



## Tác dụng kháng nấm của tinh dầu Trầu không và dung dịch vệ sinh chứa tinh dầu Trầu không

Đàm Thanh Xuân<sup>1</sup>, Lê Ngọc Khánh<sup>1</sup>, Phạm Văn Hùng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Cẩm Vân<sup>1</sup>, Trần Thị Minh Thu<sup>1</sup>, Đỗ Thị Huyền Thương<sup>1</sup>,  
Lê Thị Tú Anh<sup>2</sup>, Nguyễn Khắc Tiệp<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Công nghiệp Dược - Trường Đại học Dược Hà Nội.

<sup>2</sup>Phòng Hóa sinh ứng dụng - Viện Hóa học - Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam.

\*Tác giả liên hệ: tiepnk@hup.edu.vn

(Ngày gửi đăng: 21/7/2022 – Ngày duyệt đăng: 20/10/2022)

### SUMMARY

*Betel essential oil has been used in traditional medicine to treat genital infections. In this study, we evaluated the antifungal activity against Candida albicans through MIC, MFC, and the ability to kill fungi of betel essential oil. Betel essential oil has both MIC and MFC values of 0.2 %. Samples with oil concentrations above 0.2 % killed over 99 % of fungi compared to the initial inoculum. On that basis, we prepared 13 hygiene solution formulations containing betel essential oil with concentrations ranging from 0.4 % to 3.2 %, with or without an antifungal agent. These formulations were evaluated for their ability to kill C. albicans. Formulation containing 3.2 % betel essential oil, used alone or in combination with an antifungal agent, killed over 99 % of fungi (in vitro) after 15 seconds of exposure.*

**Từ khóa:** Tinh dầu, Trầu không, nấm âm đạo, Candida albicans, dung dịch vệ sinh

### Đặt vấn đề

Viêm sinh dục do nấm *Candida* phổ biến và là nguyên nhân của một phần ba tổng số các trường hợp viêm âm hộ/âm đạo ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản. Các nghiên cứu dịch tễ đã chỉ ra 70 % phụ nữ đã từng bị viêm sinh dục do nấm *Candida* tại một thời điểm nào đó trong đời. Tác nhân gây bệnh phổ biến nhất là *Candida albicans* (khoảng 90 % trường hợp). Nấm *Candida* là một phần của hệ vi sinh vật (VSV) bình thường ở nhiều phụ nữ và thường không có triệu chứng. Một bệnh nhân chỉ được đánh giá là viêm sinh dục do nấm *Candida* khi có sự hiện diện của nấm *Candida* ở đường sinh dục cũng như các triệu chứng kích ứng, ngứa, khó tiểu hoặc viêm nhiễm [1].

Để điều trị viêm sinh dục ở phụ nữ, y học cổ truyền nhiều nước sử dụng nước lá Trầu không (*Piper betle* L.) để rửa hoặc xông đem lại hiệu quả tốt [1]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra lá Trầu không hiệu quả cao đối với các chủng vi nấm *Candida* gây viêm âm đạo. Sự kết hợp của dịch chiết lá hoặc tinh dầu Trầu không với kháng sinh có thể mang lại khả năng diệt nấm hiệu quả [2].

Dựa trên đặc điểm sinh lý vùng âm hộ, dung dịch vệ sinh (DDVS) cần có độ pH phù hợp (4,2-5,6), có chất tẩy rửa nhẹ và không chứa chất kích ứng vùng âm hộ, âm đạo. Ngoài ra DDVS thường được bổ sung acid lactic và thêm các thành phần kháng lại các VSV có hại mà không ảnh hưởng đến hệ VSV



có lợi. Do đặc thù nhạy cảm của khu vực âm hộ, việc lựa chọn các chất hoạt động bề mặt với vai trò tẩy rửa là rất quan trọng. Một chiến lược chung thường được sử dụng là phối hợp các chất hoạt động bề mặt dịu nhẹ giúp tăng hiệu quả làm sạch, giảm tẩy rửa quá mức và ít gây kích ứng cho da âm hộ. Ngoài ra, DDVS thường được bổ sung các thành phần như chất khử mùi, hệ đệm, chất tạo độ nhớt, dưỡng ẩm, hương liệu và chất bảo quản để tạo nên một DDVS hoàn chỉnh [3], [4].

Hiện tại trên thị trường Việt Nam có rất nhiều chế phẩm DDVS có nguồn gốc tự nhiên, bổ sung dịch chiết Trầu không hoặc tinh dầu Trầu không nhưng chưa rõ về hiệu quả kháng VSV. Để chứng minh hiệu quả kháng nấm của của tinh dầu Trầu không trong DDVS, chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu này. Trong đó chúng tôi đánh giá khả năng diệt vi nấm của tinh dầu Trầu không, sau đó sử dụng tinh dầu Trầu không để pha chế DDVS và đánh giá khả năng diệt vi nấm của các mẫu DDVS pha chế được.

#### **Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu** **Nguyên vật liệu nghiên cứu**

**Nguyên liệu, hóa chất:** Tinh dầu Trầu không (Công ty CP Tinh dầu thiên nhiên Hà Nội. Hàm lượng: 100 % tinh dầu. Số lô: HNE.TK.110520. Ngày sản xuất: 11/05/2020. Thành phần: Phenol, 4-(2-propenyl)-, acetate (16,45 %); Eugenol (16,97 %); Eugenol acetate (11,07 %);  $\alpha$  Selinene (6,95 %),  $\beta$  Selinene (5,89 %) và một số thành phần chiếm tỷ lệ nhỏ hơn 5 %, trong đó không có chứa methyleugenol (theo Phiếu kết quả thử nghiệm KT3-00940BHO0/19 của Trung tâm Kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường chất lượng 3). Itraconazole (Sigma).

**Hóa chất pha dung dịch vệ sinh:** Natri lauryl ether sulfat (Emersense ES 7062 – EMERY - Malaysia), Cocamidopropyl betain (Tego Betain L7KB5 - EVONIK - Indonesia), Natri caproyl/lauroyl lactylat (Dermosoft decalact liquid MB - EVONIK - Đức), glycerin (Refined glycerin 99,7 % - VANCE - Malaysia), PEG-7 glyceryl cocoat (Tegosoft GC- EVONIK - Trung Quốc), PEG-120 methyl glucose dioleat (Antil 127- EVONIK - Đức), Phenoxyethanol &

Ethylhexylglycerin (TroyCare PE 91 - TROY - Thái Lan), acid lactic, natri citrat, tween 80 (Trung Quốc) và các hóa chất cơ bản khác.

**Chủng giống, môi trường nuôi cấy:** Chủng giống *Candida albicans* (ATCC 10231) từ Đơn vị Dược lý phân tử và tế bào, Đại học Công giáo Louvain (Bỉ). Môi trường nuôi cấy Sabouraud dextrose (SD) (Merck) và Sabouraud dextrose agar (SDA) (chuẩn bị từ SD với 2,5 % thạch bột), đĩa 96 giếng vô trùng (SPL - Hàn Quốc).

**Trang thiết bị, máy móc:** Các trang thiết bị cơ bản của tổ Vi sinh - Kháng sinh và tổ Bào chế công nghiệp, bộ môn Công nghiệp Dược, Đại học Dược Hà Nội.

#### **Phương pháp nghiên cứu**

**Xác định giá trị MIC với *Candida albicans* của tinh dầu Trầu không**

Nồng độ tối thiểu ức chế VSV (MIC) của tinh dầu Trầu không được xác định bằng phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng sử dụng Sabouraud-dextrose trên đĩa 96 giếng theo khuyến nghị của Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm Hoa Kỳ (Clinical & Laboratory Standards Institute – CLSI) [5]. Tinh dầu Trầu không được hòa tan trong Sabouraud-dextrose có bổ sung 4 % Tween 80, sau đó tiếp tục được pha loãng đến nồng độ làm việc trong Sabouraud-dextrose. Các mẫu tinh dầu được pha loãng (1:1) trên đĩa 96 giếng, từ cột 1 lần lượt xuống đến cột 10, để thu được dãy nồng độ giảm dần theo cấp số nhân bậc 2.

Hỗn dịch vi nấm độ đục 0,5 McFarland được chuẩn bị trong PBS, với các khuẩn lạc trên đĩa thạch SDA được ủ 35 °C, qua đêm. Hỗn dịch này được pha loãng 100 lần trong Sabouraud-dextrose để thu được hỗn dịch làm việc với nồng độ  $1,5 \times 10^4$  vi nấm/ml. Mẫu thử từ cột 1 đến cột 10 và chứng dương ở cột 11, được bổ sung 100  $\mu$ l hỗn dịch làm việc; cột 12 là chứng âm, được bổ sung 100  $\mu$ l Sabouraud-dextrose.

Các đĩa được nắp kín, ủ ở 35 °C trong 24 giờ. MIC được xác định là nồng độ thấp nhất không quan sát thấy sự phát triển của vi nấm. Itraconazole được dùng làm chất kháng nấm



tham chiếu, chạy song song trong thí nghiệm, kết quả thí nghiệm chỉ được chấp nhận khi chứng âm, chứng dương và chất tham chiếu cho kết quả bình thường. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện 3 lần độc lập.

*Xác định giá trị MFC với Candida albicans của tinh dầu Trầu không*

Xác định nồng độ tối thiểu diệt nấm (MFC) dựa trên đĩa xác định MIC, tất cả các giếng không mọc được cấy lên đĩa thạch SDA để xác định MFC. Mẫu được ủ ở 35 °C trong 24 giờ, đếm số khuẩn lạc xuất hiện. Nồng độ MFC là nồng độ thấp nhất có khả năng diệt lớn hơn 99 % số vi nấm so với thời điểm ban đầu.

*Đánh giá khả năng diệt vi nấm ở các nồng độ khác nhau*

Nồng độ tinh dầu Trầu không được chuẩn bị tương tự như trong xác định MIC. Cho hỗn dịch vi nấm tiếp xúc với tinh dầu nồng độ khác nhau từ cao đến thấp gần với MIC (16MIC, 8MIC, 4MIC, 2MIC, MIC). Mẫu được ủ 35 °C trong 24 giờ. Lượng vi nấm sống trong mẫu, trước và sau khi tiếp xúc tinh dầu, được đánh giá bằng phương pháp cấy đếm trên đĩa thạch. Khả năng diệt vi nấm của mẫu thử được so sánh với mẫu ở thời điểm trước khi tiếp xúc với tinh dầu. Chứng dương là mẫu vi nấm không bổ sung tinh dầu, chứng âm là môi trường Sabouraud-dextrose không có vi nấm,

kết quả thí nghiệm chỉ được chấp nhận khi chứng âm và chứng dương cho kết quả bình thường. Kết quả được biểu diễn dưới dạng hiệu số  $\Delta \log_{10}$  CFU/ml giữa mẫu có tiếp xúc với tinh dầu và mẫu trước khi tiếp xúc tinh dầu.

### **Thiết kế công thức và pha chế các DDVS**

*Đánh giá tác động của từng thành phần lên vi nấm*

Sử dụng phương pháp xác định MIC và phương pháp đánh giá khả năng diệt vi nấm như phần trên để đánh giá tác động của từng thành phần trong công thức dự kiến đến sự phát triển của vi nấm.

### *Pha chế các DDVS*

Nồng độ sử dụng của các thành phần trong công thức các mẫu DDVS được trình bày như trong bảng 1.

Trên cơ sở ảnh hưởng của các thành phần tá dược lên vi nấm, thiết kế các nhóm mẫu để so sánh theo nguyên tắc sau:

Mẫu nền (mẫu 0): gồm các thành phần của DDVS ở bảng 1, nhưng không chứa tinh dầu Trầu không và các thành phần có khả năng diệt vi nấm ở nồng độ sử dụng.

Nhóm mẫu A (4 mẫu từ A1 đến A4): mẫu nền được bổ sung tinh dầu Trầu không với các nồng độ tương đương 2MIC, 4MIC, 8MIC, 16MIC để đánh giá tác dụng của tinh dầu trong DDVS khi dùng đơn lẻ.

*Bảng 1. Nồng độ sử dụng của các thành phần trong công thức các mẫu DDVS*

Thành phần	Vai trò	Tỷ lệ (%)
Natri lauryl ether sulfat	Hoạt động bề mặt, làm sạch	5
Cocamidopropyl betain	Hoạt động bề mặt, làm sạch	10
Natri lauroyl lactylat	Hoạt động bề mặt, kháng nấm	1,2
Natri citrat	Đệm, ổn định pH	1
Glycerin	Giữ ẩm	5
PEG-7 Glyceryl cocoat	Làm mềm, giữ ẩm	2
Tinh dầu Trầu không	Kháng nấm	0,4 đến 3,2
PEG-120 Methyl glucose dioleat	Hoạt động bề mặt, tăng độ nhớt, tạo đặc	1,2
Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin	Bảo quản	1
Hương liệu	Tạo hương	0,8
Acid lactic	Chỉnh pH	Vừa đủ pH 4,5
Nước cất	Dung môi	Vừa đủ 100 %



Nhóm mẫu B (4 mẫu từ B1 đến B4): thành phần như mẫu 2, bổ sung Natri lauroyl lactylat với tỷ lệ như ở bảng 1, để đánh giá tác dụng của các mẫu DDVS khi có tinh dầu và một thành phần diệt nấm khác.

Nhóm mẫu C (4 mẫu từ C1 đến C4): thành phần như mẫu 3, bổ sung Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin (thành phần có khả năng diệt nấm) với tỷ lệ như ở bảng 1 vào các mẫu ở nhóm 3 để tạo mẫu DDVS hoàn chỉnh

Các bước pha chế DDVS: hòa tan các chất hoạt động bề mặt trong một phần nước cất, hòa tan tiếp các thành phần còn lại, điều chỉnh pH của dung dịch đến 4,5 bằng acid lactic, bổ sung nước cất đến vừa đủ thể tích pha chế, khuấy trộn đều, thu được DDVS.

Các mẫu DDVS sau khi pha chế sẽ được đánh giá khả năng diệt vi nấm *C. albicans* bằng phương pháp phù hợp.

#### Khả năng kháng nấm của các DDVS

Đánh giá khả năng diệt *C. albicans* của các mẫu DDVS khác nhau ở một số mốc thời gian khảo sát. Dung dịch vi nấm  $1,5 \times 10^4$  trong môi trường SD được cho tiếp xúc với đồng thể tích DDVS. Hỗn dịch vi nấm và DDVS được đặt sẵn ở 35 °C trước khi cho tiếp xúc để đảm bảo phù hợp với nhiệt độ thực nghiệm. Sau khi tiếp xúc, mẫu được ủ ở 35 °C đến thời gian phù hợp. Chứng dương là dung dịch vi nấm không bổ sung DDVS, chứng âm là môi trường SD không có vi nấm, kết quả thí nghiệm chỉ được chấp nhận khi chứng âm và chứng dương cho kết quả bình thường. Lượng vi nấm trong

mẫu được xác định ở 2 thời điểm là (i) trước khi tiếp xúc, (ii) sau 15 giây ủ với DDVS, bằng phương pháp cấy đếm trên đĩa thạch. Mẫu ở các thời điểm sẽ được so sánh với mẫu trước khi tiếp xúc DDVS, kết quả thể hiện dưới dạng hiệu số so với thời điểm khởi đầu ( $\Delta \log_{10}$  CFU/ml).

#### Phương pháp cấy đếm trên đĩa thạch

Phương pháp xác định lượng vi nấm trong các mẫu nghiên cứu bằng phương pháp cấy đếm trên đĩa thạch. Mẫu nghiên cứu sẽ được pha loãng theo cấp logarit trong PBS đến nồng độ phù hợp. Các nồng độ pha loãng sẽ được cấy trải lên thạch SDA. Số khuẩn lạc sẽ được xác định bằng phương pháp đếm sau khi ủ tại 35 °C, 24 giờ. Thí nghiệm được thực hiện tối thiểu hai lần độc lập. Nồng độ được chọn là nồng độ có từ 30 đến 300 khuẩn lạc trên đĩa thạch. Tính toán kết quả dựa trên nồng độ pha loãng và số khuẩn lạc. Nồng độ vi nấm được biểu diễn dưới dạng  $\log_{10}$  CFU/ml, hiệu số nồng độ vi nấm giữa các thời điểm được biểu diễn dưới dạng  $\Delta \log_{10}$  CFU/ml.

#### Kết quả nghiên cứu

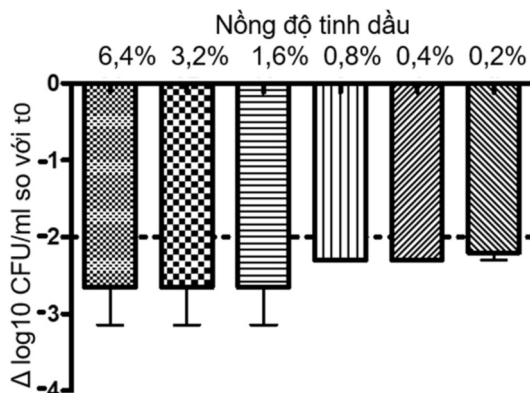
#### Khả năng diệt vi nấm của tinh dầu Trầu không

Tinh dầu Trầu không được đánh giá MIC, MFC và khả năng diệt vi nấm tại một số nồng độ khác nhau, kết quả được biểu diễn trên bảng 2 và hình 1. Trong đó giá trị MIC và MFC của tinh dầu Trầu không với *C. albicans* đều là 0,2 %. Tinh dầu Trầu không thể hiện khả

Bảng 2. Giá trị MIC và MFC (%)\* của tinh dầu Trầu không với *C. albicans*

Chủng vi nấm	MIC	MFC**
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,2	0,2

\*% thể tích tinh dầu trong thể tích môi trường, \*\*, MFC:  $-2 \log_{10}$  CFU/ml so với lượng vi nấm ban đầu, giá trị  $-2 \log_{10}$  CFU/ml này được biểu diễn dưới dạng đường ---- trong hình 1.



Hình 1. Khả năng diệt *C. albicans* của tinh dầu Trầu không với các nồng độ khác nhau



năng diệt nấm tốt, ở nồng độ lớn hơn 0,2 %, tinh dầu Trầu không có khả năng diệt lớn hơn 2 log<sub>10</sub> CFU/ml (99 %) vi nấm trong mẫu thử.

**Pha chế và đánh giá khả năng diệt nấm của các mẫu DDVS**

Trước khi pha chế các mẫu DDVS, tiến hành đánh giá tác động riêng lẻ của các tá dược lên vi nấm, những tá dược có ảnh hưởng lên vi nấm được trình bày ở bảng 3. Trên cơ sở ảnh hưởng của các thành phần tá dược lên vi

nấm, thiết kế 13 mẫu nghiên cứu thuộc 04 nhóm mẫu như được trình bày ở bảng 4.

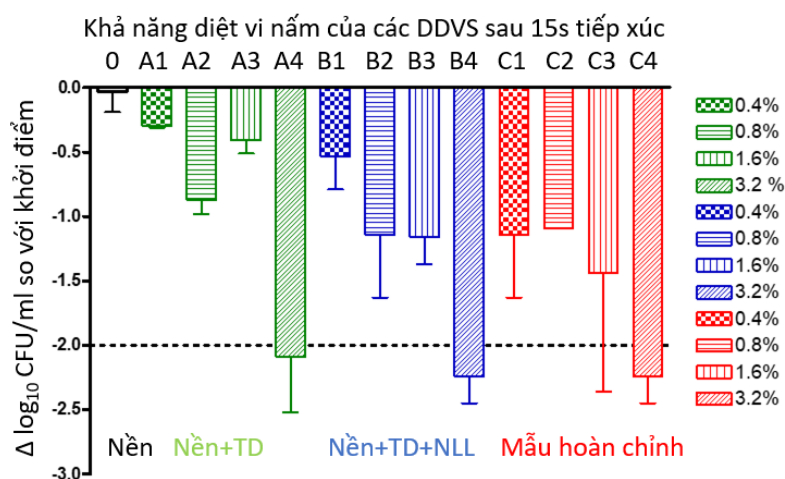
*Bảng 3. Ảnh hưởng của các tá dược riêng lẻ lên vi nấm*

Thành phần	Tác động lên vi nấm
Natri lauroyl lactylat	Diệt nấm từ nồng độ 0,25-0,5%
Tinh dầu Trầu không	Diệt nấm từ nồng độ 0,2%
Phenoxyethanol & Ethylhexylglycerin	Diệt nấm từ nồng độ 1%
Cocamidopropyl betain	Ức chế nhưng không diệt nấm

*Bảng 4. Thành phần các mẫu DDVS được thiết kế*

Nhóm mẫu	STT	Thành phần		
		Tinh dầu Trầu không	Natri lauroyl lactylat	Phenoxyethanol & Ethylhexylglycerin
Nền	0	-	-	-
Nền + Tinh dầu Trầu không	A1	0,4% (2MIC)	-	-
	A2	0,8% (4MIC)	-	-
	A3	1,6% (8MIC)	-	-
	A4	3,2% (16MIC)	-	-
Nền + Tinh dầu Trầu không + Natri lauroyl lactylat	B1	0,4% (2MIC)	1,2%	-
	B2	0,8% (4MIC)	1,2%	-
	B3	1,6% (8MIC)	1,2%	-
	B4	3,2% (16MIC)	1,2%	-
Mẫu hoàn chỉnh	C1	0,4% (2MIC)	1,2%	1,0%
	C2	0,8% (4MIC)	1,2%	1,0%
	C3	1,6% (8MIC)	1,2%	1,0%
	C4	3,2% (16MIC)	1,2%	1,0%

*Ghi chú: Các mẫu gồm các thành phần cố định khác như ở bảng 1*



*Hình 2. Khả năng diệt vi nấm C. albicans của các mẫu DDVS chứa tinh dầu.*

*Ghi chú: TD: tinh dầu Trầu không; NLL: Natri lauroyl lactylat*





13 mẫu DDVS pha chế thực hiện ở trên được đánh giá khả năng diệt vi nấm *C. albicans* với hai mốc thời gian là trước khi tiếp xúc với DDVS và 15 giây sau khi tiếp xúc DDVS (xem phương pháp nghiên cứu). Kết quả được trình bày ở hình 2, trong đó lượng mẫu vi nấm sau khi tiếp xúc với DDVS được so sánh với thời điểm ban đầu, đường ---- ở vị trí -2 biểu hiện vị trí có khả năng diệt 99 % số lượng vi nấm trong mẫu. Trong đó, sau 15 giây tiếp xúc với vi nấm, các mẫu có chứa tinh dầu nồng độ 3,2 %, khi sử dụng đơn hay kết hợp với các chất diệt nấm khác, đều có khả năng diệt lớn hơn 99 % vi nấm so với ban đầu.

### Bàn luận

Về khả năng kháng nấm của tinh dầu Trầu không. Tinh dầu Trầu không trong nghiên cứu này có MIC và MFC đều là 0,2 %. Giá trị MFC/MIC < 4 chứng tỏ khả năng diệt vi nấm tốt của tinh dầu này. Thí nghiệm đánh giá khả năng diệt vi nấm theo thời gian cũng chỉ ra khả năng diệt nấm này, cụ thể ở nồng độ 0,2 %, tinh dầu Trầu không có thể diệt > 2 log CFU/ml (99 %) vi nấm sau 24h tiếp xúc. So với các nghiên cứu khác trên cùng đối tượng tinh dầu Trầu không, MIC đối với *C. albicans* tương ứng là 0,25 % với tinh dầu Trầu không từ Philippin và 2,5 % với tinh dầu Trầu không từ Thái Lan [6], [7]. So sánh với một số tinh dầu tự nhiên khác trên vi nấm *C. albicans*, tinh dầu Trầu không có khả năng ức chế vi nấm tại nồng độ 0,2 %, trong khi đó giá trị này là 0,5 % với tinh dầu Bạc hà, 0,1 % với tinh dầu Tràm trà, tinh dầu Húng quế, tinh dầu Quế, tinh dầu Sả, và 0,06 % với tinh dầu Sả chanh [2], [8], [9]. Tinh dầu Trầu không còn có hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên nhiều đối tượng khác như *E. coli*, *S. aureus* [2, 8].

Tinh dầu Trầu không có thể có chứa Methyleugenol (CAS No 93-15-2), là một chất phổ biến trong tinh dầu Trầu không của một số địa phương khác nhau [2]. Methyleugenol là một chất bị giới hạn sử dụng với nồng độ giới hạn là 0,001 % trong các sản phẩm tẩy rửa, theo Hiệp định Mỹ phẩm ASEAN về các chất sử dụng trong mỹ phẩm cập nhật ngày 25.07.2022 [10]. Trong nghiên cứu này, nguồn

tinh dầu Trầu không được sử dụng không có chứa Methyleugenol trong thành phần (công bố của nhà sản xuất), do đó đảm bảo được yếu tố về giới hạn này.

Khi xây dựng công thức DDVS, một số thành phần trong công thức DDVS có khả năng diệt VSV như chất khử mùi hay chất bảo quản, do đó nghiên cứu đã khảo sát khả năng diệt vi nấm của toàn bộ các tá dược trong công thức sau đó thiết kế để có thể đánh giá được tác dụng của tinh dầu Trầu không khi sử dụng riêng hoặc khi kết hợp với các thành phần diệt nấm khác. Về việc lựa chọn nhóm chất hoạt động bề mặt, natri lauryl ether sulfat là một chất hoạt động bề mặt phổ biến, tuy nhiên lại ít được sử dụng đơn độc do tạo bọt nhiều và tẩy nhờn quá mức [3], [4]. Vì vậy, nghiên cứu chỉ sử dụng ở nồng độ thấp và phối hợp thêm chất hoạt động bề mặt dịu nhẹ hơn là cocamidopropyl betain và natri lauroyl lactylat.

Đặc điểm với chế phẩm DDVS là thời gian tiếp xúc ngắn nên khả năng diệt nấm cần được thực hiện trong thời gian ngắn. Vì vậy hiệu quả đạt được nên được đánh giá sau 15 giây. Đồng thời trong quá trình sử dụng, DDVS có xu hướng bị pha loãng với nước, để đảm bảo kết quả đánh giá, nghiên cứu được thiết kế để DDVS bị pha loãng 2 lần trong quá trình thử nghiệm. Dựa trên kết quả MIC của tinh dầu Trầu không trên *C. albicans*, các mẫu DDVS có nồng độ tinh dầu tăng dần từ 2 MIC đến 32 MIC được pha chế, để tìm nồng độ tốt nhất có khả năng diệt 99 % vi nấm chỉ sau 15 giây. Kết quả nghiên cứu cho thấy DDVS có nồng độ Tinh dầu Trầu không 3,2 % có thể diệt 99 % vi nấm sau 15 giây tiếp xúc, dù tinh dầu dùng riêng lẻ hay với các thành phần diệt nấm khác. Từ kết quả nghiên cứu, nhóm nghiên cứu đề xuất công thức DDVS chứa tinh dầu Trầu không nên có hàm lượng tinh dầu tối thiểu 3,2 % để mang lại hiệu quả diệt vi nấm *C. albicans* ngay sau 15s. Với một số chế phẩm thương mại sử dụng ngay không pha loãng với nước khi dùng, nồng độ tinh dầu chỉ cần yêu cầu từ 1,6 %.

Một trong những nhược điểm của nghiên



cứu này là thiếu nghiên cứu về độ ổn định của tinh dầu Trầu không trong các công thức DDVS. Do đặc điểm dễ bay hơi của tinh dầu, có thể dẫn tới nồng độ của tinh dầu Trầu không trong chế phẩm không đảm bảo với thời gian bảo quản dài, nhất là với những mẫu có nồng độ tinh dầu cao. Cần có một nghiên cứu độc lập để đánh giá về độ ổn định của tinh dầu Trầu không theo các thời gian và điều kiện bảo quản khác nhau, nhằm có một cái nhìn toàn diện hơn về việc sử dụng tinh dầu Trầu không nói riêng cũng như tinh dầu nói chung trong dược phẩm, mỹ phẩm.

#### **Kết luận**

Mẫu tinh dầu Trầu không có khả năng diệt vi nấm *C. albicans* tốt, cụ thể giá trị MIC và MFC là 0,2 %, tỷ lệ MFC/MIC < 4 chứng tỏ tinh dầu Trầu không có khả năng diệt vi nấm tốt. Nghiên cứu cũng đã chỉ ra kể từ nồng độ 0,2

%, tinh dầu Trầu không có khả năng diệt lớn hơn 2 log<sub>10</sub> CFU/ml ( tương đương 99 %) vi nấm trong thử nghiệm.

Nghiên cứu đã bước đầu pha chế được 13 DDVS có chứa tinh dầu Trầu không và đánh giá được khả năng diệt vi nấm của các DDVS khi tinh dầu Trầu không được sử dụng đơn lẻ cũng như khi được kết hợp với các chất diệt nấm khác. Nồng độ 3,2 % tinh dầu Trầu không là cần thiết để có thể diệt 99 % vi nấm sau 15s tiếp xúc (trong thiết kế thí nghiệm có pha loãng gấp đôi DDVS), dù sử dụng đơn hoặc kết hợp với các chất diệt vi nấm khác.

#### **Lời cảm ơn**

Chúng tôi xin cảm ơn Công ty TNHH Đầu tư Quốc tế Tường Ngọc và Công ty CP tinh dầu thiên nhiên Hà Nội đã tư vấn và tài trợ hóa chất, nguyên liệu cho tôi để thực hiện nghiên cứu.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Willems H.M.E, et al., (2020). Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *Journal of fungi* 6(1): 27
2. Nayaka N. et al (2021), "Piper betle (L): Recent review of antibacterial and antifungal properties, safety profiles, and commercial applications", *Molecules*, 26(8): 2321
3. L Rigano et al.,(2003), Selective detersion, *SÖFW J* 129(1/2) 52–60
4. Ying C. et al., (2017) Role of female intimate hygiene in vulvovaginal health: Global hygiene practices and product usage, *Womens Health (Lond)*. 13(3): 58–67.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018), M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 54-62.
6. Panuwat S. et al. (2006), "Antimicrobial and Antioxidant Activities of Betel Oil", *Kasetsart Journal - Natural Science* 40 (Suppl.): 91-100
7. Adeltrudes B. et al., (2010), "Characterization and evaluation of antimicrobial activity of the essential oil from the leaves of Piper betle L.", *E-International Scientific Research Journal*, 2(1): 2-13
8. Cox S.D. et al. (2000), "The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil)", *Journal of Applied Microbiology*, 88(1): 170-175
9. Elisa S., (2018), Antifungal Activity of Commercial Essential Oils and Biocides against *Candida Albicans*, *Pathogens* 25;7(1):15
10. Các Phụ lục của Hiệp định Mỹ phẩm ASEAN về các chất sử dụng trong mỹ phẩm cập nhật ngày 25.07.2022 <https://dav.gov.vn/cac-phu-luc-cua-hiep-dinh-my-pham-asean-ve-cac-chat-su-dung-trong-my-pham-cap-nhat-ngay-25072022-annex-n3541.html>.



Phụ lục 1. Hình ảnh kết quả đánh giá khả năng diệt *C. albicans* của các DDVS.

Mẫu trước khi tiếp xúc	15s sau khi tiếp xúc DDVS		
T0-1	A1-1	B1-1	C1-0
<p>Ghi chú: Hình ảnh khuẩn lạc <i>C. albicans</i> trên đĩa Petrie. Lượng vi nấm sống được xác định thông qua phương pháp pha loãng và cấy trên đĩa thạch SDA. Hai nồng độ pha loãng 0 (<math>10^0</math>- không pha loãng) và pha loãng -1 (<math>10^{-1}</math>- pha loãng 10 lần); của các mẫu trước (T0) và sau khi tiếp xúc 15s với DDVS (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4). Các mẫu được ghi tên mẫu, kèm nồng độ pha loãng trên mỗi đĩa Petrie. Hình ảnh chỉ thể hiện 1 lần thí nghiệm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập.</p>			
	A2-1	B2-0	C2-0
	A3-1	B3-0	C3-0
	A4-0	B4-0	C4-0