

Production of essential oils and sugar-rich hydrolysate from betel leaves (*Piper betle*)**Truc T. T. Tran¹, Anh T. V. Nguyen¹, Dong N. T. Le², Vinh D. H. Nguyen¹, & Ly T. P. Trinh^{1,2*}**¹Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam²Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam**ARTICLE INFO****Research Paper**

Received: May 04, 2023

Revised: July 21, 2023

Accepted: August 02, 2023

Keywords

Antibacterial capacity

Antioxidant activity

Betel leaves

Chemical compositions

Essential oils

***Corresponding author**

Trinh Thi Phi Ly

Email: phily@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The study was carried out to fully utilize betel leaves for the extraction of essential oils and production of sugar-rich hydrolysates from the betel leaves residues. Essential oils in the betel leaves were extracted by hydrodistillation and the betel leaves residues were enzymatically hydrolyzed to obtain sugar-rich hydrolysates. Antioxidant and antibacterial activity of the essential oils and the hydrolysates were investigated. Chemical composition analysis of the betel leaves showed that they contained 2.23% reducing sugars, 21.10% polysaccharides, 68.01 mg/g phenolics, 6.17 mg/g flavonoids, 12.05% ash, and 1.63% tannins. Betel essential oils content was 3.14%, with the main components being eugenol (50.37%), γ -muurolene (9.65%), and α -copaene (8.22%). Betel essential oils exhibited antioxidant activity with the IC_{50} of 0.13 mg/mL and antibacterial capacity against three strains of bacteria, including *Escherichia coli*, *Samonella* sp. and *Bacillus cereus*. The enzymatic hydrolysis of betel leaves residues using Ultraflo Max with a ratio of enzyme to substrate of 5% for 96 h produced the highest amount of reducing sugars of 10.66 g/L containing 48.31% glucose. The results suggest that betel leaves residues hydrolysate can be used as carbon sources for fermentation processes to produce value-added commodities in further investigation.

Cited as: Tran, T. T. T., Nguyen, A. T. V., Le, D. N. T., Nguyen, V. D. H., & Trinh, L. T. P. (2024). Production of essential oils and sugar-rich hydrolysate from betel leaves (*Piper betle*). *The Journal of Agriculture and Development* 23(1), 64-75.

Nghiên cứu thu nhận tinh dầu và dịch đường từ lá Trầu (*Piper betle*)

Trần Thị Thanh Trúc¹, Nguyễn Thị Vân Anh¹, Lê Nguyễn Thanh Đông²,
Nguyễn Dương Hoàng Vinh¹ & Trịnh Thị Phi Ly^{1,2*}

¹Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 04/05/2023

Ngày chỉnh sửa: 21/07/2023

Ngày chấp nhận: 02/08/2023

Từ khóa

Kháng khuẩn

Kháng oxy hóa

Lá Trầu

Thành phần hóa học

Tinh dầu

*Tác giả liên hệ

Trịnh Thị Phi Ly

Email: phily@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành để thu nhận tinh dầu lá Trầu và dịch thủy phân giàu đường từ bã lá Trầu, nhằm tận dụng triệt để nguồn nguyên liệu. Tinh dầu lá Trầu được chiết xuất bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước, bã lá Trầu còn lại được thủy phân bằng enzyme để thu nhận dịch đường. Kết quả phân tích thành phần hóa học cho thấy lá Trầu chứa 2,23% đường khử tự do; 21,10% polysaccharide; 68,01 mg/g phenolic tổng số; 6,17 mg/g flavonoid tổng số; 12,05% tro và 1,63% tannin. Hàm lượng tinh dầu trong lá Trầu đạt 3,14% với các thành phần chính gồm eugenol (50,37%), γ -muurolene (9,65%) và α -copaene (8,22%). Tinh dầu lá Trầu thể hiện hoạt tính chống oxy hóa với $IC_{50} = 0,13$ mg/mL. Tinh dầu lá Trầu có tiềm năng sử dụng như chất kháng khuẩn với khả năng ức chế *Escherichia coli*, *Samonella* sp. và *Bacillus cereus*. Hàm lượng đường khử cao nhất đạt 10,66 g/L trong điều kiện thủy phân bã lá Trầu bằng Ultraflo Max với tỉ lệ enzyme/cơ chất là 5% trong 96 giờ, trong đó glucose chiếm 48,31%. Kết quả cho thấy dịch thủy phân bã lá Trầu có thể là nguồn cung cấp carbon cho các quá trình lên men nhằm tạo ra những sản phẩm có giá trị.

1. Đặt Vấn Đề

Cây Trầu (*Piper betle*) là một cây thuốc truyền thống được phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới; trong đó lá Trầu là bộ phận được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi nhất. Trong y học cổ truyền, lá Trầu được sử dụng làm nước súc miệng ở Ấn Độ và Thái Lan, điều trị các vấn đề về răng miệng, đau đầu, viêm khớp ở Malaysia, nước ép lá Trầu được dùng để điều trị các bệnh về da ở Sri Lanka.

Ngoài ra, lá Trầu còn được sử dụng làm thuốc ho, thuốc bổ hoặc chất làm se (Joeseof & ctv., 1996; Arambewela & ctv., 2010; Chowdhury & ctv., 2020). Các ứng dụng của lá Trầu có liên quan đến đặc tính kháng khuẩn và kháng nấm của chúng. Tinh dầu và chiết xuất lá Trầu có khả năng ức chế sự phát triển của vi nhiều loại vi khuẩn Gram âm như *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella*

pneumonia; Gram dương như *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter faecalis*; cũng như các loài nấm, bao gồm cả những loại nấm kháng đa thuốc và gây ra các bệnh nghiêm trọng như *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* (Nayaka & ctv., 2021). Thành phần hóa học của tinh dầu lá Trầu rất đa dạng tùy thuộc vào nguồn gốc, tuổi cây và thời gian thu hoạch. Kết quả phân tích thành phần tinh dầu lá Trầu Ấn Độ chứa chủ yếu nhóm phenylpropanoid như acetyl eugenol, eugenol, chavicol và safrole. Trong khi đó, tinh dầu lá Trầu từ các nghiên cứu khác chứa các hợp chất phổ biến như estragole, linalool, α -copaene, anethole, and caryophyllene α -terpinene, 1,8-cineole, β -caryophyllene, α -humulene, allyl pyrocatechol, allylcatechol, methyl eugenol, estragol (methyl chavicol), chavibetol, chavibetol acetate, safrol, 4-allyl-2-methoxy-phenolacetate và 3-allyl-6-methoxyphenol (Madhumita & ctv., 2019; Salehi & ctv., 2019). Ngoài tinh dầu, lá Trầu còn chứa đa dạng các thành phần khác như steroids, tannins, proteins, amino acids, flavonoids, terpenoids, saponin và carbohydrates. Lá Trầu được xem là nguồn thảo dược phong phú và tiềm năng trong ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm. Tuy nhiên các nghiên cứu trước đây chỉ tập trung vào việc khai thác tinh dầu và các hợp chất thứ cấp từ chiết xuất lá Trầu trong khi đó một lượng lớn bã lá Trầu còn lại sau các quá trình chiết xuất thải ra môi trường gây những tác động tiêu cực. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm sử dụng triệt để nguồn lá Trầu để thu nhận tinh dầu và dịch thủy phân giàu đường từ bã lá Trầu có tiềm năng phát triển sản phẩm siro lá Trầu cũng như là nguồn carbon cho các quá trình lên men. Nghiên cứu còn cung cấp thông tin về thành phần hóa

học của lá Trầu địa phương cũng như đề xuất một hướng thu nhận các nhóm hợp chất sơ cấp từ lá Trầu góp phần mở rộng hướng ứng dụng và hạn chế ô nhiễm môi trường.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Lá Trầu được thu mua tại chợ Bà Điểm, huyện Hóc Môn, Thành phố Hồ Chí Minh. Lá tươi trưởng thành, không bị sâu bệnh, nấm mốc, rửa sạch, để ráo nước. Lá tươi được xay nhuyễn trước khi chiết tinh dầu. Sau khi chiết tinh dầu, bã lá Trầu được sấy cho đến khi độ ẩm dưới 13%, xay nhuyễn, rây qua rây có đường kính 1 mm và xác định độ ẩm trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Các loại enzyme như Celluclast (700 EGU/g), Ultraflo Max (250 FXU-S/g) và Viscozyme (100 FBG/g) được cung cấp bởi Novozyme. Các chất chuẩn bao gồm glucose và xylose của Sigma-Aldrich. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3,5- acid dinitrosalicylic (DNS), Folin-Ciocalteu, acid gallic, và acid ascorbic của Merck (New Jersey, Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định lượng polyphenol tổng số

Lá Trầu được sấy khô ở 50°C, xay nhuyễn và xác định độ ẩm trước khi tiến hành phân tích các thành phần hóa học. Bọt lá Trầu khô được chiết kiệt với ethanol 70% dưới sự hỗ trợ của sóng siêu âm với công suất 500 W. Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định dựa trên phản ứng oxy hóa - khử giữa các hợp chất polyphenol với thuốc thử Folin - Ciocalteu (Singleton & ctv., 1999). Hút 0,1 mL dịch chiết lá Trầu cho vào ống nghiệm, thêm 0,1 mL thuốc thử Folin - Ciocalteu, để yên trong 5 phút, thêm vào 0,3 mL dung dịch Na_2CO_3 20% lắc đều, sau đó thêm 4,5 mL nước cất. Để yên

trong 60 phút rồi đem đo màu ở bước sóng 735 nm. Gallic acid được sử dụng làm chất chuẩn.

2.2.2. Định lượng flavonoid tổng số

Hàm lượng flavonoid được xác định thông qua phản ứng màu với các muối kim loại. Độ hấp thụ của phức hợp này được ghi nhận bằng thiết bị quang phổ hấp thụ phân tử thông qua phản ứng tạo màu với hỗn hợp $\text{CH}_3\text{COOK} - \text{AlCl}_3$ (Shraim & ctv., 2021). Hút 0,5 mL dịch chiết lá Trầu cho vào ống nghiệm, thêm 1,5 mL ethanol 96%, để yên trong 5 phút, thêm 0,1 mL AlCl_3 10% lắc đều để yên trong 6 phút. Tiếp tục thêm 0,1 mL CH_3COOK 1 M và 2,8 mL nước cất. Để yên trong 15 phút, đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở bước sóng 430 nm. Quercetin được sử dụng làm chất chuẩn.

2.2.3. Định lượng đường khử tự do

Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử thông qua phản ứng màu với thuốc thử 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959). Thuốc thử DNS được chuẩn bị bằng cách hòa tan hoàn toàn 1 g DNS cùng với 30 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ và 0,5 g Na_2SO_3 trong 80 mL NaOH 0,5 N ở 50°C trong bình định mức 100 mL. Sau đó, dung dịch được để nguội ở nhiệt độ phòng, tiếp tục thêm vào 0,5 g phenol và định mức đến vạch. Hút 1 mL mẫu vào ống nghiệm, thêm 1 mL DNS. Hỗn hợp được đun ở 100°C trong 5 phút và làm lạnh nhanh dưới vòi nước. Sau khi nguội hoàn toàn thêm 3 mL nước cất, lắc đều và đo độ hấp thụ ở bước sóng 505 nm. D-Glucose được sử dụng làm chất chuẩn.

2.2.4. Định lượng tannin

Hàm lượng tannin được xác định theo phương pháp chuẩn độ của Lowenthal, với thuốc thử indigo carmine (AOAC, 1970). Chuẩn độ cả mẫu thử và mẫu trắng bằng KMnO_4 0,1 N cho đến khi dung dịch chuyển từ màu xanh lam sang

màu xanh lục và khi chuyển sang màu vàng rơm thì kết thúc.

2.2.5. Định lượng polysaccharide

Lá Trầu sau khi loại bỏ các chất trích ly (extractives) được thủy phân hoàn toàn bằng acid theo qui trình của Sluiter & ctv. (2008). Hàm lượng polysaccharide được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử thông qua xác định tổng đường khử trong dịch thủy phân acid với thuốc thử DNS.

2.2.6. Chiết xuất và phân tích thành phần tinh dầu lá Trầu

Tinh dầu lá Trầu được chiết xuất bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có hỗ trợ của sóng siêu âm (30 phút) với tỉ lệ nguyên liệu tươi: nước là 1:4 (w/v) trong 4 giờ (Nguyen & ctv., 2016). Sau khi quá trình chưng cất kết thúc, thu dịch trong ống hứng vào bình chiết. Thêm vào bình chiết 50 mL n-hexan, lắc đều, để lắng, dịch trong bình chiết sẽ tách thành 2 lớp, thu lớp phía trên vào bình cầu, lớp phía dưới tiếp tục lắc lần 2 bằng 50 mL n-hexan, thu phần phía trên gộp vào bình chiết. Tinh dầu được thu nhận bằng cách cô quay chân không để loại bỏ dung môi.

Tinh dầu lá Trầu được pha loãng với n-hexan và lọc qua màng PTFE 0,2 μm . Thành phần hóa học của tinh dầu lá Trầu được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS Agilent 6890N/5973). Cột mao quản DB-5 MS (J&W) dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm với pha tĩnh dày 0,25 μm . Khí mang là heli với tốc độ dòng 1,0 mL/phút. Nhiệt độ buồng tiêm mẫu là 220°C và nhiệt độ đầu dò MSD là 280°C . Chương trình nhiệt độ phân tích trên sắc ký như sau: nhiệt độ ban đầu 40°C , giữ trong 10 phút; tăng $4^\circ\text{C}/\text{phút}$ đến 200°C ; tăng $2^\circ\text{C}/\text{phút}$ đến 220°C . Thể tích mẫu tiêm 1 μL bằng kỹ thuật tiêm không chia dòng. Phổ khối lượng của các thành phần

trong tinh dầu được so sánh với phổ chuẩn lưu trữ trên thư viện NIST 14. Hàm lượng tương đối của các chất được tính toán dựa trên phần trăm diện tích peak.

2.2.7. Phương pháp thủy phân bã lá Trầu

Bã lá Trầu sau khi chiết xuất tinh dầu được lọc tách, sấy khô và thủy phân bằng ba loại enzyme khác nhau là Viscozyme (100 FBG/g), Celluclast (700 EGU/g) và Ultraflo Max (250 FXU-S/g). Sử dụng 2 g mẫu kết hợp với 50 ml dung dịch đệm sodium citrate 0,01 M ở pH 5,0; sau đó thêm enzyme vào với tỉ lệ enzyme:cơ chất là 5%. Quy trình thủy phân thực hiện ở 50°C trong máy lắc ổn nhiệt. Quá trình thủy phân được theo dõi bằng cách đo hàm lượng đường khử giải phóng ra ở các thời điểm 0; 24; 48; 72; 96; 120 giờ (Gama & ctv., 2015; Andlar & ctv., 2016). Sau khi xác định được enzyme hiệu quả nhất, tiến hành khảo sát liều lượng enzyme với tỉ lệ enzyme:cơ chất từ 1 - 5%.

Các mẫu dịch thủy phân được ly tâm 4.000 vòng trong 5 phút bằng máy ly tâm Z206A (Hermle, Đức). Thu lấy phần dịch nổi, tiến hành phản ứng màu với thuốc thử DNS và định lượng đường khử tổng số bằng hệ thống quang phổ UV-Vis với chất chuẩn là glucose (50 - 300 mg/L). Thành phần đường đơn như glucose và xylose trong dịch thủy phân bã lá Trầu được xác định bằng kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp (Agilent 1200 Infinity II, Hoa Kỳ). Cột Rezex RPM – Monosaccharide Pb+2 (8%) có kích thước 100 x 7,8 mm được ổn định ở 85°C. Đầu dò chiết suất (RI) được gia nhiệt ở 35°C. Pha động là nước với tốc độ dòng 0,2 mL/phút.

2.2.8. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa được khảo sát thông qua khả năng bắt giữ các gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Blois, 1958; Bondet &

ctv., 1997). Các gốc tự do DPPH tự do có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 517 nm và có màu tím. Khi gốc tự do DPPH bắt cặp với một electron từ chất chống oxy hóa thì dung dịch sẽ chuyển qua màu vàng. Tiến hành phản ứng bằng hút 0,5 mL mẫu thử vào các ống nghiệm có chứa sẵn 3 mL ethanol 96%, tiếp tục thêm vào 1 mL DPPH 0,5 mM pha trong methanol và lắc đều. Hỗn hợp được để yên trong tối 30 phút và đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Thực hiện song song một mẫu đối chứng âm bằng cách thay mẫu thử bằng nước cất. Chất đối chiếu là ascorbic acid được pha trong nước cất ở nồng độ 10 - 50 mg/L.

2.2.9. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu lá Trầu và dịch thủy phân bã lá Trầu được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa giấy của Kirby - Bauer (Bauer & ctv., 1959) thực hiện khảo sát trên ba chủng vi khuẩn là *E. coli*, *Salmonella* sp. và *B. cereus*. Đĩa giấy vô trùng (đường kính 5 mm) được thấm qua tinh dầu sau đó đặt lên bề mặt thạch có chứa vi khuẩn, đối chứng âm là đĩa giấy không chứa tinh dầu và đối chứng dương là đĩa giấy chứa kháng sinh tetracycline 0,2%.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Thành phần hóa học của lá Trầu

Thành phần hóa học của lá Trầu thay đổi tùy thuộc vào nguồn gốc, tuổi cây, điều kiện khí hậu thổ nhưỡng và thời gian thu hoạch. Kết quả định lượng một số thành phần hóa học của lá Trầu thu thập ở Hóc Môn thể hiện trong Bảng 1. Polyphenol và flavonoid là những hợp chất quan trọng đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học như khả năng kháng nấm, kháng khuẩn và kháng virus (Montenegro-Landívar & ctv., 2021). Một số nghiên cứu trước đây cho thấy flavonoid có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, bên cạnh đó còn có khả năng ức chế quá trình hình

thành vách tế bào nấm, polyphenol ngăn cản tổng hợp màng tế bào vi sinh vật (Makhuvele & ctv., 2020). Kết quả cho thấy lá Trầu chứa hàm lượng polyphenol cao 68,01 mg/g và 6,17 mg/g flavonoid có tiềm năng sử dụng làm chất chống oxy hóa, kháng nấm và kháng khuẩn (Glevitzky & ctv., 2019). Hàm lượng tinh dầu lá Trầu tươi đạt 0,47% (w/w), tương đương 3,14% tính trên nguyên liệu khô. Kết quả này cao hơn so với 0,18% hàm lượng tinh dầu lá Trầu tươi thu thập ở Ấn Độ khi chiết xuất bằng phương pháp chưng cất hơi nước (Madhumita & ctv., 2019). Theo nghiên cứu của Huynh & ctv. (2015), hàm lượng tinh dầu lá Trầu Hóc Môn thay đổi theo thời điểm thu hoạch trong năm dao động trong khoảng 0,26 - 0,33% khi chưng cất có bổ sung muối vào nước, trong đó hàm lượng tinh dầu lá Trầu đạt cao nhất 0,32 - 0,33% vào tháng 8 đến tháng 12. Lá Trầu trong nghiên cứu này được thu hái vào tháng 8 là thời điểm phù hợp để thu nhận

tinh dầu. Tinh dầu có màu vàng, mùi đặc trưng, nóng, vị cay, tỷ trọng 0,8514 g/mL, nhẹ hơn nước. Tannin, là các hợp chất polyphenol có vị đắng hiện diện 1,63% trong lá Trầu, có khả năng gây ngán ăn đối với một số côn trùng gây hại (Sharma & ctv., 2021). Ngoài ra, lá Trầu còn chứa hàm lượng cao carbohydrate với 2,23% đường khử tự do và 21,10% polysaccharide. Các nghiên cứu hiện nay hầu như tập trung vào chiết xuất tinh dầu lá Trầu mà chưa khai thác các thành phần có tiềm năng khác. Kết quả phân tích thành phần hóa học cho thấy các hợp chất chiết xuất từ lá Trầu có thể sử dụng làm chất kháng oxy hóa, kháng nấm, kháng khuẩn và là nguồn cung cấp carbon cho các mục đích khác (Glevitzky & ctv., 2019). Sử dụng triệt để các thành phần trong lá Trầu không chỉ mang lại hiệu quả kinh tế mà còn giảm thiểu gánh nặng cho môi trường.

3.2. Thành phần hóa học của tinh dầu lá Trầu

Bảng 1. Kết quả định lượng các nhóm chất trong lá Trầu

Chỉ tiêu ¹	Đơn vị	Hàm lượng
Polyphenol	mg/g	68,01 ± 0,86
Tinh dầu	%	3,14 ± 0,02
Flavonoid	mg/g	6,17 ± 0,12
Đường khử tự do	%	2,23 ± 0,07
Polysaccharide	%	21,10 ± 0,10
Tannin	%	1,63 ± 0,03
Tro tổng số	%	12,05 ± 0,02

¹Kết quả được tính trên mẫu khô kiệt, thể hiện dưới dạng giá trị trung bình (± SEM) của ba lần lặp lại.

Kết quả phân tích thành phần hóa học tinh dầu lá Trầu ở Bảng 2 và Hình 1 cho thấy tinh dầu chứa 17 thành phần chính chủ yếu thuộc nhóm terpenoid và dẫn xuất phenol. Eugenol là thành phần chính của tinh dầu lá Trầu chiếm 50,37%. Eugenol là một hợp chất thơm được ứng dụng

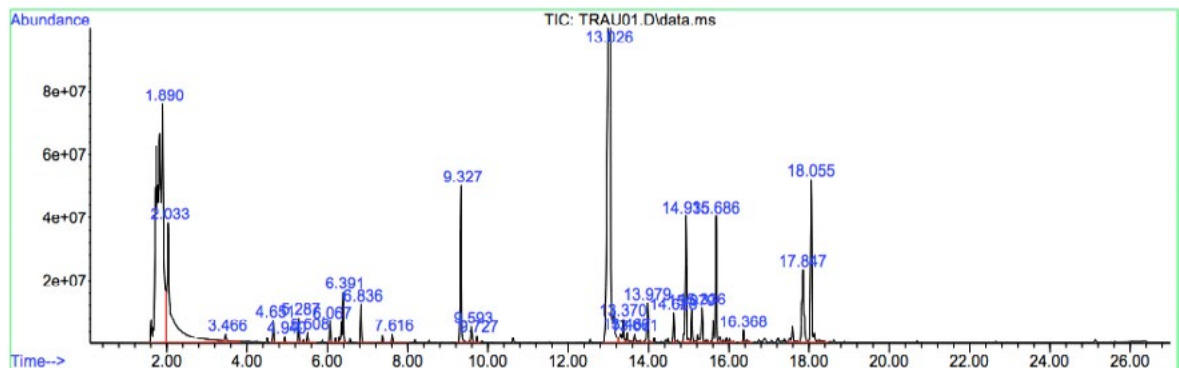
rộng rãi trong thực phẩm và hương liệu. Ngoài ra, eugenol còn có dược tính cao được xem như một chất kháng viêm, kháng oxy hóa, kháng khuẩn và giảm đau (Muruganandam, 2017). Kết quả tương tự cũng được công bố bởi Madhumita (2019) trong đó eugenol chiếm 46,02% thành phần tinh

dầu lá Trầu. Các hợp chất thuộc nhóm terpenoid chiếm hàm lượng cao trong tinh dầu lá Trầu bao gồm γ -muurolene, δ -cadinene, T.-cadinol có mùi thơm đặc trưng, thường được sử dụng trong nước hoa, dầu gội, mỹ phẩm và chất tẩy rửa (Lesage-Meessen & ctv., 2015). β -phellandrene chiếm 2,17% là thành phần kháng khuẩn chính trong tinh dầu cây họ Cam quýt (Okunowo & ctv., 2013). Caryophyllene được biết đến như chất bảo quản trong thực phẩm. Ngoài ra các hợp chất này còn có đặc tính kháng khuẩn, xua đuổi

côn trùng và ức chế sự phát triển của nấm da *in vitro* (Fidy & ctv., 2016). So sánh với các nghiên cứu của Nguyen & ctv. (2016), Arambewela & ctv. (2005) và Madhumita & ctv. (2019) cho thấy tinh dầu lá Trầu trong nghiên cứu này chứa các thành phần đặc trưng phổ biến của lá Trầu mặc dù khác biệt về hàm lượng các hợp chất. Các thành phần trong tinh dầu lá Trầu được báo cáo có hoạt tính sinh học và có tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực.

Bảng 2. Thành phần hóa học của tinh dầu lá Trầu

STT	Thời gian (phút)	Thành phần	%	STT	Thời gian (phút)	Thành phần	%
1	5,29	β -Phellandrene	2,17	10	14,63	Humulene	1,81
2	6,06	α -Terpinene	1,06	11	14,93	γ -Muurolene	9,65
3	6,39	Eucalyptol	3,09	12	15,68	δ -Cadinene	6,48
4	6,84	γ -Terpinene	2,08	13	16,37	α -Farnesene	0,73
5	9,59	α -Terpinolene	1,33	14	16,89	beta-Gurjunene	0,95
6	13,02	Eugenol	50,37	15	17,58	Cubenene	1,29
7	13,36	β -Elemene	2,41	16	17,84	tau-Cadinol	5,46
8	13,66	Tridecanal	0,67	17	18,05	α -Copaene	8,22
9	13,98	Caryophyllene	2,11	18			

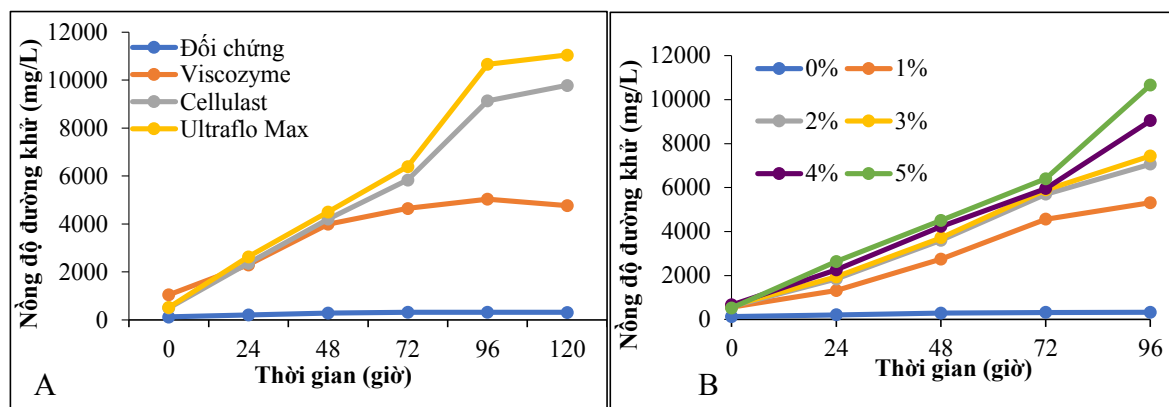


Hình 1. Sắc ký đồ GC-MS phân tích thành phần tinh dầu lá Trầu.

3.3. Kết quả thủy phân bã lá Trầu

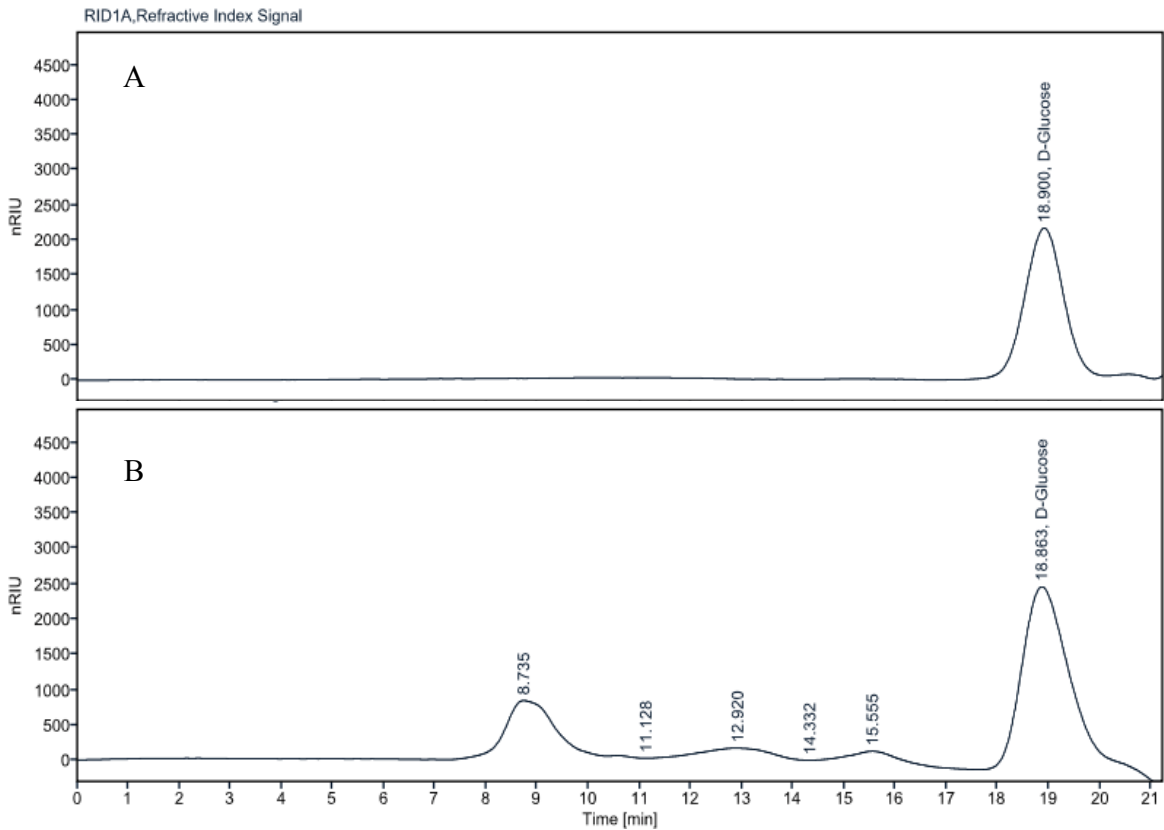
Bã lá Trầu sau khi chiết xuất tinh dầu được lọc tách, sấy khô và thủy phân bằng Viscozyme, Celluclast và Ultraflo Max trong 120 giờ với tỉ lệ enzyme:cơ chất là 5%. Đây là các loại enzyme thương mại phổ biến được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp. Ultraflo Max là hỗn hợp enzyme chứa beta-glucanase và arabinoxylanase; Viscozyme chứa thành phần chính là pectinase, ngoài ra còn có β -glucanase, hemicellulase và xylanase; trong khi Celluclast chỉ chứa cellulase. Kết quả thể hiện trong Hình 2 cho thấy hàm lượng đường khử tăng dần từ 0 giờ tới 120 giờ trừ nghiệm thức đối chứng (không bổ sung enzyme). Hàm lượng đường khử cao nhất khi sử dụng enzyme Ultraflo Max (11,04 g/L) sau 120 giờ thủy phân, vượt trội so với Celluclast và Viscozyme và cao gấp 34 lần so với nghiệm thức đối chứng (0,32 g/L). Hiệu quả thủy phân phụ thuộc vào thành phần nguyên liệu và enzyme sử dụng. Nghiên cứu cho thấy Ultraflo Max cho hiệu quả thủy phân bã lá Trầu cao hơn Celluclast và Viscozyme. Ultraflo Max là enzyme thủy phân hiệu quả nhiều loại nguyên liệu khác nhau như bã củ cải ngọt, bã bia, bã trái cây (Berlowska & ctv., 2015; Paz & ctv., 2019; Favaretto & ctv., 2023). Sử dụng enzyme để thủy phân phụ phẩm của các quá trình chế biến nông sản hoặc phụ

phẩm nông nghiệp đang thu hút nhiều nghiên cứu nhằm khai thác trực tiếp hoặc chuyển hóa nguồn nguyên liệu này thành sản phẩm có giá trị. Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng đường khử thu nhận được khi sử dụng Ultraflo Max sau 96 giờ (10,66 g/L) và 120 giờ (11,04 g/L) không có khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Do đó, enzyme Ultraflo Max được sử dụng thủy phân bã lá Trầu nhằm thu nhận dịch đường. Liều lượng enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình thủy phân. Hàm lượng đường khử tăng khi tăng lượng enzyme Ultraflo Max từ 1 - 5%. Kết quả Hình 2 cho thấy ở nghiệm thức bổ sung 1% enzyme cho hàm lượng đường khử thấp nhất (5,31 g/L) và cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 5% enzyme Ultraflo Max (10,66 g/L), trong khi đối chứng chỉ đạt 0,32 g/L sau 96 giờ thủy phân. Liều lượng Ultraflo Max 5% được xem là tỷ lệ tối ưu để thủy phân bã lá Trầu trong nghiên cứu này. Kết quả phân tích đường đơn (Hình 3) trong dịch thủy phân bã lá Trầu cho thấy glucose chiếm khoảng 48,31% trong dịch đường với nồng độ 5,15 g/L, các loại đường khác chưa được xác định trong nghiên cứu này. Glucose được xem là nguồn carbon phù hợp và tối ưu cho nhiều loại vi sinh vật, do đó chúng tôi định hướng sử dụng dịch thủy phân bã lá Trầu làm môi trường lên men trong nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Kết quả thủy phân bã lá Trầu.

A: Ảnh hưởng của loại enzyme; B: Ảnh hưởng của liều lượng enzyme Ultraflo Max.



Hình 3. Sắc ký đồ phân tích đường trong dịch thủy phân.

(A) chất chuẩn glucose; (B) dịch thủy phân.

3.4. Hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn

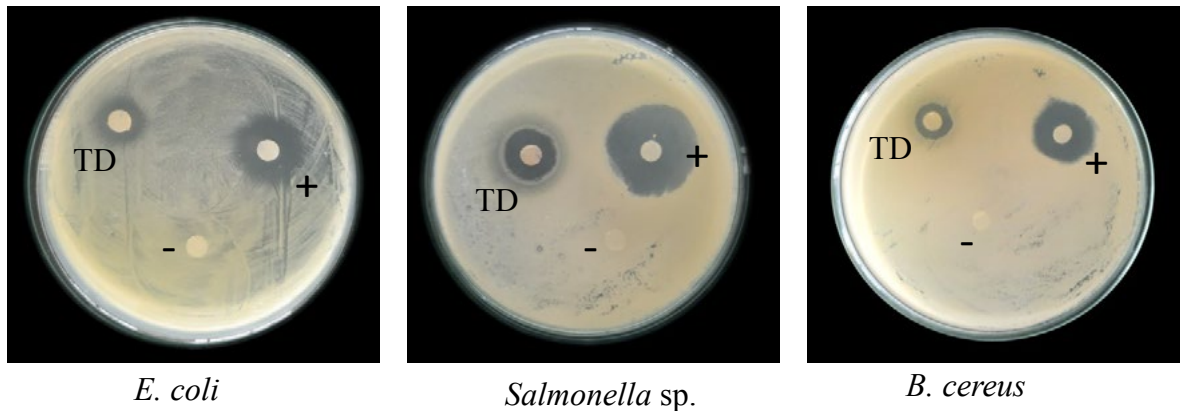
Khả năng chống oxy hóa của tinh dầu và dịch thủy phân bã lá Trầu được xác định bằng thử nghiệm bắt gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy tinh dầu có khả năng chống oxy hóa với $IC_{50} = 0,13$ mg/mL, thấp hơn so với chất đối chiếu acid ascorbic ($IC_{50} = 0,038$ mg/mL). Tuy nhiên, khả năng chống oxy hóa của tinh dầu lá Trầu cao hơn một số nguyên liệu khác như tinh dầu Thiên Niên Kiện (*Homalomena occulta*) với $IC_{50} = 58,05$ mg/mL hoặc tinh dầu Gừng (*Zingiber montanum*) với $IC_{50} = 0,545$ mg/mL (Tran & ctv., 2014; Trinh, 2023). Thành phần tinh dầu lá Trầu chứa 50,37% eugenol là một phenolic được chứng minh có hoạt tính chống oxy hóa và bắt

gốc tự do mạnh trong nhiều nghiên cứu (Salehi & ctv., 2019).

Tinh dầu lá Trầu thể hiện hoạt tính kháng với cả ba chủng vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* sp. và *B. cereus* (Hình 4). Trong đó, tinh dầu thể hiện khả năng ức chế *Salmonella* sp. mạnh nhất với đường kính vòng vô khuẩn đạt 8,33 mm và kháng *E. coli* yếu hơn với đường kính vòng vô khuẩn 7,67 mm. *B. cereus* kém nhạy với đường kính vòng vô khuẩn nhỏ nhất 6,33 mm. Tinh dầu lá Trầu được báo cáo có khả năng kháng nhiều chủng vi sinh vật gây bệnh bao gồm vi khuẩn Gram (-), (+), nấm men và nấm sợi như *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Aspergillus*

niger và *Fusarium oxysporum* (Nayaka & ctv., 2021). Eugenol trong tinh dầu lá Trầu được chứng minh là thành phần có khả năng bất hoạt các enzyme trên thành tế bào vi khuẩn và nấm, làm tăng tính thấm của màng tế bào dẫn đến sự rò rỉ các chất nội bào (Madhumita & ctv., 2019; Gulcin, 2021).

Trong khi đó, thành phần chủ yếu của dịch thủy phân bã lá Trầu là các loại đường khử, các polyphenol và flavonoid bị phân hủy trong quá trình chưng cất tinh dầu vì vậy dịch thủy phân bã Trầu gần như không có khả năng chống oxy hóa ($IC_{50} = 4,91 \text{ mg/mL}$) và không thể hiện hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn khảo sát.



Hình 4. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu lá Trầu.
(+) Tetracycline 0,2%; (-) Nước khử ion; (TD) Tinh dầu.

4. Kết Luận

Hàm lượng tinh dầu trong lá Trầu đạt 3,14%, tinh dầu chứa các thành phần chính như eugenol (50,37%), γ -muurolene (9,65%) và α -copaene (8,22%). Tinh dầu lá Trầu có hoạt tính chống oxy hóa với giá trị IC_{50} là 0,13 mg/mL, đồng thời thể hiện tính kháng với ba chủng vi khuẩn là *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* và *Bacillus cereus* với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 7,67 mm, 8,33 mm và 6,33 mm. Bã lá Trầu được thủy phân bằng Ultraflo Max với tỉ lệ enzyme:cơ chất là 5% trong 96 giờ thu được lượng đường khử cao nhất 10,66 g/L, trong đó glucose chiếm 48,31%.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Arambewela, L., Kumaratunga, K. G. A., & Dias, K. (2005). Studies on piper beetle of Sri Lanka. *Journal of The National Science Foundation of Sri Lanka* 33(2), 133-139. <https://doi.org/10.4038/jnsfr.v33i2.2343>.
- Arambewela, L. S., Arawawala, M. L., Withanage, D., & Kulathunga, S. (2010). Efficacy of betel cream on skin ailments. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 7(1). <https://doi.org/10.2202/1553-3840.1391>.
- Bauer, A. W., Perry, D. M., & Kirby, W. M. (1959). Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci: An analysis of technique and results. *AMA Archives of Internal Medicine* 104(2), 208-216. <https://doi.org/10.1001/archinte.1959.00270080034004>.
- Berlowska, J., Binczarski, M., Dudkiewicz, M., Kalinowska, H., Witonska, I. A., & Stanishevsky, A. V. (2015). A low-cost method for obtaining

- high-value bio-based propylene glycol from sugar beet pulp. *RSC Advances* 5(3), 2299-2304. <https://doi.org/10.1039/C4RA12839G>.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617), 1199-1200.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. L. W. T. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology* 30(6), 609-615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>.
- Chowdhury, U., & Baruah, P. K. (2020). Betelvine (Piper betle L.): A potential source for oral care. *Current Botany* 11, 87-92. <https://doi.org/10.25081/cb.2020.v11.6130>.
- Favaretto, D. P. C., Rempel, A., Lanzini, J. R., Silva, A. C. M., Lazzari, T., Barbizan, L. D., & Treichel, H. (2023). Fruit residues as biomass for bioethanol production using enzymatic hydrolysis as pretreatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39(6), 144. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03588-2>.
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., & Szumny, A. (2016). β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine* 5(10), 3007-3017. <https://doi.org/10.1002/cam4.816>.
- Glevitzky, I., Dumitrel, G. A., Glevitzky, M., Pasca, B., Otrisal, P., Bungau, S., & Popa, M. J. R. C. (2019). Statistical analysis of the relationship between antioxidant activity and the structure of flavonoid compounds. *Revista de Chimie* 70(9), 3103-3107. <https://doi.org/10.37358/RC.19.9.7497>.
- Gulçin, I. (2011). Antioxidant activity of eugenol: A structure-activity relationship study. *Journal of Medicinal Food* 14(9), 975-985. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0197>.
- Huynh, K. T., Tran, N. N. C., Ha, M. T., Nguyen, K. N., Do, V. H., Tran, T. N. T., Pham, T. A., & Chu, P. N. S. (2015). Essential oils and biological activity of *Piper betle* L. leaves. *Journal of Analytical Sciences* 20(3), 80-90.
- Joesoef, M. R., Sumampouw, H., Linnan, M., Schmid, S., Idajadi, A., & Louis, M. S. (1996). Douching and sexually transmitted diseases in pregnant women in Surabaya, Indonesia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 174(1), 115-119. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(96\)70382-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(96)70382-4).
- Lesage-Meessen, L., Bou, M., Sigoillot, J. C., Faulds, C. B., & Lomascolo, A. (2015). Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: A review of current use and potential application in white biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3375-3385. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6511-7>.
- Madhumita, M., Guha, P., & Nag, A. (2019). Extraction of betel leaves (*Piper betle* L.) essential oil and its bio-actives identification: Process optimization, GC-MS analysis and anti-microbial activity. *Industrial Crops and Products* 138, 111578. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111578>.
- Makhuvele, R., Naidu, K., Gbashi, S., Thipe, V. C., Adebo, O. A., & Njobeh, P. B. (2020). The use of plant extracts and their phytochemicals for control of toxigenic fungi and mycotoxins. *Heliyon* 6(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05291>.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Montenegro-Landívar, M. F., Tapia-Quirós, P., Vecino, X., Reig, M., Valderrama, C., Granados, M., Cortina, J. L., & Saurina, J. (2021). Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. *Science of The Total Environment* 801, 149719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149719>.
- Muruganandam, L., Krishna, A., Reddy, J., & Nirmala, G. S. (2017). Optimization studies on extraction of phytocomponents from betel leaves. *Resource-Efficient Technologies* 3(4), 385-393. <https://doi.org/10.1016/j.refit.2017.02.007>.
- Nayaka, N. M. D. M. W., Sasadara, M. M. V., Sanjaya, D. A., Yuda, P. E. S. K., Dewi, N. L. K. A. A.,

- Cahyaningsih, E., & Hartati, R. (2021). Piper betle (L): Recent review of antibacterial and antifungal properties, safety profiles, and commercial applications. *Molecules* 26(8), 2321. <https://doi.org/10.3390/molecules26082321>.
- Nguyen, T. C., Nguyen, T. N. C., Pham, K. N., Do, D. P., Duong, T. K, & Nguyen, T. T. T. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from leaves of *Piper betel* L. *Can Tho University Journal of Sciences* 45a, 28-32. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2016.508>.
- Okunowo, W. O., Oyedeji, O., Afolabi, L. O., & Matanmi, E. (2013). Essential oil of grape fruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. *American Journal of Plant Sciences* 4(7B), 1-9. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.47A2001>.
- Paz, A., Outeiriño, D., Guerra, N. P., & Domínguez, J. M. (2019). Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. *Bioresource Technology* 275, 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.082>.
- Pham, T. A. H. (2003). *Biochemical technique*. Ho Chi Minh City, Vietnam: National University of Ho Chi Minh City Publishing House.
- Pham, T. K., Nguyen, T. T, & Tran, V. T. (1998). *Lectures on medicinal plants II*. Ha Noi University of Pharmacy, Ha Noi, Vietnam.
- Pradhan, D., Suri, K. A., Pradhan, D. K., & Biswasroy, P. (2013). Golden heart of the nature: *Piper betle* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(6), 147-167.
- Salehi, B., Zakaria Z.A., Gyawali R., Ibrahim S.A., Rajkovic J., Shinwari Z.K., Khan T., Sharifi-Rad J., Ozleyen A., & Turkdonmez E. (2019). Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. *Molecules* 24(7), 1364. <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>.
- Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., Gat, Y., & Kumar, A. (2021). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: A critical review. *Toxin Reviews* 40(4), 432-444. <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1662813>.
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT* 150, 111932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. L. A. P. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure* 1617(1), 1-16.