

MỞ ĐẦU

1. Lí do chọn đề tài

Helicobacter pylori là một loài xoắn khuẩn Gram âm có khả năng sống và sản sinh các độc tố gây viêm loét dạ dày - tá tràng và ung thư dạ dày ở người [1]. Liệu pháp sử dụng kháng sinh để loại trừ *H. pylori* có hiệu quả cao trong điều trị các bệnh lý dạ dày, và góp phần ngăn chặn sự phát triển ung thư dạ dày [2]. Tuy nhiên, những tác dụng phụ của các loại thuốc kháng sinh cùng với sự gia tăng của các chủng *H. pylori* đa kháng với kháng sinh đã ảnh hưởng lớn đến các phác đồ điều trị ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam [3, 4]. Thực trạng này đã đặt ra nhu cầu cấp thiết cho việc nghiên cứu tìm kiếm nguồn dược liệu mới an toàn và hiệu quả từ cây cỏ thiên nhiên để hỗ trợ hoặc thay thế cho kháng sinh.

Các chế phẩm có nguồn gốc thảo dược, bao gồm cả các chế phẩm từ tinh dầu đang chấp nhận bởi cộng đồng trên toàn thế giới vì tính an toàn cho người sử dụng. Ngoài ra, các chiết xuất tự nhiên nói chung và tinh dầu nói riêng thường tác động lên vi khuẩn đồng thời trên nhiều đích khác nhau, trong khi đó mỗi loại kháng sinh chỉ tác động trên một đích duy nhất. Do vậy, các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học này thường ít có nguy cơ gây ra sự kháng thuốc ở vi khuẩn [5].

Trong những năm gần đây, nhiều cao chiết và tinh dầu thực vật đã được chứng tỏ có hoạt tính kháng *H. pylori*, và cho thấy không hoặc ít có khả năng gây ra sự phát triển tính kháng ở vi khuẩn [6, 7]. Bời lời chanh (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.) là một loài thực vật có tinh dầu thuộc họ Long não (Lauraceae). Quả ăn được của bời lời chanh được sử dụng trong y học cổ truyền Việt Nam dùng để kích thích hệ tiêu hóa và trị đau dạ dày và đau đầu [8, 9]. Tinh dầu từ quả bời lời chanh cũng đã được chứng minh có tác động kháng khuẩn đối với các loài vi khuẩn Gram âm và vi khuẩn Gram dương [10, 11]. Do đó, trên cơ sở sàng lọc hoạt tính kháng *H. pylori* của

tinh dầu từ một số loài cây thuốc dân gian Việt Nam, đề tài này tập trung nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn, tác động sinh học của tinh dầu từ quả bời lời chanh (*L. Cubeba*) và một số hợp chất thành phần lên *H. pylori*, từ đó cung cấp cơ sở cho việc hướng tới sử dụng tinh dầu này trong hỗ trợ điều trị và phòng ngừa các bệnh lý dạ dày do *H. pylori* gây ra.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Thu nhận và đánh giá được hoạt tính kháng khuẩn, tác động sinh học của tinh dầu từ quả bời lời chanh (*L. cubeba*) và một số hợp chất thành phần lên *H. pylori*.

3. Nội dung nghiên cứu

- Thu nhận tinh dầu và sàng lọc hoạt tính kháng *H. pylori* của các tinh dầu từ 24 loài cây thuốc dân gian Việt Nam.

- Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu từ quả bời lời chanh (*L. cubeba*) và một số hợp chất thành phần lên *H. pylori*.

- Đánh giá tác động sinh học của tinh dầu từ quả bời lời chanh và một số hợp chất thành phần lên *H. pylori*, bao gồm các tác động ức chế urease, ức chế thành lập biofilm, tăng tính thấm, phá vỡ tính toàn vẹn màng tế bào, biến đổi hình thái và cấu trúc bề mặt màng ngoài, gây phân mảnh DNA và ức chế khả năng gắn lên niêm mạc dạ dày chuột của *H. pylori*.

4. Đóng góp mới của luận án

- Đề tài đã xác định được giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và giá trị nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của tinh dầu từ 24 loài cây thuốc dân gian Việt Nam.

- Thành phần hóa học của tinh dầu và nước chưng quả bời lời chanh (*L. cubeba*) tại Kontum (Việt Nam) đã được xác định.

- Hoạt tính kháng khuẩn, tác động sinh học của tinh dầu từ quả bời lời chanh và một số hợp chất thành phần lên *H. pylori* đã được đánh giá.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori là một loài vi khuẩn Gram âm, có dạng hình xoắn, hình que cong hay hình chữ “S” với hai đầu tròn và có 4 - 7 roi ở một cực của tế bào [12]. Tế bào *H. pylori* có chiều rộng khoảng 0,5 μm và chiều dài lên đến 3,0 μm hoặc có thể hơn [13]. *H. pylori* có hoạt tính urease, catalase và oxidase dương tính mạnh [14]. *H. pylori* sống trong điều kiện vi hiếu khí (2 đến 5% Oxy), có thể tồn tại trong môi trường pH < 4,0 nhưng sự sinh trưởng chỉ xảy ra ở điều kiện pH từ 5,5 đến 8,0 [1, 15].

Những đặc điểm về hình thái cùng với khả năng sản xuất các protein màng ngoài và các độc tố như urease, VacA, CagA đã giúp *H. pylori* có thể sống sót trong môi trường acid thấp, sau đó xâm nhiễm và gây tổn hại đối với dạ dày người. Các bệnh lý dạ dày liên quan đến sự xâm nhiễm của *H. pylori* bao gồm: viêm loét dạ dày - tá tràng (10%), viêm teo dạ dày (5%), và ung thư dạ dày (1%) [16]. Viêm loét dạ dày - tá tràng là kết quả tổng hợp từ hoạt động của các độc tố do *H. pylori* tiết ra như Vac A, urease, phospholipases, protease, HP-NAP và CagA [17]. Sự gây ra ung thư bởi *H. pylori* là kết quả tác động của nhiều yếu tố như CagA, VacA, các phân tử bám dính như BabA và SabA [18]. Tuy nhiên, CagA được cho là nguyên nhân chính gây ra ung thư dạ dày [19].

Biện pháp sử dụng thuốc kháng sinh trong điều trị *H. pylori* được chứng tỏ có hiệu quả, tuy nhiên sự xuất hiện ngày càng tăng của các chủng *H. pylori* đa đề kháng với kháng sinh đã ảnh hưởng lớn đến phác đồ điều trị [20, 21]. Tình hình kháng các kháng sinh sử dụng phổ biến trong điều trị *H. pylori* như clarithromycin, metronidazole, tetracycline, amoxicillin và levofloxacin được báo cáo xảy ra ở nhiều nước trên thế giới [21].

1.2. Hoạt tính kháng *H. pylori* của tinh dầu thực vật

Tinh dầu từ nhiều loài thực vật khác nhau được báo cáo có hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với các chủng *H. pylori* nhạy và kháng thuốc kháng sinh với MIC (MBC) dao động từ 0,25 (0,50) - 160,00 (310,00) $\mu\text{g/mL}$, và ít

hoặc không có nguy cơ làm xuất hiện các chủng kháng [22]. Các hợp chất có trong tinh dầu cũng được chứng tỏ có tác động ức chế tăng trưởng đối với *H. pylori* với MIC = 1 - 1000 µg/mL và MBC = 25 - 1250 µg/mL [22]. Các tinh dầu thực vật và các hợp chất thành phần được chứng tỏ có nhiều tác động sinh học khác nhau lên *H. pylori* bao gồm: ức chế hoạt tính urease, gây biến đổi hình thái, phá vỡ tính toàn vẹn màng tế bào, giảm khả năng di chuyển, ức chế sự bám dính, ức chế sự thành lập biofilm và ức chế sự biểu hiện gene [22]. Các tinh dầu và các hợp chất thành phần được báo cáo có tác động làm giảm sự cố định của *H. pylori* vào niêm mạc dạ dày của các động vật thí nghiệm [22].

1.4. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu quả bời lời chanh (*L. cubeba*)

Tinh dầu quả bời lời chanh được ghi nhận có tác động kháng khuẩn đối với nhiều loài vi khuẩn Gram âm và Gram dương như *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *M. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* [11], *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum* [23], *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* và *S. sanguinis* [24]. Các hợp chất của tinh dầu này có tác động kháng khuẩn đối với *S. mutans*, *S. sobrinus* và *S. sanguinis* [24]. Các hợp chất monoterpenoid có hoạt tính mạnh hơn các monoterpen và sesquiterpen hydrocarbon [24]. Citral có đóng góp lớn nhất vào hoạt tính của tinh dầu quả bời lời chanh [24].

Tinh dầu quả bời lời chanh kháng *S. aureus* đa kháng thuốc với MIC = 0,5 mg/mL và MBC = 1 mg/mL [25]. Tinh dầu này có tác động phá vỡ tính toàn vẹn của màng tế bào, ức chế con đường Hexose Monophosphate và tương tác với DNA của *S. aureus* [25]. Tinh dầu quả bời lời chanh có tác động làm thay đổi tính thấm của màng tế bào và gây ra sự rò rỉ các đại phân tử sinh học nội bào ở *Acinetobacter baumannii* [26].

Những nghiên cứu trên chứng tỏ tinh dầu quả bời lời chanh có khả năng kháng nhiều loài vi khuẩn với một vài cơ chế tác động. Tuy nhiên, hoạt tính kháng khuẩn và tác động sinh học của tinh dầu quả bời lời chanh và các hợp chất thành phần lên *H. pylori* vẫn chưa được nghiên cứu.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu thực vật

Mẫu thực vật được thu nhận từ 24 loài cây thuốc dân gian Việt Nam.

2.2. Chủng vi khuẩn

Chủng chuẩn *H. pylori* ATCC 43504 và 5 chủng *H. pylori* phân lập (OX.22, OX.63, OX.64, OX.67 và OX.83).

2.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng đực (chủng Swiss albino, 6 - 8 tuần tuổi).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Mô tả định danh loài thực vật

Các mẫu thực vật được mô tả hình thái và được định danh bằng phương pháp so sánh hình thái.

2.4.2. Thu nhận tinh dầu từ các mẫu thực vật

Tinh dầu thực vật được thu nhận bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn với hơi nước trong bộ chưng cất tinh dầu Clevenger.

2.4.3. Xác định thành phần hóa học của tinh dầu và nước chưng quả bởi lờ chanh (*L. cubeba*)

Các thành phần hóa học có trong tinh dầu và nước chưng (hydrosol) được xác định bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC/MS).

2.4.4. Phương pháp xác định hoạt tính kháng *H. pylori*

Hoạt tính kháng *H. pylori* được xác định bằng phương pháp pha loãng, phương pháp đĩa giấy, phương pháp xông hơi, và phương pháp khảo sát thời gian ức chế tăng trưởng và diệt khuẩn.

2.4.5. Phương pháp đánh giá cơ chế tác động của tinh dầu và các hợp chất lên *H. pylori* ATCC43504

❖ Tác động ức chế lên urease của *H. pylori*

Hoạt tính ức chế urease được xác định theo phương pháp salicylate-hypochloride. Lượng ammonia được giải phóng từ quá trình phân giải urea bởi urease được định lượng bằng đo OD ở 625 nm. Hoạt tính ức chế urease được biểu thị thông qua giá trị nồng độ ức chế 50% (IC₅₀).

❖ **Tác động ức chế lên sự thành lập biofilm của *H. pylori***

Tác động ức chế sự thành lập biofilm của *H. pylori* được xác định bằng phương pháp nhuộm crystal violet. Mức độ hình thành biofilm được định lượng bằng cách đo OD của dung dịch màu tại bước sóng 595 nm và phần trăm ức chế sự thành lập biofilm được ghi nhận.

❖ **Tác động lên tính thấm của màng tế bào *H. pylori***

Tác động tăng tính thấm của màng tế bào *H. pylori* được đánh giá qua khả năng hấp thụ crystal violet của màng tế bào. Tính thấm của màng tế bào vi khuẩn đối với crystal violet được xác định bằng cách đo OD ở 595 nm và phần trăm hấp thụ thuốc nhuộm được ghi nhận.

❖ **Tác động lên tính toàn vẹn của màng tế bào *H. pylori***

Tác động phá vỡ tính toàn vẹn của màng tế bào *H. pylori* được đánh giá thông qua định lượng protein thoát ra khỏi tế bào vào trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp Bradford và điện di trên SDS-PAGE.

❖ **Tác động lên hình thái tế bào và cấu trúc màng ngoài *H. pylori***

Tác động gây biến đổi hình thái và cấu trúc bề mặt màng ngoài của *H. pylori* được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Hình ảnh hình thái tế bào và cấu trúc bề mặt màng ngoài của tế bào *H. pylori* được ghi nhận ở các độ phóng đại 10.000 - 30.000X.

❖ **Tác động lên tính toàn vẹn phân tử DNA của *H. pylori***

Tác động lên tính toàn vẹn phân tử DNA của tế bào *H. pylori* được thực hiện theo phương pháp của Cutro *et al.* (2023). DNA được thu nhận bằng cách sử dụng bộ kit tách chiết DNA ExgeneTM Cell SV (GeneAll, Korea) và được điện di trên gel agarose.

❖ **Tác động lên sự cố định của *H. pylori* ở niêm mạc dạ dày chuột**

Tác động của tinh dầu lên khả năng cố định (colonization) của *H. pylori* ở niêm mạc dạ dày chuột được khảo sát theo phương pháp của Ngan (2013). Các tiêu bản mô dạ dày chuột được thực hiện và sự cố định của *H. pylori* trên niêm mạc dạ dày chuột được ghi nhận bằng kính hiển vi quang học.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thu nhận tinh dầu và sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của các tinh dầu thực vật lên *H. pylori*

3.1.1. Mô tả định danh các mẫu thực vật

Đề tài đã mô tả định danh được 24 loài cây thuốc dân gian thuộc 6 họ thực vật. Họ Cúc (Asteraceae) có 3 loài gồm cỏ lào (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.), cúc leo (*Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Rob.) và ngải cứu (*Artemisia vulgaris* L.). Họ Hoa môi (Lamiaceae) có 3 loài gồm é tía (*Ocimum tenuiflorum* L.), tía tô (*Perilla frutescens* (L.) Britton) và tía tô dại (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.). Họ Long não (Lauraceae) có 1 loài là bời lời chanh (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.). Họ Hồ tiêu (Piperaceae) có 4 loài gồm hồ tiêu (*Piper nigrum* L.), lá lốt (*Piper sarmentosum* Roxb.), tiêu lốt (*Piper longum* L.) và trầu không (*Piper betle* L.). Họ Cam chanh (Rutaceae) có 5 loài gồm bưởi (*Citrus maxima* (Burm.) Osbeck), cam sành (*C. nobilis* Lour.), chanh ta (*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle), quýt (*C. reticulata* Blanco) và tắc (*C. japonica* Thunb.). Họ Gừng (Zingiberaceae) có 8 loài gồm địa liền (*Kaempferia galanga* L.), gừng (*Zingiber officinale* Roscoe), gừng gió (*Z. zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.), nghệ đen (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe), nghệ vàng (*C. longa* L.), ngải bún (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.), riềng (*Alpinia officinarum* Hance) và riềng ắm (*A. zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm.).

3.1.2. Hiệu suất thu nhận tinh dầu từ các mẫu thực vật

Hiệu suất thu nhận tinh dầu từ 24 mẫu thực vật dao động từ 0,12 đến 4,65%. Vỏ quả quýt (*C. reticulata*) cho hiệu suất thu tinh dầu cao nhất (4,65%), tiếp theo là vỏ quả cam sành (*C. nobilis*), vỏ quả tắc (*C. japonica*), quả bời lời chanh (*L. cubeba*) và vỏ quả bưởi (*C. maxima*) cho hiệu suất thu tinh dầu lần lượt là 2,77; 2,33; 2,31 và 1,87%. Các mẫu còn lại cho hiệu suất thu nhận tinh dầu thấp hơn 1%.

3.1.3. Hoạt tính kháng *H. pylori* của các tinh dầu

Tinh dầu từ quả bời lời chanh (*L. cubeba*) biểu hiện hoạt tính kháng *H. pylori* mạnh nhất với MIC (MBC) = 0,08 (0,63) mg/mL. Nhóm các tinh dầu cũng có hoạt tính ức chế tăng trưởng mạnh đối với *H. pylori* đó là tinh dầu thân rễ cây gừng *Z. officinale* (MIC (MBC) = 0,10 (1,25) mg/mL), cây é tía *O. tenuiflorum* (MIC (MBC) = 0,13 (2,00) mg/mL), rễ củ cây ngải bún *B. rotunda* (MIC (MBC) = 0,16 (1,25) mg/mL), thân rễ cây ngải bún (MIC (MBC) = 0,31 (2,50) mg/mL), quả hồ tiêu *P. nigrum* (MIC = 0,50 (5,00) mg/mL) và thân rễ cây gừng gió *Z. zerumbet* (MIC (MBC) = 0,50 (5,00) mg/mL). Các tinh dầu còn lại có hoạt tính ức chế trung bình (MIC = 0,63 - 1,00 mg/mL), yếu (MIC = 2,00 - 2,50 mg/mL) hoặc không có hoạt tính ức chế đối với *H. pylori* (MIC = 5,00 mg/mL). Các tinh dầu nghiên cứu có hoạt tính ức chế tăng trưởng lên *H. pylori* hơn là hoạt tính diệt khuẩn vì tỉ lệ giá trị MBC/MIC ≥ 4 .

3.2. Hoạt tính kháng *H. pylori* của tinh dầu quả bời lời chanh (*L. cubeba*) và các hợp chất thành phần

3.2.1. Hoạt tính kháng các chủng *H. pylori* kháng thuốc của tinh dầu quả bời lời chanh (*L. cubeba*)

Với phương pháp pha loãng tinh dầu trên đĩa 96 giếng, kết quả ở **Bảng 3.1** cho thấy tinh dầu quả bời lời chanh có hoạt tính kháng *H. pylori* với MIC (MBC) = 0,08 (0,63) mg/mL, tương tự nhau đối với tất cả các chủng khảo sát. Tuy nhiên, các kháng sinh thử nghiệm có hoạt tính ức chế khác nhau lên các chủng *H. pylori* khác nhau và mỗi chủng *H. pylori* kháng ít nhất 1 trong 5 kháng sinh thử nghiệm.

Với phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch và phương pháp xông hơi, kết quả cho thấy hoạt tính ức chế của tinh dầu phụ thuộc nồng độ xử lý. Kết quả xử lý thống kê cho thấy hoạt tính ức chế của tinh dầu không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê giữa các chủng *H. pylori* ở từng nồng độ khảo sát ($P > 0,05$).

Bảng 3.1. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của tinh dầu bởi lõi chanh và các kháng sinh lên các chủng *H. pylori* được xác định bằng phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng

Vật liệu	MIC (MBC), mg/mL					
	ATCC 43504	OX.22	OX.63	OX.64	OX.67	OX.83
Tinh dầu	0,08 (0,63)	0,08 (0,63)	0,08 (0,63)	0,08 (0,63)	0,08 (0,63)	0,08 (0,63)
Kháng sinh	MIC (MBC), µg/mL					
	AMX	AZM	ERY	LFX	MTZ	
AMX	0,03 (0,06)	0,06 (0,25)	0,06 (0,25)	0,06 (0,13)	0,03 (0,13)	0,06 (0,25)
AZM	0,50 (1,00)	0,50 (1,00)	32,00 (128,00)	16,00 (128,00)	32,00 (128,00)	24,00 (128,00)
ERY	0,06 (0,13)	32,00 (128,00)	32,00 (128,00)	40,00 (160,00)	32,00 (128,00)	32,00 (128,00)
LFX	0,13 (0,25)	0,06 (0,50)	0,06 (0,50)	32,00 (128,00)	0,06 (0,25)	0,75 (1,25)
MTZ	32,00 (192,00)	32,00 (256,00)	64,00 (256,00)	32,00 (256,00)	2,00 (4,00)	1,50 (2,00)

Penicillins: AMX = amoxicillin. **Macrolides:** AZM = azithromycin và ERY = erythromycin. **Fluoroquinolones:** LFX = levofloxacin. **Nitroimidazole:** MTZ = metronidazole. MDR = multiple drug resistance, R = resistance, S = susceptible.

Điểm gãy (breakpoint) nhạy cảm (S)/kháng (R) đối với một số kháng sinh (MIC breakpoint S/R, µg/mL): AMX (<0.125/>0.125); AZM (<1/>1); ERY (<0,5/>0,5); LFX (<1/>1), và MTZ (<8/>8).

3.2.2. Thành phần hóa học của tinh dầu và nước chưng quả bời lời chanh

Có 24 hợp chất trong tinh dầu và 15 hợp chất trong nước chưng đã được xác định bằng phương pháp GC-MS. Tinh dầu có các thành phần chính bao gồm geranial (32,0%), neral (24,3%), citronellal (14,2%), limonene (10,1%), linalool (2,2%), 1,8-cineole (1,5%), sabinene (1,4%) và citronellol (1,2%). Các hợp chất chính có trong dịch chiết nước chưng gồm geranial (32,9%), neral (27,1%), *p*-menthan-8-yl acetate (8,5%), 2-cyclopropyl-2-methylspiro [2.2] pentane-1-carboxylic acid (8,1%), linalool (4,2%), methyl heptenone (4,2%), citronellal (2,1%), α -terpineol (1,0%) và terpinen-4-ol (1,0%).

3.2.3. Hoạt tính kháng *H. pylori* của 6 hợp chất có trong tinh dầu và nước chưng quả bời lời chanh (*L. cubeba*)

Bảng 3.2 cho thấy citronellol có hoạt tính kháng *H. pylori* mạnh nhất với MIC (MBC) = 0,04 (0,16) mg/mL, mạnh hơn so với tinh dầu (MIC (MBC) = 0,08 (0,63) mg/mL). Tiếp theo là citral với giá trị MIC (MBC) = 0,08 (0,31) mg/mL (tương tự tinh dầu) và các hợp chất còn lại đều có hoạt tính yếu hơn tinh dầu. Citral đóng góp lớn nhất vào hoạt tính kháng *H. pylori* của tinh dầu với AI = 227.

Bảng 3.2. Giá trị MIC và MBC của 6 hợp chất lên *H. pylori* ATCC 43504

Vật liệu	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC	AI
Citronellol	0,04	0,16	4	9,4
Citral	0,08	0,31	4	227,0
Citronellal	0,31	0,63	2	28,2
1,8-Cineole	0,31	0,63	2	3,0
Linalool	0,31	0,63	2	4,4
Limonene	0,31	1,25	4	10,1
Tinh dầu	0,08	0,63	8	-
Nước chưng	100	400	4	-
Amoxicillin	0,06 μ g/mL	0,13 μ g/mL	2	-

AI: chỉ số tác động kháng khuẩn của mỗi hợp chất trong tinh dầu

Kết quả khảo sát thời gian ức chế tăng trưởng và diệt khuẩn cho thấy ở nồng độ $\frac{1}{2}$ x MIC của tinh dầu, nước chưng và các hợp chất, mật độ tế bào có sự tăng lên sau 24 giờ nhưng thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với đối chứng âm. Ở nồng độ MIC, sự tăng trưởng của *H. pylori* bị ức chế và mật độ tế bào gần như không đổi trong suốt thời gian 48 giờ xử lý. Ở nồng độ MBC, các hợp chất, tinh dầu và nước chưng làm giảm đáng kể mật độ *H. pylori* sau 6 – 12 giờ xử lý. Citronellol (0,16 mg/mL), citral (0,31 mg/mL), citronellal (0,63 mg/mL), linalool (0,63 mg/mL) và tinh dầu (0,63 mg/mL) tiêu diệt hoàn toàn *H. pylori* sau 24 giờ. 1,8-cineole (0,63 mg/mL), limonene (1,25 mg/mL) và nước chưng (400 mg/mL) tiêu diệt hoàn toàn *H. pylori* sau 36 giờ.

3.3. Tác động sinh học của tinh dầu quả bời lời chanh (*L. cubeba*) và 6 hợp chất thành phần lên chủng *H. pylori* ATCC 43504

3.3.1. Tác động ức chế lên urease của *H. pylori*

Bảng 3.3 cho thấy tinh dầu có tác động ức chế mạnh lên urease với $IC_{50} = 0,135$ mg/mL. Citral có tác động ức chế urease tương tự như tinh dầu với giá trị $IC_{50} = 0,145$ mg/mL ($P > 0,05$) và ức chế 98,23% hoạt tính urease ở nồng độ 1,2 mg/mL. Các hợp chất còn lại có tác động ức chế urease với IC_{50} dao động từ 0,332 - 1,348 mg/mL.

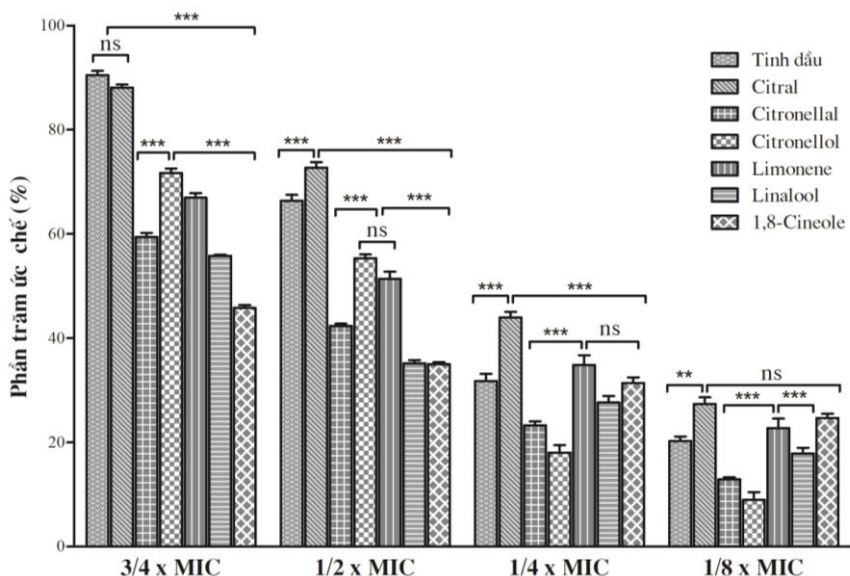
Bảng 3.3. Giá trị ức chế 50% hoạt tính urease của tinh dầu và 6 hợp chất

Vật liệu	IC_{50} (mg/mL)	Khoảng tin cậy* (mg/mL)
Tinh dầu	0,135 ^b	0,131 – 0,139
Citral	0,145 ^b	0,138 – 0,152
Citronellal	0,332 ^c	0,296 – 0,372
Citronellol	0,746 ^d	0,676 – 0,823
Linalool	0,787 ^d	0,716 – 0,864
Limonene	1,248 ^e	1,018 – 1,530
1,8-cineole	1,348 ^e	1,165 – 1,561
Thiourea	0,045 ^a	0,041 – 0,049

* $\alpha = 0,05$; Giá trị IC_{50} được theo sau bởi các chữ cái khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 95%.

3.3.2. Tác động ức chế lên sự thành lập biofilm của *H. pylori*

Hình 3.1 cho thấy ở nồng độ $3/4 \times \text{MIC}$, tinh dầu (0,06 mg/mL) có tác động ức chế mạnh lên sự thành lập biofilm với phần trăm ức chế đạt 90,47%. Citral (0,06 mg/mL) biểu hiện tác động ức chế tương tự tinh dầu ($P > 0,05$) với phần trăm ức chế đạt 88,09%. Ở nồng độ $1/2 \times \text{MIC}$, tinh dầu (0,04 mg/mL) ức chế 66,38% sự thành lập biofilm ở *H. pylori*, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với citral (0,04 mg/mL) với phần trăm ức chế đạt 72,71% ($P < 0,001$). Ở các nồng độ $1/4 \times \text{MIC}$ và $1/8 \times \text{MIC}$, cả tinh dầu và 6 hợp chất đều có tác động ức chế yếu lên sự thành lập biofilm (12,9 – 44%).

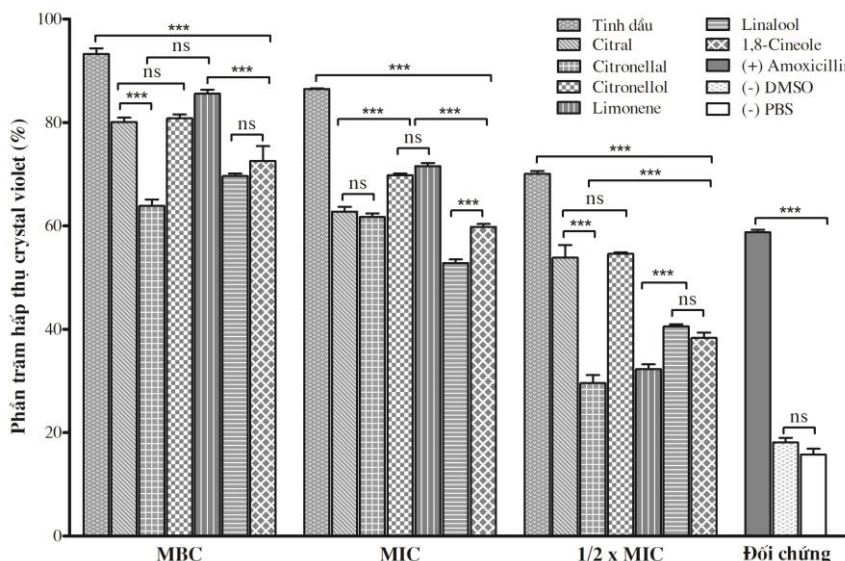


Hình 3.1. Tác động ức chế của tinh dầu quả bời lời chanh (*L. cubeba*) và các hợp chất lên sự thành lập biofilm ở *H. pylori* với sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nồng độ xử lý ở mức $P < 0,001$ (Bonferroni).

3.3.3. Tác động lên tính thấm của màng tế bào *H. pylori*

Ảnh hưởng lên tính thấm của màng tế bào *H. pylori* được đánh giá qua khả năng hấp thụ crystal violet của *H. pylori*. Kết quả ở **Hình 3.2** cho thấy khả năng hấp thụ crystal violet của *H. pylori* ở các nghiệm thức xử lý với tinh dầu và 6 hợp chất ở các nồng độ khác nhau ($1/2 \times \text{MIC}$, MIC và

MBC) đều cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng âm không có hoặc có DMSO 2,5% ($P < 0,001$). Tinh dầu ở nồng độ MBC (0,63 mg/mL), MIC (0,08 mg/mL) và $1/2 \times \text{MIC}$ (0,04 mg/mL) có tác động làm tăng tính thấm của màng tế bào *H. pylori* với phần trăm hấp thụ crystal violet đạt 70,06 - 93,25%, mạnh hơn 6 hợp chất thành phần ($P < 0,001$). Ở nồng độ MBC, citral (0,31 mg/mL), citronellol (0,16 mg/mL) và limonene (1,25 mg/mL) cũng có tác động tăng tính thấm mạnh với phần trăm hấp thụ crystal violet đạt 80,10 – 85,57%.

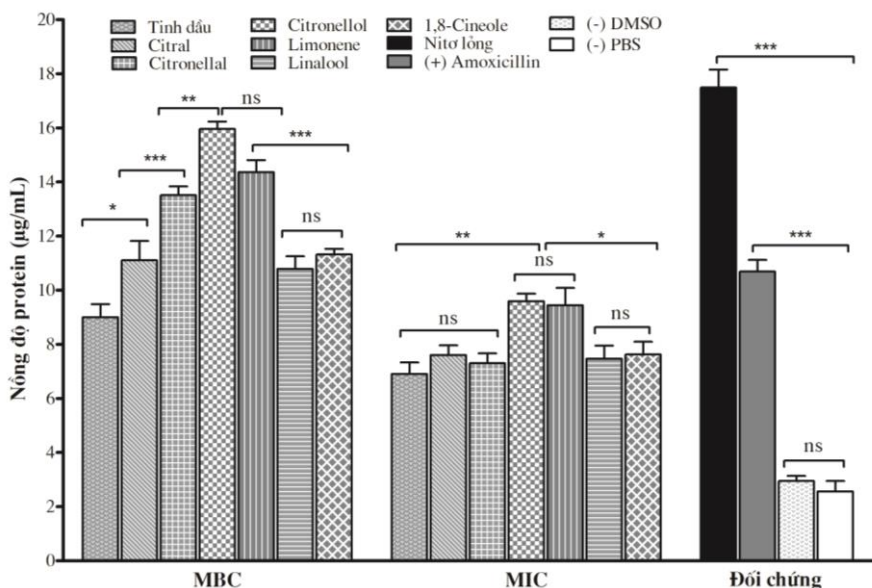


Hình 3.2. Sự hấp thụ crystal violet của *H. pylori* dưới tác động của tinh dầu bời lời chanh (*L. cubeba*) và các hợp chất với sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nồng độ xử lý ở mức $P < 0,001$ (Bonferroni).

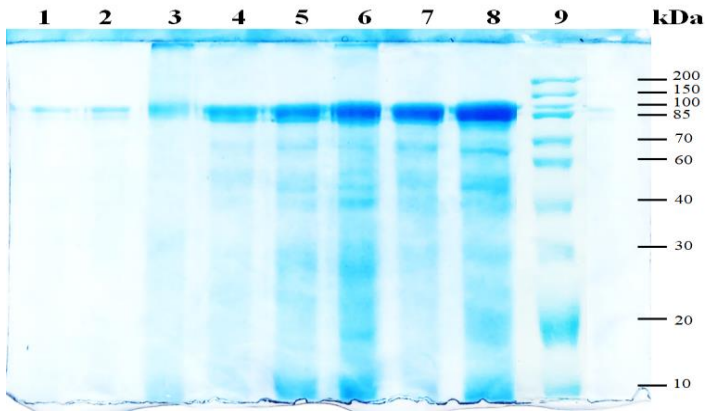
3.3.4. Tác động lên tính toàn vẹn của màng tế bào *H. pylori*

Tác động lên tính toàn vẹn của màng tế bào *H. pylori* được đánh giá qua lượng protein nội bào rò rỉ vào trong dịch nuôi cấy. Kết quả ở **Hình 3.3** cho thấy nồng độ protein trong dịch nổi ở đối chứng âm có DMSO và đối chứng âm không có DMSO (PBS) lần lượt là 2,51 và 2,01 $\mu\text{g/mL}$. Dưới tác động của tinh dầu và 6 hợp chất ở nồng độ MBC và MIC cho thấy có sự

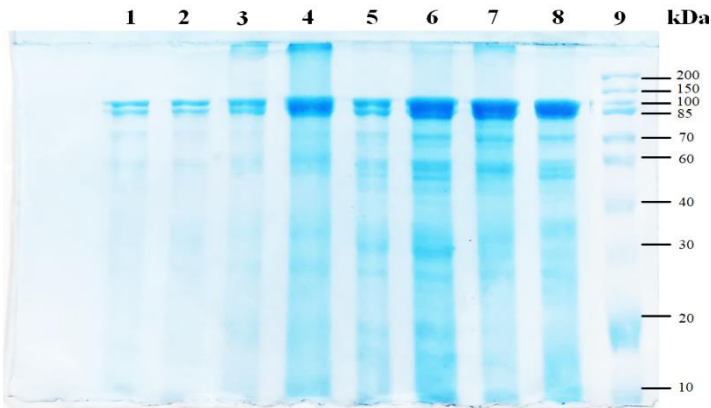
thoát protein nội bào vào trong dịch nổi với nồng độ protein cao hơn đáng kể so với đối chứng âm không chứa hoặc chứa DMSO 2,5% ($P < 0,001$). Đặc biệt ở nồng độ MBC, citronellol (0,16 mg/mL), limonene (1,25 mg/mL) và citronellal (0,63 mg/mL) có tác động gây rò rỉ protein nội bào mạnh với nồng độ protein hiện diện trong dịch nổi từ 13,51 - 15,96 $\mu\text{g/mL}$, cao hơn rõ rệt ($P < 0,001$) so với tinh dầu và các hợp chất còn lại. Điện di trên SDS-PAGE cũng cho kết quả tương tự (Hình 3.4 - 3.6).



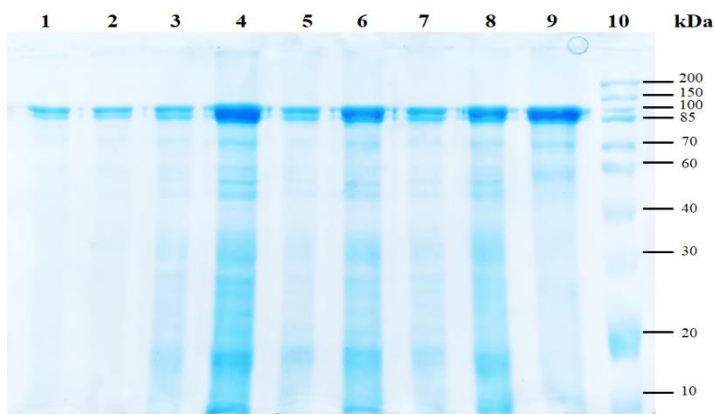
Hình 3.3. Nồng độ protein trong dịch nổi của *H. pylori* dưới tác động của tinh dầu bời lời chanh (*L. cubeba*) và các hợp chất với sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nồng độ xử lý ở mức $P < 0,001$. “****” chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $P < 0,001$, “***” chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $P < 0,01$, “*” chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $P < 0,05$, “ns” cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $P > 0,05$ (Bonferroni).



Hình 3.4. Kết quả điện di SDS-PAGE protein từ dịch nổi của *H. pylori* dưới tác động của tinh dầu bởi lời chanh và citronellol. Lane: 1. (-) PBS; 2. (-) DMSO 2,5%; 3. Tinh dầu ở MIC; 4. Tinh dầu ở MBC; 5. Citronellol ở MIC; 6. Citronellol ở MBC; 7. (+) Amoxicillin ở MBC; 8. Nitơ lỏng; 9. Thang protein marker.



Hình 3.5. Kết quả điện di SDS-PAGE protein từ dịch nổi của *H. pylori* dưới tác động của citral và limonene. Lane: 1. (-) PBS; 2. (-) DMSO 2,5%; 3. Citral ở MIC; 4. Citral ở MBC; 5. Limonene ở MIC; 6. Limonene ở MBC; 7. (+) Amoxicillin ở MBC; 8. Nitơ lỏng; 9. Thang protein marker.

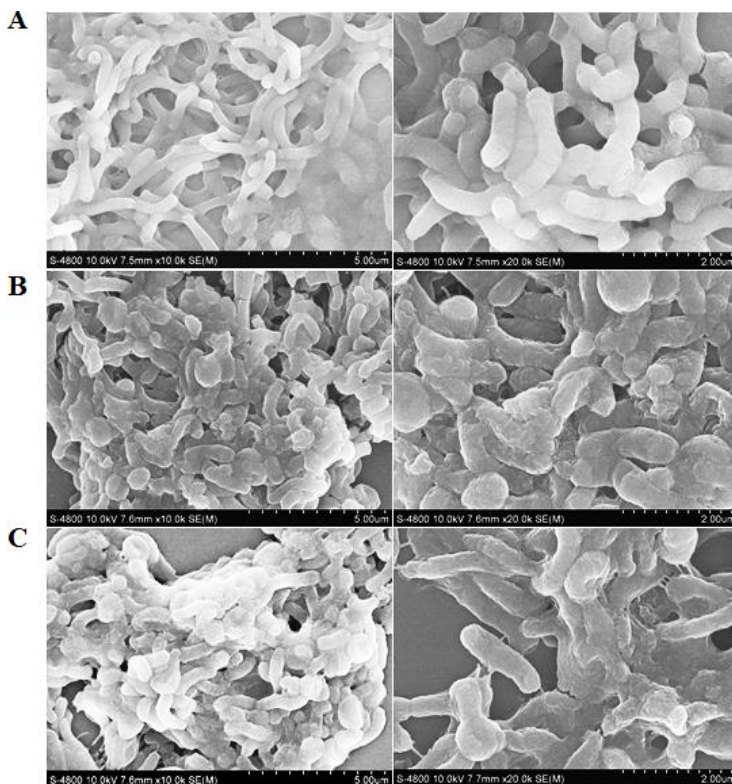


Hình 3.6. Kết quả điện di SDS-PAGE protein từ dịch nổi của *H. pylori* dưới tác động của citronellal, linalool, và 1,8-cineole. Lane: 1. (-) PBS; 2. (-) DMSO 2,5%; 3. Citronellal MIC; 4. Citronellal MBC; 5. Linalool MIC; 6. Linalool MBC; 7. 1,8-Cineole MIC; 8. 1,8-Cineole MBC; 9. (+) Amoxicillin MBC; 10. Thang protein marker.

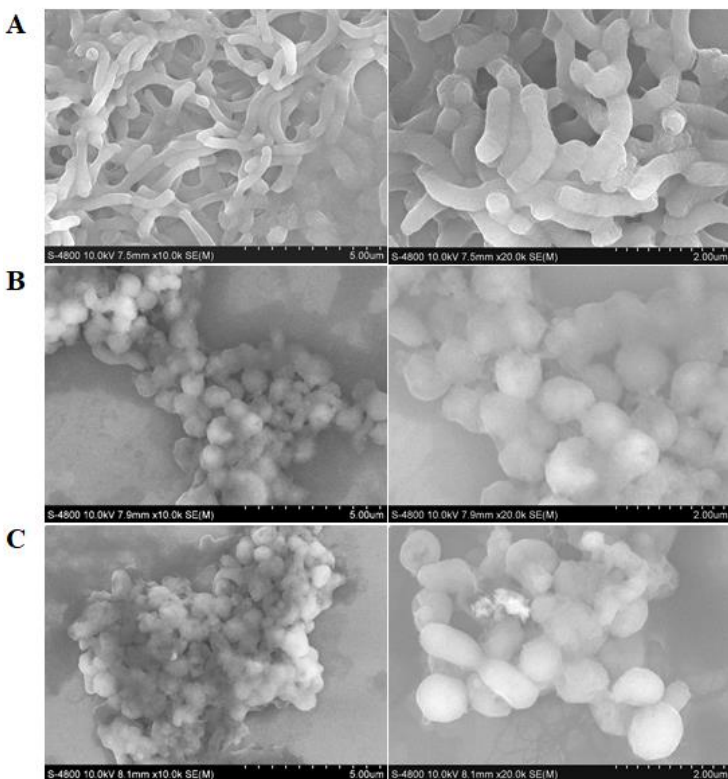
3.3.5. Tác động lên hình thái tế bào và cấu trúc bề mặt màng ngoài của *H. pylori*

Hầu hết các tế bào *H. pylori* ở dạng spiral trong môi trường đối chứng âm, chỉ có 3,77 - 3,82% tế bào ở dạng coccoid. Ảnh SEM cho thấy cấu trúc bề mặt màng ngoài của tế bào *H. pylori* đồng nhất và không bị gồ ghề biến dạng ở môi trường đối chứng âm (**Hình 3.7A**). Tại nồng độ MIC, tỷ lệ (%) dạng coccoid ghi nhận được là 8,15% khi xử lý với tinh dầu (0,08 mg/mL) và 10,07% coccoid khi xử lý với citronellol (0,04 mg/mL). Ảnh SEM cho thấy hầu hết tế bào thay đổi sang hình cong (chữ C), hình vòng (donut) và hình cầu (coccoid) trong môi trường có xử lý với tinh dầu (**Hình 3.7 B**) và citronenlol (**Hình 3.7 C**), cấu trúc bề mặt màng ngoài của tế bào trở nên gồ ghề và biến dạng bất thường. Tại nồng độ MBC, tinh dầu (0,63 mg/mL) và citronellol (0,16 mg/mL) đã gây ra tỉ lệ biến đổi hình thái tế bào *H. pylori* tăng đáng kể với tỷ lệ phần trăm tế bào chuyển sang dạng coccoid

lần lượt là 94,63 và 96,69%. Ảnh SEM cho thấy trong môi trường có xử lý tinh dầu (**Hình 3.8B**) và citronenlol (**Hình 3.8C**) hầu hết các tế bào *H. pylori* đều ở dạng coccoid, với bề mặt màng ngoài bị gồ ghề bất thường và xuất hiện nhiều mảnh vỡ của các tế bào đã bị ly giải hoàn toàn.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của tinh dầu quả bời lời chanh và citronellol ở nồng độ ức chế tối thiểu MIC lên hình thái tế bào *H. pylori* ATCC 43504. A) Đối chứng âm, B) Tinh dầu, C) Citronellol. Ảnh SEM 10.000x, bar 5 µm (trái) và 20.000x, bar 2 µm (phải).

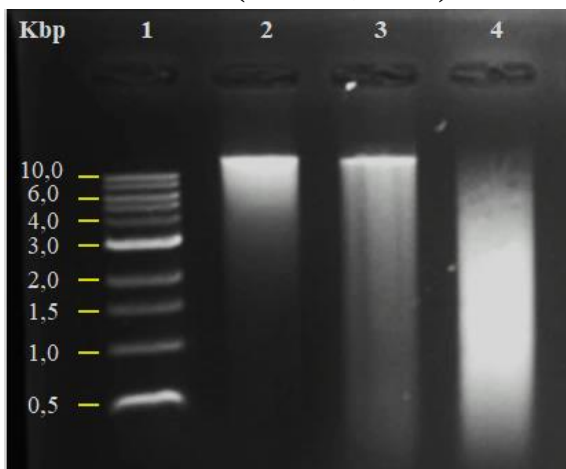


Hình 3.8. Ảnh hưởng của tinh dầu quả bời lời chanh và citronellol ở MBC lên hình thái *H. pylori*. A) Đối chứng âm, B) Tinh dầu, C) Citronellol. SEM 10.000x, bar 5 µm (trái) và 20.000x, bar 2 µm (phải).

3.3.6. Tác động lên tính toàn vẹn DNA của *H. pylori*

Ở ống đối chứng âm, *H. pylori* được nuôi trong môi trường BB chứa 2,5% DMSO cho kết quả băng DNA rõ ràng (**Hình 3.9**, lane 2). Khi *H. pylori* được xử lý với tinh dầu ở nồng độ MBC (0,63 mg/mL), băng DNA vẫn còn một vạch rõ ràng, tuy nhiên có sự xuất hiện các dải mờ (smear) DNA khối lượng phân tử thấp bên dưới, chứng tỏ rằng DNA đã bị bẻ gãy một phần (**Hình 3.9**, lane 3). *H. pylori* được xử lý với citronellol ở nồng độ MBC (0,16 mg/mL) không còn vạch DNA nguyên vẹn, dải mờ (smear)

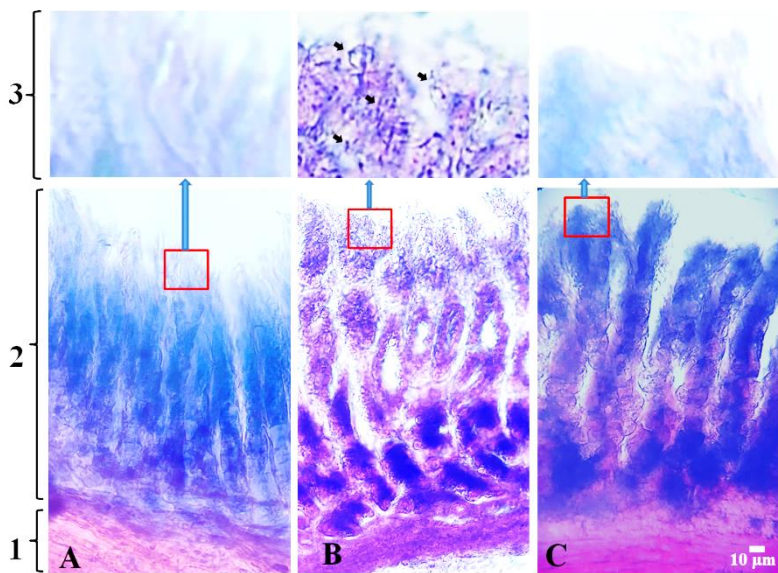
DNA khối lượng phân tử thấp tập trung bên dưới với mật độ cao, cho thấy DNA đã bị phân mảnh hoàn toàn (**Hình 3.9**, lane 4)



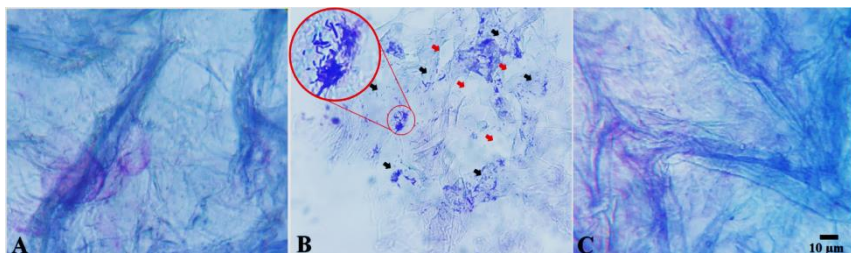
Hình 3.9. Kết quả điện di DNA trên gel agarose cho thấy tác động của tinh dầu quả bời lời chanh và citronellol ở nồng độ MBC lên tính toàn vẹn DNA của *H. pylori* ATCC 43504 sau 24 giờ xử lý. Lane 1: Thang DNA chuẩn; Lane 2: Đối chứng (DMSO 2,5%); Lane 3: Tinh dầu 0,63 mg/mL và Lane 4: Citronellol 0,16 mg/mL.

3.3.7. Tác động của tinh dầu quả bời lời chanh (*L. cubeba*) lên khả năng cố định của *H. pylori* ở niêm mạc dạ dày chuột

Ở nhóm chuột bị nhiễm *H. pylori* và không được điều trị bằng tinh dầu (chỉ uống 300 μ L DMSO 0,6%), *H. pylori* được tìm thấy trong lớp biểu mô của niêm mạc (**Hình 3.10 B**). Các tế bào *H. pylori* tồn tại riêng lẻ hoặc có xu hướng kết tụ thành đám biofilm cố định ở màng tế bào và gây tổn thương, làm phá vỡ màng tế bào biểu mô dạ dày (**Hình 3.11 B**). Ở nhóm chuột nhiễm *H. pylori* được điều trị bằng 300 μ L dung dịch tinh dầu 0,3% (trong DMSO 0,6%) qua đường uống không quan sát thấy *H. pylori* trong lớp niêm mạc của mô dạ dày ở 5 cá thể chuột thử nghiệm (**Hình 3.10 C**). Bề mặt lớp biểu mô cho thấy màng tế bào vẫn còn nguyên vẹn (**Hình 3.11 C**) như ở biểu mô của nhóm chuột không nhiễm *H. pylori* (**Hình 3.11 A**).



Hình 3.10. Tiêu bản lát cắt ngang mô dạ dày chuột. A) nhóm không bị nhiễm *H. pylori*. B) nhóm bị nhiễm *H. pylori* và không được điều trị với tinh dầu. C) nhóm bị nhiễm *H. pylori* và được điều trị với tinh dầu. 1) Lớp cơ niêm mạc, 2) Lớp biểu mô, và 3) Chi tiết một phần lớp biểu mô. Các mũi tên màu đen chỉ vị trí có *H. pylori*.



Hình 3.11. Tiêu bản lớp bề mặt biểu mô dạ dày chuột. A) nhóm không bị nhiễm *H. pylori*. B) nhóm bị nhiễm *H. pylori* và không được điều trị với tinh dầu. C) nhóm bị nhiễm *H. pylori* và được điều trị với tinh dầu. Các mũi tên màu đen chỉ vị trí có *H. pylori*, các mũi tên màu đỏ chỉ vị trí màng tế bào biểu mô dạ dày bị thủng lỗ.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Qua sàng lọc hoạt tính kháng *H. pylori* của 25 tinh dầu từ 24 loài cây thuốc dân gian Việt Nam, luận án đã xác định được tinh dầu quả bởi lời chanh (*L. cubeba*) có hoạt tính kháng *H. pylori* mạnh nhất. Tinh dầu quả bởi lời chanh đã được xác định thành phần hóa học, được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn lên các chủng *H. pylori* kháng thuốc và các tác động sinh học lên chủng *H. pylori* ATCC 43504. Từ các kết quả nghiên cứu, luận án thu được các kết luận sau:

❖ Tinh dầu quả bởi lời chanh (*L. cubeba*) có hoạt tính kháng khuẩn mạnh lên chủng *H. pylori* ATCC 43504 và các chủng *H. pylori* kháng thuốc với giá trị MIC = 0,08 mg/mL và MBC = 0,63 mg/mL.

❖ Tinh dầu quả bởi lời chanh có hoạt tính kháng khuẩn giống nhau lên chủng *H. pylori* ATCC 43504 và các chủng *H. pylori* kháng thuốc khi được xử lý ở pha lỏng hoặc pha hơi.

❖ Citronellol (MIC = 0,04 mg/mL, MBC = 0,16 mg/mL) có tác động kháng *H. pylori* ATCC 43504 mạnh hơn tinh dầu quả bởi lời chanh; citral (MIC = 0,08 mg/mL, MBC = 0,31 mg/mL) có tác động kháng *H. pylori* ATCC 43504 tương tự tinh dầu; citronellal, linalool, 1,8-cineole (MIC = 0,31, MBC = 0,63 mg/mL) và limonene (MIC = 0,31, MBC = 1,25 mg/mL) có tác động kháng *H. pylori* ATCC 43504 yếu hơn tinh dầu.

❖ Tinh dầu quả bởi lời chanh ức chế mạnh hoạt tính urease và sự thành lập biofilm của *H. pylori* ATCC 43504; có tác động mạnh làm tăng tính thấm, gây biến đổi hình thái, phá vỡ cấu trúc bề mặt màng ngoài và gây phân mảnh DNA của tế bào *H. pylori* ATCC 43504; và ức chế hoàn toàn sự cố định của *H. pylori* ATCC 43504 lên niêm mạc dạ dày chuột thí nghiệm.

❖ Citral có tác động ức chế hoạt tính urease và sự thành lập biofilm của *H. pylori* ATCC 43504 tương tự như tinh dầu quả bởi lời chanh.

❖ Citronellol có tác động gây biến đổi hình thái và cấu trúc bề mặt màng ngoài tương tự tinh dầu quả bời lời chanh, nhưng có tác động phá vỡ tính toàn vẹn của màng và gây phân mảnh DNA của tế bào *H. pylori* ATCC 43504 mạnh hơn tinh dầu quả bời lời chanh.

❖ Limonene, citronellal, linalool và 1,8-cineole có tác động phá vỡ tính toàn vẹn của màng tế bào *H. pylori* mạnh hơn tinh dầu, nhưng có tác động ức chế hoạt tính urease, ức chế sự thành lập biofilm và tác động làm tăng tính thấm của màng tế bào *H. pylori* yếu hơn tinh dầu quả bời lời chanh.

4.2. Kiến nghị

Luận án có một số kiến nghị về các hướng nghiên cứu tiếp theo như sau:

❖ Đánh giá tác động của tinh dầu và các hợp chất có trong tinh dầu lên sự biểu hiện của các gene liên quan đến sự sinh trưởng, di chuyển, bám dính và các độc tố của *H. pylori*.

❖ Đánh giá sự tác động hiệp lực giữa tinh dầu quả bời lời chanh và các kháng sinh lên *H. pylori* để làm cơ sở cho việc sử dụng kết hợp tinh dầu và kháng sinh trong phòng ngừa và điều trị sự nhiễm *H. pylori*.

❖ Đánh giá độc tính bán trường diễn của tinh dầu trên động vật thí nghiệm để cung cấp cơ sở về tính an toàn của việc sử dụng tinh dầu quả bời lời chanh trong phòng và điều trị sự nhiễm *H. pylori* ở người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cesare Montecucco, Rino Rappuoli (2001). Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(6), 457-466.
2. Emiko Rimbara et.al. (2011). Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections, *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 8(2), 79-88.
3. Tran Thanh Binh et.al. (2013). The incidence of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam, *Journal of clinical gastroenterology*, 47(3), 233-238.
4. Camelia Quek et.al. (2016). Antimicrobial susceptibility and clarithromycin resistance patterns of *Helicobacter pylori* clinical isolates in Vietnam, *F1000Research*, 5.
5. Ilya Raskin et.al. (2002). Plants and human health in the twenty-first century, *Trends in Biotechnology*, 20(12), 522-531.
6. Tomoyuki Ohno et.al. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*, *Helicobacter*, 8(3), 207-215.
7. María Ruiz-Rico et.al. (2020). In vitro antimicrobial activity of immobilised essential oil components against *Helicobacter pylori*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 1-9.
8. Võ Văn Chi (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam (tập 1-2)*, NXB Y học, Hà Nội.
9. Đỗ Tất Lợi (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội.
10. Yao Liu et.al. (2024). *Litsea cubeba* essential oil: Extraction, chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties, and applications in the food industry, *Journal of Food Science*.
11. Hongwu Wang, Yanqing Liu (2010). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Litsea cubeba*, *Chemistry & biodiversity*, 7(1), 229-235.
12. Robin Warren, Barry Marshall (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *The lancet*, 321(8336), 1273-1275.
13. Stewart Goodwin et.al. (1985). Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa, *Journal of medical microbiology*, 19(2), 257-267.

14. Stewart Goodwin et.al. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 397-405.
15. Jaehoon Cho et.al. (2021). *Helicobacter pylori* infection, *Gastroenterology Clinics*, 50(2), 261-282.
16. Carolina Negrei, Daniel Boda (2014). The Mechanisms of action and resistance to fluoroquinolone in *Helicobacter pylori* Infection, *Roesler. Trends in Helicobacter pylori Infection BM editor. IntechOpen*, 349.
17. Duane Smoot (1997). How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms, *Gastroenterology*, 113(6), S31-S34.
18. Lydia Wroblewski et.al. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk, *Clinical microbiology reviews*, 23(4), 713-739.
19. Hyelnaya Cletus Sharndama, Ifeanyi Elibe Mba (2022). *Helicobacter pylori*: An up-to-date overview on the virulence and pathogenesis mechanisms, *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-18.
20. Robert Wilson Frenck, John Clemens (2003). *Helicobacter* in the developing world, *Microbes and infection*, 5(8), 705-713.
21. Vincenzo De Francesco et.al. (2010). Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic, *J Gastrointestin Liver Dis*, 19(4), 409-414.
22. Thanh Hung Tran et.al. (2023). Effects of plant essential oils and their constituents on *Helicobacter pylori*: A Review, *Plant Science Today*, 10(2), 334-344.
23. Tai-Ti Liu, Tsung-Shi Yang (2012). Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems, *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 68-75.
24. Tsung-Shi Yang et.al. (2013). Antimicrobial activity of the essential oil of *Litsea cubeba* on cariogenic bacteria, *Journal of Essential Oil Research*, 25(2), 120-128.
25. Wei Hu et.al. (2019). Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Industrial Crops and Products*, 130, 34-41.
26. Kaiyuan Hao et.al. (2021). Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* L. essential oil against *Acinetobacter baumannii*, *Natural Product Communications*, 16(3), 1934578X21999146.