60 °C là phù hợp với hướng nghiên cứu của đề tài.

3.2.3. Khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* của các cao chiết từ lá bơ Booth ở các thời gian khác nhau

Từ kết quả ở nhiệt độ gia nhiệt, nhiệt độ 60 °C đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả thử hoạt tính của các chất trên các đĩa được thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn như sau (**Bảng 3.5** và **Hình 3.6**):

Bảng 3.5. Kết quả thử khả năng kháng vi khuẩn *H. pylori* của các cao chiết với các thời gian chiết khác nhau

Ký hiệu mẫu	Thời gian chiết	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Hoạt tính kháng khuẩn	So với đối chứng dương (%)
TG1	60 phút	16,8±0,4	10,8±0,4	450
TG2	90 phút	18,5±0,2	12,5±0,2	520
TG3	120 phút	23,5±0,5	17,5±0,5	729
TG4	150 phút	24,8±0,6	18,8±0,6	783
TG5	180 phút	16,4±0,1	10,4±0,1	433
ĐC dương		8,4±0,4	2,4±0,4	100
ĐC âm		6±0,1	0±0,1	0



Hình 3.6. Thử nghiệm khả năng kháng *H. pylori* của các cao chiết TG1, TG2, TG3, TG4 và TG5. (TG1: 60 phút, TG2: 90 phút; TG3: 120 phút; TG4: 150 phút và TG5: 180 phút)

Kết quả cho thấy tất cả các cao chiết ở các thời gian gia nhiệt khác nhau tại nhiệt độ 60 °C đều cho hoạt tính kháng vi khuẩn *H. pylori* rất tốt. Đặc biệt ở các giá trị thời gian gia nhiệt là 120 phút (TG3) và 150 phút (TG4) cao chiết cho hoạt tính cao nhất. Hàm lượng tương đương 21,87 và 23,49 mg/ml amoxicilline. Tuy nhiên, khi so sánh về thời gian gia nhiệt thì thấy rằng, với giá trị thời gian là 120 phút thì kết quả không chênh lệch nhiều so với khi gia nhiệt 150 phút nhưng lại tiết kiệm được năng lượng hơn (hơn về 30 phút gia nhiệt). Sự khác biệt về thời gian chiết xuất giữa các kỹ thuật này cho thấy lợi thế của việc thu hồi phenolic từ lá bơ về mặt tiết kiệm thời gian và năng lượng bằng cách thực hiện quá trình chiết xuất trong thời gian ngắn hơn. Do đó, thời gian gia nhiệt là 120 phút đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Nhìn chung, kết quả của nghiên cứu hiện tại cũng phù hợp với các tài liệu và cho thấy phương pháp ngâm truyền thống là một công nghệ đầy hứa hẹn để chiết xuất các hợp chất có giá trị cao với hiệu suất chiết xuất cao hơn, thời gian chiết

xuất ngắn hơn và mức tiêu thụ dung môi thấp hơn [62]. Ngoài ra, phương pháp ngâm, gia nhiệt có thể dễ dàng được mở rộng quy mô cho các ứng dụng công nghiệp để chiết xuất nhiều loại hợp chất, bao gồm protein, polyphenol và các hợp chất hoạt tính sinh học khác [62,63]. Tuy nhiên, trong các tài liệu, có các nghiên cứu khác nhau tiến hành chiết xuất bằng các phương pháp chiết xuất khác nhau.

Theo như các nghiên cứu các axit phenolic và flavonoid đều có khả năng hoạt động như chất chống oxy hóa và kháng khuẩn, cho phép các chiết xuất giàu các hợp chất này được sử dụng làm phụ gia thực phẩm và dược phẩm. Axit gallic, là một axit phenolic, đã được báo cáo là có hoạt tính chống oxy hóa, chống đái tháo đường, chống viêm và kháng khuẩn [64,65]. Các flavonoid khác nhau, như dẫn xuất catechin và axit trans-5-O-caffeoyl-D-quinic, đã cho thấy hoạt động chống viêm tiềm tàng, trong khi các polyphenol khác như quercetin, epicatechin, rutin và axit chlorogenic đã được báo cáo là thuốc chống đái tháo đường tiềm tàng, vì khả năng ức chế enzym glucosidase của chúng [66].

Rodríguez-Martínez và cộng sự đã chọn năm DES khác nhau và đánh giá hiệu quả của chúng bằng cách đo hàm lượng phenolic và flavonoid của chúng, và tất cả các DES được thử nghiệm đều cho kết quả tốt hơn khi so sánh với etanol. Kết quả TPC cao nhất đối với DES là 92,03 và 92,09 mg GAE/g AP khô, trong khi etanol cho thấy 25,27 mg GAE/g AP khô [67]. Thời gian chiết xuất cũng có thể ảnh hưởng lớn đến năng suất chiết xuất; tuy nhiên, hầu hết các tác giả đều thấy rằng nó mang tính thử nghiệm cao, tùy thuộc vào phương pháp chiết xuất và dung môi được sử dụng.

Tuy nhiên, trong nghiên cứu hiện tại, lá bơ khô, rắn và dẫn điện kém, đã được sử dụng trong hệ thống OHAE để chiết xuất các hợp chất hoạt tính sinh học. Do đó, cần phải áp dụng điện trường cao hơn có thể dẫn đến sự phân hủy một số hợp chất hoạt tính sinh học trong lá. Trong tài liệu, người ta cho rằng sự phân hủy các hợp chất này có thể xảy ra trong quá trình này do tác động của nhiệt và/hoặc sự phân hủy điện hóa. Hơn nữa, cơ chế và thông số động học của phản ứng phân hủy này có thể bị ảnh hưởng bởi sự tương tác giữa vật liệu điện cực và sản phẩm điện [68].

Trong các nghiên cứu khác nhau, thành phần phenolic của lá bơ cũng được báo cáo, ví dụ, Polat Kose và cộng sự đã sử dụng HPLC–MS để xác định các hợp chất phenolic (mg/kg) trong nước đông khô và chiết xuất ethanol của lá bơ

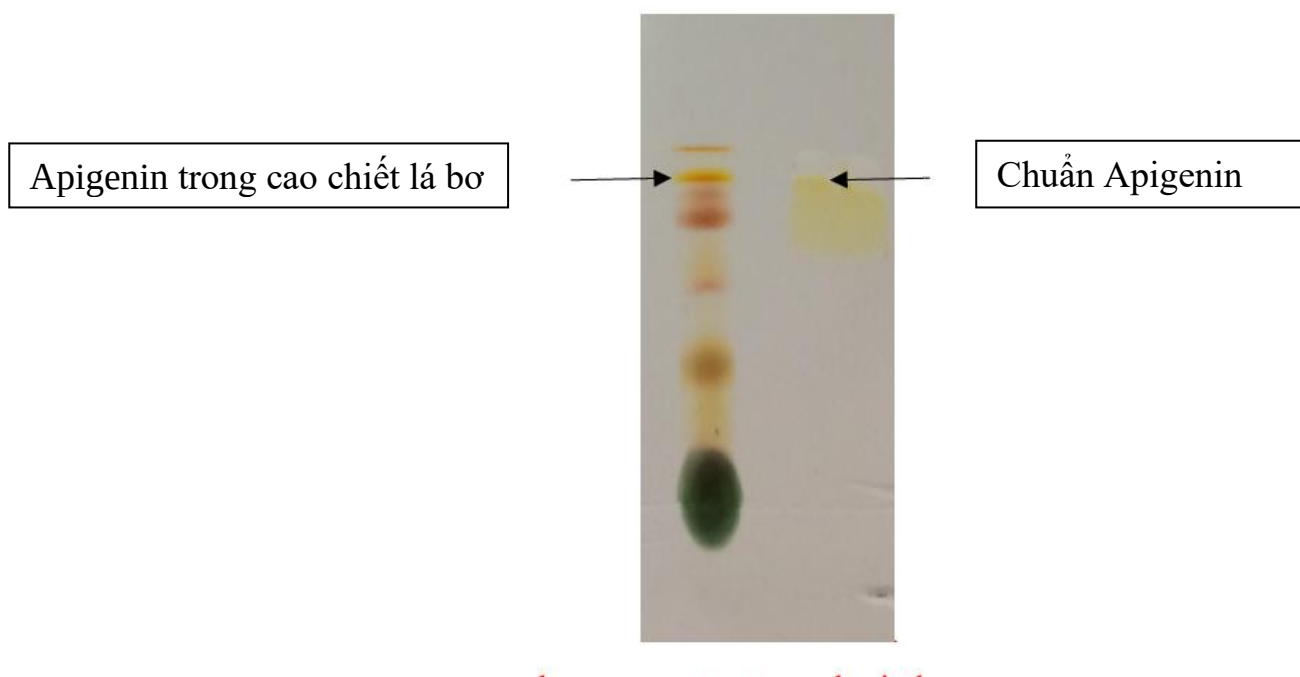
khô. Phát hiện của họ cho thấy sự hiện diện của axit caffeic (10,83–32,74 mg/kg), axit chlorogenic (28,83–852,81 mg/kg) và rutin (26,05–68,41 mg/kg) [19]. Trong một nghiên cứu khác, các hợp chất phenolic (mg/100 g) trong chiết xuất nước lá bơ được định lượng sau khi sử dụng methanol và chiết xuất axit HCl như sau: axit shikimic (31,65), axit *p*-hydroxybenzoic (2,51), axit ferulic (7,09) và epicatechin (2,84) bằng sắc ký khí [69]. Yamassaki và cộng sự đã phân tích tác động của các phương pháp sấy và điều kiện bảo quản khác nhau đến việc bảo quản hợp chất phenolic trong lá bơ. Nghiên cứu phát hiện ra rằng hợp chất phenolic chính trong lá bơ là axit chlorogenic, tiếp theo là catechin, epicatechin, procyanidin B2 và rutin [53]. Một báo cáo gần đây hơn đã phân tích hàm lượng phenolic trong lá của bảy giống bơ Mexico được chiết xuất bằng ethanol sử dụng UAE. Thành phần phenolic được phát hiện bằng LC–MS [53,70]. Hợp chất phenolic chiếm ưu thế của tất cả các giống (chiết xuất mg/g) được phát hiện là axit chlorogenic trong khoảng từ 40,8 đến 63,9. Các kết quả thu được của đề tài phù hợp với các nghiên cứu trên.

3.3 Xác định sơ bộ thành phần hóa học của dịch chiết thô và các dịch chiết phân đoạn làm cơ sở xác định những phân đoạn có tiềm năng

3.3.1 Xác định các thành phần hoạt tính sinh học bằng sắc ký lớp mỏng (TLC)

Trong một số nghiên cứu quercetin và apigenin được chứng minh là thành phần có trong lá cây bơ. Quercetin được cho là có thể giảm huyết áp nhờ tác dụng giãn mạch. Ngoài ra hợp chất này còn ức chế quá trình oxy hóa LDL-cholesterol, giảm nguy cơ hình thành mảng bám động mạch và chống viêm, giảm stress oxy hóa liên quan đến bệnh tim. Trong khi đó apigenin là chất chống oxy hóa, bảo vệ tế bào nội mô mạch máu, chống viêm, giảm nguy cơ xơ vữa động mạch, điều hòa huyết áp và cải thiện chức năng mạch máu. [71,72]. Trong nghiên cứu hiện tại, các chất trên được mua để sử dụng làm chuẩn. Bằng cách so sánh R_f của các chuẩn đó, hợp chất hoạt tính sinh học trong chiết xuất *n*-hexane lá bơ Booth được đề xuất là apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavone) (**Hình 3.7**). Độ hấp thụ (y) của dung dịch apigenin được quan sát thấy ở 340 nm. Hàm lượng apigenin (x) trong chiết xuất thu được được tính bằng cách nội suy độ hấp thụ mẫu đã đo vào đường cong hiệu chuẩn được xác định bằng dung

dịch chuẩn apigenin, được xác định cho phạm vi nồng độ 0,02–0,1 mg/ml ($y = 7,0125x + 0,0401$, $R^2 = 0,997$).

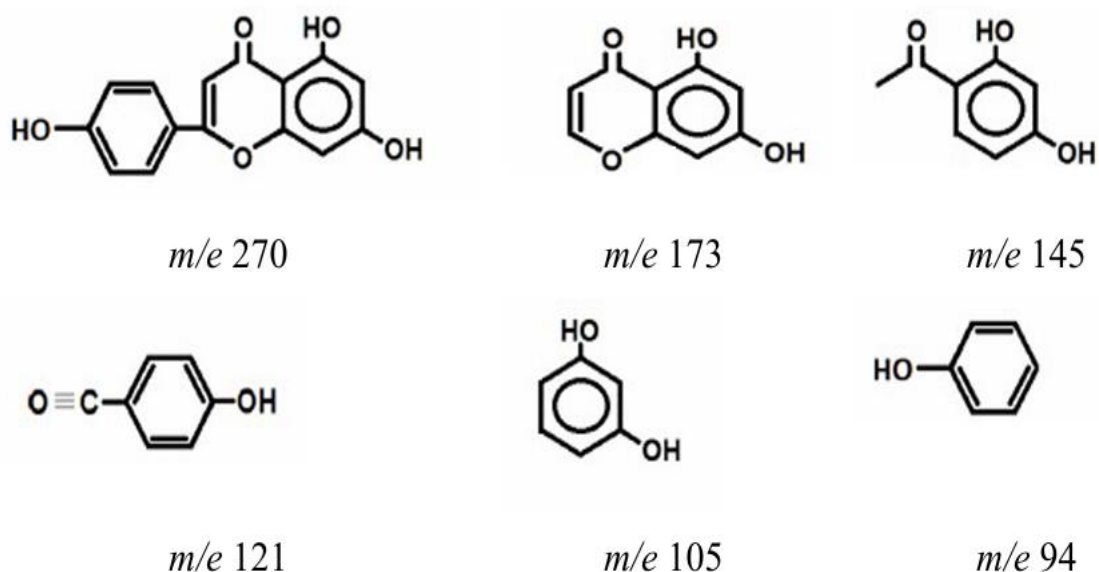


Hình 3.7 Phân tích chiết xuất *n*-hexane lá bơ bằng TLC

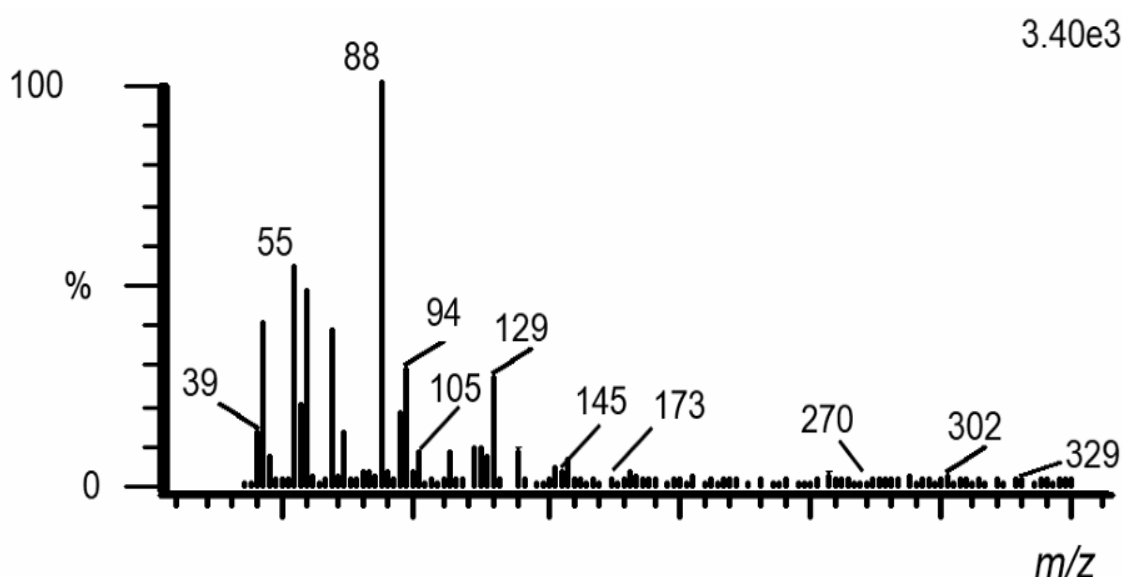
3.3.2 Phân tích sắc ký khí khối phổ

Phổ khối của hợp chất giả định cho thấy khối lượng phân tử ở m/e 270 và chứa các ion mảnh đặc trưng m/e 173, 145, 121, 105 và m/e 94 được thể hiện trong **Hình 3.8** và **Hình 3.9**. Những kết quả này có thể gợi ý để đề xuất thành phần trong chiết xuất *n*-hexane lá bơ Booth là apigenin. Tuy nhiên, để xác nhận gợi ý này, cần phải tiến hành thêm nhiều phân tích khác như NMR, HPLC, v.v.

Apigenin là flavonoid phổ biến từ rau và trái cây [71]. Apigenin là một trong những tác nhân có hoạt tính sinh học và dược lý mạnh nhất [25]. Nhiều hoạt động sinh học được cho là do hợp chất này mang lại như hoạt động chống viêm, chống ung thư, chống oxy hóa giúp ngăn chặn hình thành các gốc tự do và chống dị ứng [28,72]. Sự hiểu biết về các đặc tính này rất quan trọng để thúc đẩy việc nhân rộng chế phẩm và là tiền đề để hỗ trợ trong việc sử dụng các đặc tính này in vitro (trong ống nghiệm) và in vivo (trong cơ thể).



Hình 3.8. Các mảnh Ion của hợp chất giả định



Hình 3.9. Phổ khối của hợp chất tổng hợp được

Apigenin đã được chứng minh là có khả năng chống lại một số vi sinh vật [28,71, 72]. Nghiên cứu của Wang và cộng sự (2013) về apigenin trên dòng tế bào biểu mô dạ dày MKN45 nhiễm *Helicobacter pylori*. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc điều trị bằng apigenin đã làm tăng đáng kể biểu hiện của I κ B α , từ đó ức chế hoạt hóa NF- κ B, dẫn đến giảm biểu hiện của các yếu tố viêm như COX-2, ICAM-1, ROS, IL-6 và IL-8. Mức độ ROS giảm một phần nhờ khả năng tự loại bỏ của apigenin. Ngoài ra, apigenin còn tăng cường biểu hiện của MUC-2 trong các tế bào MKN45 nhiễm *H. pylori*. Việc tăng cường biểu hiện

MUC-2 góp phần bảo vệ niêm mạc dạ dày khỏi tổn thương do *H. pylori* gây ra, đồng thời hỗ trợ quá trình phục hồi và duy trì chức năng hàng rào bảo vệ của niêm mạc. Những phát hiện này gợi ý rằng apigenin có tiềm năng như một tác nhân ức chế viêm biểu mô dạ dày do *H. pylori* gây ra [73].

Nghiên cứu lâm sàng trên chuột Mông Cổ cho thấy điều trị bằng apigenin (30-60 mg/kgbw/ngày) làm giảm hiệu quả tỷ lệ viêm teo dạ dày (nhóm viêm teo dạ dày) và loạn sản/ung thư dạ dày (nhóm ung thư dạ dày) ở chuột nhảy Mông Cổ. Điều trị bằng apigenin (60 mg/kgbw/ngày) làm giảm đáng kể tình trạng xâm lấn của vi khuẩn *Helicobacter pylori* và những thay đổi mô học do vi khuẩn *Helicobacter pylori* gây ra đối với thâm nhiễm bạch cầu trung tính và bạch cầu đơn nhân và viêm teo dạ dày ở cả viêm teo dạ dày và ung thư dạ dày ở chuột nhảy Mông Cổ. Apigenin có khả năng ức chế viêm teo dạ dày do *Helicobacter pylori* gây ra và ức chế sự tiến triển của ung thư dạ dày cũng như có hoạt tính chống ung thư dạ dày mạnh mẽ [74].

Số lượng nghiên cứu về tác dụng của Apigenin tăng nhanh. Tuy vậy hiện nay mới chỉ có một số ít nghiên cứu đề cập đến apigenin có trong lá bơ.

Trong khi đó, lá bơ có sẵn ở Đắk Lắk và các tỉnh Tây Nguyên khác ở Việt Nam. Theo Menzel và Le Lagadec (2014), cây bơ thường được cắt tỉa trong cả mùa đông và mùa hè, bao gồm việc loại bỏ những cành kém sinh sản để tăng cường sự thâm nhập của ánh sáng vào hạ tán tán trong mùa hè và thúc đẩy sản xuất trái cây. Vì vậy, việc cắt tỉa sinh khối cần phải được coi là tạo ra giá trị gia tăng những sản phẩm có thể mang lại lợi ích cho cả môi trường và nền kinh tế [75]. Một số lượng đáng kể sinh khối lá bơ do hoạt động cắt tỉa được ước tính vào khoảng 780 đến 1245 kg/ha sinh khối hàng năm, nếu lượng cây trồng đúng theo tiêu chuẩn 100 cây/ha, khi đó có thể thấy đây là nguồn nguyên liệu vô cùng dồi dào và hiện chưa được tận dụng [76,77].

Tương tự như vậy, ở Việt Nam, theo nghiên cứu của Cục trồng trọt và sở nông nghiệp và phát triển nông thôn tỉnh Đắk Lắk, hàng năm cây bơ cũng được cắt tỉa lá và cũng chưa có những giải pháp tổng thể cho nguồn nguyên liệu này [78, 79].

Cây bơ đã được tác giả nước ngoài đã nghiên cứu khá kỹ về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học, trong đó đáng chú ý là lớp chất anthocyanin và

các acid phenol đơn vòng. Các nghiên cứu trong nước cũng phong phú nhưng phần lớn tập trung vào việc chiết xuất và ứng dụng nhóm anthocyanin trong thực phẩm.

Theo nghiên cứu của Đỗ Thị Thanh Trung và cộng sự (2018), quercetin, berberin và acid glycyrrhizic được tách chiết từ các thảo dược bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng cho thấy các hoạt chất này đều có khả năng ức chế sự phát triển của HP, trong đó, berberin phổ biến hơn 2 chất còn lại (20/30 loài thảo dược). 10/30 thảo dược ức chế mạnh sự phát triển của vi khuẩn HP với đường kính vòng kháng khuẩn 12-42 cm, trong đó, 8/10 loài chứa berberin và 7/10 loài chứa quercetin. Các hoạt chất này đều được phát hiện thấy trong lá bơ [26].

Nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng cây bơ có tác dụng chống loét dạ dày nhờ tác dụng ức chế và tiêu diệt vi khuẩn HP. Với các kết quả về đánh giá hoạt tính sinh học trên cho thấy, các hoạt chất từ lá bơ có tác dụng chống loét dạ dày và giảm viêm dạ dày [16]. Do vậy từ lá bơ, định hướng sản phẩm ứng dụng trong lĩnh vực Y dược của đề tài sẽ tập trung vào tác dụng điều trị viêm loét dạ dày do nhiễm vi khuẩn Hp (*Helicobacter pylori*).

Các kết quả thu được có thể mang đến tiềm năng ứng dụng của chiết xuất apigenin từ lá bơ để chống lại các tác nhân gây bệnh. Trong tương lai nghiên cứu sẽ thử nghiệm hợp chất này với các tác nhân gây bệnh khác hoặc tiến hành các nghiên cứu in vivo và nghiên cứu sản phẩm trà túi lọc hoặc thực phẩm bổ sung để hỗ trợ những bệnh nhân bị nhiễm *H. pylori*.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Đã xác định được cao chiết từ *n*-hexan cho hoạt tính kháng *H. pylori* tốt nhất và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 71.5 µg/ml.
- Cao chiết từ lá bơ Booth cho kết quả tốt nhất trong điều kiện tỷ lệ dung môi với bột lá là (10:1), nhiệt độ gia nhiệt tối ưu phù hợp nhất là 60 °C và thời gian gia nhiệt phù hợp nhất là 120 phút.
- Theo sắc ký khí khối phổ (GC/MS), phân tích cấu trúc đầu tiên của cao chiết được đề xuất là apigenin với các ion phân mảnh *m/e* 270, 173, 145, 121, 105 và 94. Lượng apigenin được xác định cho khoảng nồng độ 0,02–0,1 mg/ml.

KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả nghiên cứu này tiến hành xây dựng quy trình chiết xuất lá bơ hoàn chỉnh để ứng dụng vào việc sản xuất trà túi lọc nhằm hỗ trợ phòng bệnh viêm loét dạ dày do vi khuẩn *H. pylori* gây ra.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

STT	Tác giả	Tên kết quả công bố/đăng ký	Tên tạp chí/Nơi công bố	Năm công bố
1	Trần Thị Mai, Vũ Duy Diệu , Nguyễn Việt Linh, Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Liên, Vương Thị Nga, Lê Thị Nhi Công	Đánh giá một số điều kiện tối ưu trong quá trình chiết xuất cao chiết từ lá bơ Booth thu tập tại tỉnh Đắk Lắk	Tạp chí khoa học và công nghệ đại học Thái Nguyên Tập 230, số 02(2025)	2025
2	Le Thi Nhi Cong, Vu Duy Diieu , Nguyen Viet Linh, Tran Thi Huyen Nga, Nguyen Dinh Tien Dung	Bactericidal Effect against <i>Helicobacter pylori</i> and Chemical Profile of Booth Avocado Leaves Collected in Dak Lak Province	Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học tự nhiên và công nghệ DOI: https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5797	2025

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tạ Long, 2003, *Bệnh lý dạ dày tá tràng và vi khuẩn Helicobacter pylori*, Nhà xuất bản Y học.
2. Shaffer C.L., Gaddy J.A., Loh J.T., Johnson E.M., Hill S., Hennig E.E., McClain M.S., McDonald W.H., Cover T.L., 2011, *Helicobacter pylori* Exploits a Unique Repertoire of Type IV Secretion System Components for Pilus Assembly at the Bacteria-Host Cell Interface, *PLoS Pathogens*, 7(9).
3. Ando T., Saito Y., Kusugami M., 2006, Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer, *World Journal of Gastroenterology*, 12(2), pp. 181-186.
4. Đào Văn Long, 2014, *Bài tiết acide dịch vị và bệnh lý liên quan*, Nhà xuất bản Y học.
5. Atherton J.C., Blaser M.J., 2009, Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications, *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), pp. 2475-2487.
6. Hội tiêu hóa Hà Nội, 2015, *Những điều cần biết về vi khuẩn HP và bệnh dạ dày*, Nhà xuất bản Thanh niên.
7. Chia T.W.R., Dykes G.A., 2010, Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars, *Pharmaceutical Biology*, 48(7), pp. 753-756.
8. Athaydes B.R., Tosta C., Carminati R.Z., Kuster R.M., Kitagawa R.R., Gonçalves R.C.R., 2022, Avocado (*Persea americana* Mill.) seeds compounds affect *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma cells growth, *Journal of Functional Foods*, 99, pp.105352.
9. DeLoney C.R., Schiller N.L., 2000, Characterization of an In Vitro-Selected Amoxicillin-Resistant Strain of *Helicobacter pylori*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), pp. 3368-3373.
10. Rendón Anaya M., Ibarra Laclette E., Méndez Bravo A., Lan T., Zheng C., Carretero Paulet L., Perez Torres C.A., Chacón López A., Hernandez Guzmán G., Chang T.H., Farr K.M., Barbazuk W.B., Chamala S., Mutwil M., Shivhare D., Alvarez Ponce D., Mitter N., Hayward A., Fletcher S., Rozas J., Sánchez Gracia A., Kuhn D., Barrientos Priego A.F., Salojärvi J., Librado P., Sankoff D., Herrera Estrella A., Albert V.A., Herrera

- Estrella L., 2019, The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(34), pp.17081-17089.
11. Juma I., Geleta M., Persson Hovmalm H., Nyomora A., Saripella G.V., Carlsson A.S., Fatih M., Ortiz R., 2021, Comparison of Morphological and Genetic Characteristics of Avocados Grown in Tanzania, *Genes*, 12(1), pp. 63.
 12. Flores M., Saravia C., Vergara C., Avello M.C., Ortiz-Viedma J., 2019, Avocado Oil: Characteristics, Properties, and Applications, *Molecules*, 24(11), pp.2172.
 13. <https://www.dienmayxanh.com/vao-bep/bo-booth-la-gi-cach-chon-va-cach-u-bo-booth-noi-mua-va-gia-bo-09351>
 14. Yasir M., Das S., Kharya M.D., 2010, The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill, *Pharmacognosy Reviews*, 4(7), pp. 77-84.
 15. Ukwe C.V., Nwafor S.V., 2004, Anti-ulcer activity of aqueous leaf extract of *Persea americana* (family-lauraceae), *Nigerian Journal of Pharmaceutical Research*, 3(1), pp. 91-95.
 16. Wang Z., Hasegawa J., Wang X., Matsuda A., Tokuda T., Miura N., Watanabe T., 2011, Protective Effects of Ginger against Aspirin-Induced Gastric Ulcers in Rats, *Yonago Acta Medica*, 54(1), pp. 11-19.
 17. Ozbakiş Dengiz G., Gürsan N., 2008, Effects of *Momordica charantia* L. (*Cucurbitaceae*) on indomethacin-induced ulcer model in rats, *The Turkish Journal of Gastroenterology: the official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 16(2), pp.85-88.
 18. Lara Flores M., Aguilar Lasserre A.A., Morales Mendoza L.F., Rivera Castro E., Hernández Rivera S.P., Martínez Ruiz M., Hernández Rodríguez G., Hernández Rodríguez M.A., 2018, Bioeconomy and Biorefinery: Valorization of Hemicellulose from Lignocellulosic Biomass and Potential Use of Avocado Residues as a Promising Resource of Bioproducts, *Waste to Wealth*, pp. 141-170.

19. Belete T.B., Hailu Z.T., Gebrie E.A., 2019, A Review on Avocado Seed: Functionality, Composition, Antioxidant and Antimicrobial Properties, *Chemical Science International Journal*, 27(2), pp. 1-10.
20. Ejiofor Nonso C., Ezeagu Ikechukwu E., Ayoola Moses, Umera Emmanuel A., 2018, Determination of the chemical composition of avocado (*Persea americana*) seed, *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences Open Journal*, SE2, pp. 51-55.
21. Park S., Nam Y.H., Rodriguez I., Park J.H., Kwak H.J., Oh Y., Oh M., Park M.S., Lee K.W., Lee J.S., Kim D.H., 2020, Chemical constituents of leaves of *Persea americana* (avocado) and their protective effects against neomycin-induced hair cell damage, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(6), pp.739-743.
22. Araújo E.S., Pimenta A.S., Feijó F.M.C., Castro R.V.O., Fasciotti M., Monteiro T.V.C., de Lima K.M.G., 2018, Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*, *Journal of Applied Microbiology*, 124(1), pp. 85-96.
23. Trần Thanh Hà, Nguyễn Văn Đậu, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Đỗ Thị Hà, Nguyễn Đình Tuấn, 2016, Chemical constituents of *n*-butanol extract of *Polygonum barbatum* L. collected in Vietnam, *Journal of Medicinal Materials*, 21(3), pp. 189-193.
24. Gómez-Flores R., Espinosa-Ramos D., Barrón-González M.P., Tamez-Guerra P., Quintanilla-Licea R., Tamez-Guerra R., Rodríguez-Padilla C., 2016, Antimicrobial Activity of *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Asteraceae) Methanol Extracts Against *Helicobacter pylori*, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(4), pp. 55-59.
25. M.A. Owolabi, H.A.B. Coker, S.I. Jaja, 2010, Bioactivity of the phytoconstituents of the leaves of *Persea americana*, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(9), pp. 556-561.
26. Đỗ Thị Thanh Trung, Phạm Thị Vui, Nguyễn Huyền Trang, Phạm Vinh Hoa, Nguyễn Thị Thanh Thi, Phạm Thị Lương Hằng, Phạm Bảo Yên, 2018, Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Helicobacter pylori* của một số dịch chiết thảo dược Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60(7), tr. 23-27.

27. Nguyễn Thị Kim Cúc, Trần Thị Hồng, Phạm Thị Thúy Hoài, Phạm Việt Cường, 2014, Isolation of antagonistic microorganism against some plant fungal pathogens and evaluation of their activity in vitro and in vivo, *Journal of Science and Technology, VAST*, 52(4), pp. 419-430.
28. Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Gašić U., Tešić Ž., Zengin G., Zeković Z., Đurović S., 2017, Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process, *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, pp. 32-42.
29. Le T.N.C., Mikolasch A., Awe S., Sheikhany H., Klenk H.P., Schauer F., 2010, Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from oil polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert. *Journal of basic microbiology*, 50(3), pp. 241-253.
30. De Boer T.J., Backer H.J., 1956, Diazonethane, *Organic Synthesis*, 36, pp. 14–16.
31. Boadi O., Saah S.A., Mensah J.K., Badu M., AddaiArhinand S., Mensah M.B., 2015, Phytoconstituents, antimicrobial and antioxidant properties of the leaves of *Persea americana* Mill cultivated in Ghana, *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(36), pp. 933- 939.
32. Melgar B., Dias M.I., Ciric A., Sokovic M., Garcia-Castello E.M., Rodriguez-Lopez A.D., Barros L., Ferreira I.C.R.F., 2018, Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants, *Industrial Crops and Products*, 111, pp. 212–218
33. Nguyễn Thị Vân Linh, Nguyễn Quốc Duy, Nguyễn Như Ngọc, Nguyễn Thị Thùy Dung, 2021, Comparison of Phytochemical Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Various Solvent Extracts Obtained from ‘Maluma’ Avocado Pulp Powder, *Molecules*, 26(24), pp. 7693.
34. Ogundare A.O., Oladejo B.O., 2014, Antibacterial activities of the leaf and bark extract of *Persea americana*, *American Journal of Ethnomedicine*, 1(1), pp. 64-71.
35. Anggorowati D.A., Priandini G., Thufail T., 2016, Potensi daun alpukat (*persea americana* miller) sebagai minuman teh herbal yang kaya antioksidan, *Industri Inovatif: Jurnal Teknik Industri*, 6(1), pp. 1-7.

36. Nugraha A.C., Prasetya A.T., Mursiti S., 2017, Isolation, identification, Activity test of flavonoid compounds as antibacterials from mango leaves, *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2), pp. 91-96.
37. Karlina C.Y., Ibrahim M., Trimulyono G., 2013, Aktivitas antibakteri ekstrak herba krokot (*Portulaca oleracea L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 2(1), pp. 87-93.
38. Sapara T.U., Waworuntu O., Juliatri, 2016, Efektivitas antibakteri ekstrak daun pacar air (*Impatiens balsamina L.*) terhadap pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*, *Pharmacon*, 5(4), pp. 10-17.
39. Wijaya I., 2020, The Potential of Avocado Leaves (*Persea americana* Mill) as Antibacterial, *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 9(2), pp. 695-701.
40. Zamani M., Ebrahimitabar F., Zamani V., Miller W.H., Alizadeh Navaei R., Shokri Shirvani J., Derakhshan M.H., 2018, Systematic review with meta analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection, *Alimentary pharmacology & Therapeutics*, 47(7), pp. 868-876.
41. Zulharmita Z., Rivai H., Hasni L.A., 2019, Qualitative and quantitative analysis of the content of chemical compounds from extracts of hexane, acetone, ethanol, and water from avocado leaves (*Persea americana* Mill), *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(6), pp. 149-167.
42. Vũ Nam, 2000, Initial research on the effect of killing *Helicobacter pylori* with the total active ingredient of betel leaves in experiments and in chronic gastritis, *Proceedings of scientific research, Vietnam Institute of Traditional Medicine*.
43. Nasri N., Satria D., Kaban V.E., Tania C.G., SyaHPutra H.D., Rani Z., 2024, Antibacterial potential of ethanolic extract of avocado leaves (*Persea americana* Mill.) against clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*, *Trends in Sciences*, 21(7), pp. 7821-7821.
44. Madhani V., 2020, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*, *Karya Tulis Ilmiah*, Akaademi Farmasi Indonesia Yogyakarta.

45. Dewi F.K., 2010, *Aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah mengkudu (Morinda citrifolia, Linnaeus) terhadap bakteri pembusuk daging segar*, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia.
46. Azzahra F., Almalik E.A., Sari A.A., 2019, Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*, *Jurnal Kefarmasian Akfarindo*, 9(2), pp. 1-10.
47. Purnomo H.Y., Azzahra F., 2021, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Jurnal Kefarmasian Akfarindo*, 6(2), pp. 7-14.
48. Azzahra, F., Budiati, T., 2002, Pengaruh metode pengeringan dan pelarut ekstraksi terhadap rendemen dan kandungan kimia ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill.): Effects of drying method and solvents on yield and chemical content of avocado leaves extract (*Persea americana* Mill.), *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 7(1), ppp. 67-78.
49. Polat K.L., Tuncer S., Yildirim M., Yilmaz I., Yesilada E., 2020, Anticholinergic and antioxidant activities of avocado (*Folium perseeae*) leaves–phytochemical content by LC-MS/MS analysis, *International Journal of Food Properties*, 23(1), ppp. 878-893.
50. Srianthie D., Udayangani D.N., Chamari H., 2020, Antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory potential of the aqueous extract of the raw leaves of sri lankan variety of *persea americana* miller (avocado), *International Journal of Ayurveda and Pharma Research*, 8(3), pp. 1-11.
51. Dabas D., Shegog R.M., Ziegler G.R., Lambert J.D., DiMeglio L.A., Ferruzzi M.G., 2019, In vitro antioxidant and cancer inhibitory activity of a colored avocado seed extract, *International Journal of Food Science*, 2019(1), pp. 1-7.
52. Tonfack Djikeng F., Womeni H.M., Tiencheu B., Linder M., Villeneuve P., Fanni J., Parmentier M., 2018, Effect of different extraction solvents on the phenolic content and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*) from South-West Region, Cameroon, *Food Research*, 3(1), pp. 86-90.
53. Yamassaki F.T., Campestrini L.H., Zawadzki-Baggio S.F., Maurer J., 2017, Avocado leaves: Influence of drying process, thermal incubation,

- and storage conditions on preservation of polyphenolic compounds and antioxidant activity, *International journal of food properties*, 20(1), pp. 2280-2293.
54. Pereira S.G., Teixeira-Guedes C., Souza-Matos G., Maricato É., Nunes C., Coimbra M.A., Teixeira J.A., Pereira R.N., Rocha C.M.R., 2021, Influence of ohmic heating in the composition of extracts from *Gracilaria vermiculophylla*, *Algal Research*, 58, pp. 102360.
 55. Barba F.J., Zhu Z., Koubaa M., Sant'Ana A.S., Orlie V., 2016, Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 49, pp. 96-109.
 56. Gumustepe L., Calik P., Elibol M., Tari C., 2013, Comparison of ohmic heating-and microwave-assisted extraction techniques for avocado leaves valorization: Optimization and impact on the phenolic compounds and bioactivities, *Food Science & Nutrition*, 11(9), pp. 5609-5620.
 57. Oke E.O., Adeyi O., Okolo B.I., Adeyi J.A., Ude C.J., Okhale S.E., Otolorin J.A., Nnabodo D., Ajala O.O., Anyanwu A.S., Okorie U.D., 2023, Microwave-assisted extraction proof-of-concept for phenolic phytochemical recovery from *Allium sativum* L.(Amaryllidaceae): Optimal process condition evaluation, scale-up computer-aided simulation and profitability risk analysis, *Cleaner Engineering and Technology*, 13(1), pp. 100624.
 58. Maillard M.N., Berset C., 1995, Evolution of Antioxidant Activity during Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, pp. 1789-1793.
 59. Carciochi R. A., Galván D'Alessandro L., Manrique G. D., 2016, Effect of roasting conditions on the antioxidant compounds of quinoa seeds, *International Journal of Food Science & Technology*, 51(4), pp. 1018–1025.
 60. Katsube T., Tsurunaga Y., Sugiyama M., Furuno T., Yamasaki Y., 2009, Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves, *Food Chemistry*, 113(4), pp. 964-969.

61. Djendoubi Mrad N., Boudhrioua N., Kechaou N., Courtois F., Bonazzi C., 2012, Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears, *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), pp. 433–441.
62. Kumar J.P., Ramanathan M., Ranganathan T., 2014, Ohmic heating technology in food processing—A review, *International Journal of Food Engineering Research & Technology*, 3(2), pp. 1236-1241.
63. Varghese K.S., Pandey M.C., Radhakrishna K., Bawa A.S., 2014, Technology, applications and modelling of ohmic heating: a review, *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), pp. 2304-2317.
64. Gong W., Wang R., Huang H., Hou Y., Wang X., He W., Gong X., Hu J., 2023, Construction of double network hydrogels using agarose and gallic acid with antibacterial and anti-inflammatory properties for wound healing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 227, pp. 698-710.
65. Variya B.C., Bakrania A.K., Patel S.S., 2020, Antidiabetic potential of gallic acid from *Emblica officinalis*: Improved glucose transporters and insulin sensitivity through PPAR- γ and Akt signaling, *Phytomedicine*, 73, pp. 152906.
66. Rodríguez-Martínez B., Gutiérrez-Grijalva E.P., Ambriz-Pérez D.L., Leyva-López N., Castillo-López R.I., Heredia J.B., 2021, Exploiting the potential of bioactive molecules extracted by ultrasounds from avocado peels—food and nutraceutical applications, *Antioxidants*, 10(9), pp. 1475.
67. Rodríguez-Martínez B., Ferreira-Santos P., Méndez Alfonso I., Martínez S., Genisheva Z., Gullón B., et al., 2022, Deep eutectic solvents as a green tool for the extraction of bioactive phenolic compounds from avocado peels, *Molecules*, 27(19), pp. 6646.
68. Coelho M., Silva S., Costa E., Pereira R.N., Rodrigues A.S., Teixeira J.A., Pintado M., 2021, Anthocyanin recovery from grape by-products by combining ohmic heating with food-grade solvents: Phenolic composition, antioxidant, and antimicrobial properties, *Molecules*, 26(13), pp. 3838.
69. Oboh G., Isaac A.T., Akinyemi A.J., Ajani R.A., 2014, Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes and sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rats' pancreas by phenolic extracts of avocado pear leaves

and fruit, *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 10(3), pp. 208-216.

70. Castro-López C., Bautista-Hernández I., González-Hernández M.D., Martínez-Ávila G.C.G., Rojas R., Gutiérrez-Díez A., Medina-Herrera N., Aguirre-Arzola V.E., 2019, Polyphenolic profile and antioxidant activity of leaf purified hydroalcoholic extracts from seven Mexican *Persea americana* cultivars, *Molecules*, 24(1), pp. 173.
71. Tomou E.M., Papakyriakopoulou P., Skaltsa H., Valsami G., Kadoglou N.P., 2023, Bio-actives from natural products with potential cardioprotective properties: isolation, identification, and pharmacological actions of apigenin, quercetin, and silibinin, *Molecules*, 28(5), pp. 2387.
72. Li B., Robinson D.H., Birt D.F., 1997, Evaluation of properties of apigenin and [G3H] apigenin and analytic method development, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(6), pp. 721-725.
73. Wang Y.C., Huang K.M., 2013, In vitro anti-inflammatory effect of apigenin in the *Helicobacter pylori*-infected gastric adenocarcinoma cells, *Food and Chemical Toxicology*, 53, pp. 376-383.
74. Kuo C.H., Weng B.C., Wu C.C., Yang S.F., Wu D.C., Wang Y.C., 2014, Apigenin has anti-atrophic gastritis and anti-gastric cancer progression effects in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils, *Journal of Ethnopharmacology*, 151(3), pp. 1031-1039.
75. Menzel C.M., Le Lagadec M.D., 2014, Increasing the productivity of avocado orchards using high-density plantings: A review, *Scientia Horticulturae*, 177, pp. 21-36.
76. Tauro R., Velázquez-Martí B., Manrique S., Ricker M., Martínez-Bravo R., Ruiz-García V.M., Ramos-Vargas S., Masera O., Soria-González J.A., Armendáriz-Arnez C., 2022, Potential Use of Pruning Residues from Avocado Trees as Energy Input in Rural Communities, *Energies*, 15(5), pp. 1715.
77. Soria-González J. A., Tauro R., Alvarado-Flores J. J., Berrueta-Soriano V. M., Rutiaga-Quñones J. G., 2022, Avocado tree pruning pellets (*Persea americana* Mill.) for energy purposes: Characterization and quality evaluation, *Energies*, 15(20), pp. 7514.

78. Sở Nông nghiệp & PTNT tỉnh Đắk Lắk , 2021, *Báo cáo Sơ kết vụ đông xuân 2020-2021 và triển khai kế hoạch sản xuất vụ mùa 2021*, số 166/BC-SNN.
79. Cục Trồng trọt, 2019, *Hiện trạng sản xuất cây ăn quả Việt Nam, giải pháp phát triển bền vững*.