

Evaluation of the antimicrobial efficacy of crude tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) extract against *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from dogs

Xuan N. T. Nguyen*, Hau T. H. Tran, & Yen T. H. Tran

Department of Infectious Diseases and Veterinary Public Health, Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: March 27, 2025

Revised: June 12, 2025

Accepted: July 03, 2025

Keywords

Antibiotic resistance

Antimicrobial activity

Bordetella bronchiseptica

Tea tree oil

*Corresponding author

Nguyen Ngoc Thanh Xuan

Email:

xuan.nguyenngocthanh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Tea tree oil (TTO) was extracted by the steam distillation method at 100°C for 100 min, and its antibacterial activity was tested against *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) strains isolated from dogs with respiratory symptoms. From 45 nasal and/or pharyngeal swabs, 10 *B. bronchiseptica* positive strains were identified in canine respiratory tract secretions using PCR. The results showed that these strains were multidrug-resistant to commonly used veterinary antibiotics, particularly amoxicillin (70%) and cephalosporins (80%). Tea tree oil appeared as a clear, pale yellow to colorless liquid with a slightly pungent odor and an extraction yield of approximately 2.6%. The inhibitory activity of TTO against *B. bronchiseptica* was demonstrated at concentrations ranging from 5 to 60 mg/mL, with inhibition zone diameters ranging from 7.33 to 23.33 mm as determined by the agar disk diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of TTO against *B. bronchiseptica*_{Bb3} and *B. bronchiseptica*_{Bb4} were 0.08 and 0.04 mg/mL, respectively, while the minimum bactericidal concentration (MBC) value for both strains was 0.156 mg/mL. The research findings suggest that tea tree oil may serve as a safe and effective alternative treatment method for canine respiratory disease caused by *B. bronchiseptica*.

Cited as: Nguyen, X. N. T., Tran, H. T. H., & Tran, Y. T. H. (2026). Evaluation of the antimicrobial efficacy of crude tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) extract against *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from dogs. *The Journal of Agriculture and Development* 25(4), 36-48.

Đánh giá khả năng kháng khuẩn của tinh dầu trà trà thô (*Melaleuca alternifolia*) trên vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica* được phân lập trên chó

Nguyễn Ngọc Thanh Xuân*, Trần Thị Hải Hậu & Trần Thị Hải Yến
Bộ Môn Bệnh Truyền Nhiễm và Thú Y Cộng Đồng, Khoa Chăn Nuôi Thú Y,
Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 27/03/2025
Ngày chỉnh sửa: 12/06/2025
Ngày chấp nhận: 03/07/2025

Từ khóa

Bordetella bronchiseptica
Đề kháng kháng sinh
Hoạt tính kháng khuẩn
Tinh dầu trà trà

***Tác giả liên hệ**

Nguyễn Ngọc Thanh Xuân
Email:
xuan.nguyenngocthanh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Tinh dầu trà trà (TTO) được chiết xuất bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước ở 100°C trong 100 phút với hiệu suất khoảng 2,6%. TTO thu được có dạng chất lỏng trong suốt, màu từ vàng nhạt đến không màu và có mùi hơi cay nhẹ. Sau đó, tinh dầu này được kiểm tra khả năng kháng các chủng vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica* phân lập từ chó có triệu chứng hô hấp. Trong số 45 mẫu bệnh phẩm thu được, 10 chủng *Bordetella bronchiseptica* đã được chọn lọc bằng PCR. Kết quả kháng sinh đồ cho thấy các chủng này có khả năng kháng nhiều loại kháng sinh phổ biến trong thú y, đặc biệt là amoxicillin (70%) và cephalosporin (80%). Tinh dầu trà trà ức chế vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica* ở nồng độ từ 5 đến 60 mg/mL với đường kính vòng kháng khuẩn từ 7,33 đến 23,33 mm được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch đĩa. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu trà trà trên chủng *Bordetella bronchiseptica* Bb3 và Bb4 lần lượt là 0,08 và 0,04 mg/mL. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đều là 0,156 mg/mL trên cả hai chủng. Kết quả nghiên cứu cho thấy tinh dầu trà trà có tiềm năng trở thành một phương pháp hỗ trợ điều trị an toàn và hiệu quả đối với bệnh hô hấp ở chó do *Bordetella bronchiseptica* gây ra. Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu *in vivo* để khẳng định và đánh giá toàn diện hơn hiệu quả này.

1. Đặt Vấn Đề

Trong bối cảnh số lượng vi khuẩn kháng thuốc ngày càng gia tăng trong nhân y và thú y, đề kháng kháng sinh trở thành tâm điểm trong các chương trình y tế quốc gia và quốc tế (Salam & ctv., 2023; WOA, 2023). Trước áp lực phải sử dụng kháng sinh hợp lý, giám sát kháng thuốc không chỉ là nhiệm vụ cấp thiết mà còn mở ra

hướng đi mới trong việc tìm kiếm các giải pháp hỗ trợ hoặc thay thế hiệu quả và an toàn. Các hợp chất kháng khuẩn có nguồn gốc tự nhiên được xem là lựa chọn tiềm năng và bền vững, nhằm giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh trong điều trị mà vẫn đảm bảo hiệu quả. Cây trà trà (tên khoa học là *Melaleuca alternifolia*) mọc dại ở khắp nơi trong nước ta, chứa nhiều các hợp chất kháng khuẩn, kháng nấm và kháng virus

như tannin, saponin, quinon, terpen, phenol, flavonoid, và terpenoid (Carson & ctv., 2006).

Tinh dầu chiết xuất từ cây trà mang các đặc tính sinh học quý giá hứa hẹn sẽ trở thành giải pháp thay thế kháng sinh tiềm năng. Các nghiên cứu đã chỉ ra sự gia tăng tình trạng kháng kháng sinh ở vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica*, một tác nhân gây bệnh hô hấp quan trọng ở động vật. Cụ thể, nghiên cứu của Speakman & ctv. (1997) đã ghi nhận tỷ lệ kháng trimethoprim lên đến 84,2% và ampicillin là 90,1%. Tương tự, công bố của Sandra Prüller & ctv. (2015) cũng cho thấy xu hướng giảm độ nhạy cảm của một số chủng *B. bronchiseptica* thực địa đối với một số kháng sinh nhóm β -lactam, bao gồm penicillins và cephalosporins (như ceftiofur và cefalothin). Cơ chế kháng thuốc này có thể do vi khuẩn sản xuất enzyme β -lactamase, hoặc do màng tế bào của vi khuẩn giảm tính thấm đối với cephalosporins. Xuất phát từ thực tiễn này, nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu trà (TTO) trên vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica* phân lập từ chó có triệu chứng bệnh hô hấp. Kết quả của nghiên cứu giúp làm nổi bật tiềm năng sử dụng tinh dầu trà như một phương pháp hỗ trợ hoặc thay thế kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn đường hô hấp trên thú.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

2.1. Thời gian và địa điểm

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6/2024 đến tháng 10/2024 tại phòng thực hành Kiểm nghiệm thú sản và Môi trường sức khỏe vật nuôi - Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường ĐH Nông Lâm TP.HCM và phòng thí nghiệm CT121 Bộ Môn Hợp Chất Thiên Nhiên - Khoa Công Nghệ Kỹ Thuật Hóa Học và Thực Phẩm.

2.2. Vật liệu

Trà được mua tại vườn giống ở TP. Thủ Đức sau đó cắt những lá trưởng thành và cành non, rửa sạch bụi bẩn và để khô. Các chủng vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) được phân lập từ dịch hô hấp của chó mắc bệnh về hô hấp đến khám bệnh tại Phòng khám Thú y Pet Pola, TP. Thủ Đức, TP.HCM, và sau đó được định danh bằng phương pháp PCR.

2.3. Nội dung nghiên cứu

Phân lập và định danh vi khuẩn *B. bronchiseptica* từ dịch hô hấp của chó bị bệnh.

Thực hiện kháng sinh đồ để chọn chủng vi khuẩn đa đề kháng kháng sinh.

Chiết xuất tinh dầu trà bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu trà đối với các chủng vi khuẩn đa đề kháng kháng sinh phân lập được.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập và định danh vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica* trên chó

Mẫu dịch mũi/hầu họng được thu thập bằng tăm bông vô trùng từ những con chó có triệu chứng hô hấp, sau đó được bảo quản trong ống eppendorf bằng đá khô và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 12 giờ để phân lập và định danh. Các mẫu tăm bông được cấy ria lên môi trường thạch máu có bổ sung 5% máu cừu (Blood Agar, BA), ủ ở 37°C từ 18 đến 24 giờ. Sau đó, chọn khuẩn lạc nghi ngờ tiến để hành nhuộm Gram, thử các phản ứng catalase, oxidase (Bảng 1) và định danh bằng phương pháp phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) dựa trên gen fla (Zhao & ctv., 2011).

Bảng 1. Chỉ tiêu chọn khuẩn lạc nghi ngờ vi khuẩn *B. bronchiseptica*

Loại vi khuẩn	Thời gian ủ/ nhiệt độ ủ	Màu sắc khuẩn lạc	Kích thước khuẩn lạc	Phản ứng catalase/ oxidase	Hình thái vi khuẩn
<i>B. bronchiseptica</i>	24 giờ / 37°C	Trắng bóng	Nhỏ	+/+	Cầu trực khuẩn/trực khuẩn, Gram âm

Định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR: Khuẩn lạc nghi ngờ được cấy thuần lên môi trường BA có bổ sung 5% máu cừu để tiến hành định danh. DNA vi khuẩn được ly trích bằng phương pháp sốc nhiệt (Dashti & ctv., 2009), tách chiết DNA bằng cách chọn từ 5 - 6 khuẩn lạc đã cấy thuần cho vào eppendorff chứa 200 μ L nước không chứa nuclease (nuclease free water của Sigma-Aldrich, Mỹ), đun sôi ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Sau đó cho vào tủ -25°C trong 10 phút, tiếp theo ly tâm dịch chiết DNA ở

12.000 vòng/phút trong 5 phút để thu phần dịch nổi. Các chất tham gia phản ứng được trình bày ở Bảng 2. Primer đặc hiệu cho *B. bronchiseptica* được trình bày trong Bảng 3 và quy trình gia nhiệt được tham khảo theo Isvand & ctv. (2020) (Bảng 4). Tiếp theo, điện di sản phẩm PCR trên gel TBE (1X) 1,2% với nguồn điện 100 V và 500 mA trong 30 phút. Vi khuẩn sau khi được định danh sẽ tiến hành giữ gốc trong eppendorff chứa môi trường Brain Heart Infusion (BHI) và glycerol với tỉ lệ 7:3 (v/v) và bảo quản ở -25°C.

Bảng 2. Các thành phần trong phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích thành phần (μ L)
H ₂ O	6
2X DreamTaq Master Mix buffer	10
Primer	2
DNA template	2

Bảng 3. Các primer dùng trong nghiên cứu

Vi khuẩn	Gen	Primer	Trình tự (5' - 3')	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo
<i>B. bronchiseptica</i>	fla	Fla4	TGGCGCCTGCCCTATC	237	Zhao & ctv. (2011)
		Fla2	AGGCTCCCAAGAGAGAAA		

Bảng 4. Quy trình gia nhiệt của phản ứng PCR

Vi khuẩn	Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ	Tài liệu tham khảo
<i>B. bronchiseptica</i>	Tiến biến tính	95°C	4 phút	1	Isvand & ctv. (2020)
	Biến tính	95°C	30 giây	30	
	Bắt cặp	67°C	30 giây		
	Kéo dài	72°C	30 giây		
	Kết thúc	72°C	4 phút	1	

2.4.2. Kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn *B. bronchiseptica* phân lập được

Kháng sinh đồ của các chủng *B. bronchiseptica* được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch đĩa Mueller-Hinton (MHA, Himedia, India). Vi khuẩn được pha loãng trong nước muối sinh lý 0,85% và đo OD₆₀₀

= 0,1 tương đương với mật độ $\approx 2,54 \times 10^8$ CFU/mL (Kadlec & ctv., 2007). Sau đó huyền dịch vi khuẩn được phết đều lên bề mặt thạch đĩa MHA. Các đĩa giấy kháng sinh được sử dụng làm kháng sinh đồ được cung cấp bởi Công ty Nam Khoa. Việc lựa chọn các kháng sinh này tham khảo dựa trên nghiên cứu của Sandra Prüller & ctv. (2015) (Bảng 5).

Bảng 5. Các primer dùng trong nghiên cứu

STT	Kháng sinh	Nồng độ (µg)
1	Amikacin (Ak)	30
2	Amoxicillin (Ax)	10
3	Cephalosporin (Cp)	30
4	Doxycycline (Dx)	30
5	Enrofloxacin (Ef)	5
6	Erythromycin (Er)	15
7	Gentamicin (Ge)	10
8	Tetracycline (Te)	30

Mẫu được ủ ở 37°C trong 18 đến 24 giờ. Kết quả được ghi nhận bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh các đĩa giấy kháng sinh theo tiêu chuẩn CLSI 2020. Các chủng đa đề kháng sẽ được chọn để đánh giá khả năng kháng khuẩn của tinh dầu trà trà (TTO).

2.4.3. Chiết xuất tinh dầu trà trà (TTO)

Từ cây trà trà tươi chọn cắt những lá và cành non. Sau khi rửa sạch bụi bẩn và để ráo, cân 50 g nguyên liệu tươi xay nhuyễn cùng với 500 mL dung dịch NaCl 10%. Hỗn hợp sau khi xay nhuyễn để ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó cho vào bình cầu chưng cất dung tích 1.000 mL, lắp bình cầu vào hệ thống chưng cất lôi cuốn hơi nước. Hỗn hợp được chưng cất ở điều kiện nhiệt độ 100°C trong 100 phút. Sau khi ngưng tụ

sẽ thu được hỗn hợp lỏng gồm nước và tinh dầu. Tiếp theo, Na₂SO₄ sẽ được dùng để làm khan dịch chiết đến khi lắng cặn và được lọc qua giấy lọc Whatman No.1 (kích thước lỗ 11 µm) để thu được sản phẩm tinh dầu, bảo quản ở nhiệt độ dưới 0°C để thực hiện các thí nghiệm về sau.

Hiệu suất chưng cất tinh dầu H (%) được tính theo công thức: $H (\%) = [\text{Khối lượng tinh dầu thu được (g)} / \text{khối lượng nguyên liệu (g)}] \times 100\%$.

Sau khi chiết tỷ trọng của tinh dầu trà trà được xác định dựa theo TCVN 8444:2010 (2010). Bình đo tỷ trọng 5mL được làm sạch cẩn thận bằng nước và tráng tiếp bằng acetone rồi để khô. Cân chính xác trọng lượng của bình đo tỷ trọng. Sau đó, cho tinh dầu trà trà vào bình, lau

sạch chất lỏng thừa trên vạch mức và mặt ngoài của bình, cho bình vào buồng cân và cân chính xác đến 1 mg.

Công thức xác định tỷ trọng:

$$P = \frac{m1 - m0}{V}$$

Trong đó:

P: Tỷ trọng tinh dầu tại 20°C (g/mL),

m0: Khối lượng của bình đo tỷ trọng rỗng (g),

m1: Khối lượng của bình đo tỷ trọng có chứa mẫu (g),

V: Thể tích của bình đo tỷ trọng (mL).

2.4.4. Kiểm tra tính kháng khuẩn của TTO trên các chủng *B. bronchiseptica*

Dựa theo nghiên cứu của Magaldi & ctv. (2004) cách tiến hành được điều chỉnh để phù hợp với điều kiện thực tế của đề tài. Các chủng vi khuẩn được chọn ở thí nghiệm 2.4.2 sẽ được pha loãng trong dung dịch NaCl 0,85% và đo $OD_{600} = 0,1$ ($\approx 2,54 \times 10^8$ CFU/mL). Huyền dịch được trải đều trên bề mặt MHA bằng tấm bông vô trùng, tiếp đó dùng kẹp vô trùng gấp oxford cup đã được vô trùng ấn lên mặt thạch để tạo các giếng có đường kính 8 mm. Sau đó, nhỏ lần lượt 200 μ L dung dịch TTO pha trong dung dịch dimethylsulfoxide (DMSO) vào các giếng. Nồng độ TTO (đã xác định tỷ trọng ở mục 2.4.3) được điều chỉnh dựa trên nghiên cứu của Andani & ctv. (2021) để đạt từ 5, 20, 4 và 60 mg/mL. Dung dịch DMSO dùng để pha loãng TTO cũng được kiểm tra tính kháng khuẩn. Kháng sinh amikacin (30 μ g/mL) được chọn làm đối chứng dương. Sau khi làm xong tất cả các đĩa sẽ được để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để dịch chiết khuếch tán ra môi trường, tiếp theo được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được ghi

nhận bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh giếng hoặc đĩa giấy thấm kháng sinh trong đối chứng dương, tính bằng $mm \pm$ độ lệch chuẩn (SD).

2.4.5 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của TTO đối với các chủng *B. bronchiseptica*

Xác định giá trị MIC và MBC được thực hiện trên môi trường canh Mueller Hinton (MHB, Himedia, India). Các nồng độ TTO trong thí nghiệm này được lựa chọn căn cứ theo kết quả đường kính vòng vô khuẩn ở mục 2.4.4. Đầu tiên tinh dầu trầm trà được pha loãng trong DMSO để đạt nồng độ 10 mg/mL. Tiếp theo dung dịch này được pha loãng tiếp trong ống nghiệm chứa 5 mL MHB để đạt các nồng độ từ 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156; 0,08; 0,04 và cuối cùng là 0,02 mg/mL. Huyền dịch vi khuẩn sau khi đo $OD_{600} = 0,1$ (tương đương mật độ $2,54 \times 10^8$ CFU/mL) được pha loãng 10 lần để có được dịch khuẩn đạt khoảng $2,45 \times 10^7$ CFU/mL. Dùng micropipette hút 200 μ L dịch khuẩn và cho vào từng ống nghiệm chứa môi trường MHB có bổ sung tinh dầu ở các nồng độ khác nhau đã chuẩn bị từ trước. Ống đối chứng dương bao gồm dịch khuẩn và môi trường, đối chứng âm là môi trường và dung dịch tinh dầu nồng độ 5 mg/mL. Các ống nghiệm sẽ được ủ ở 37°C từ 18 đến 24 giờ. Giá trị MIC và MBC được xác định bằng phương pháp trang đếm trên môi trường BA để xác định số lượng khuẩn lạc. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Công thức tính:

$$A \text{ (CFU/g hay CFU/mL)} = \frac{N}{n_1 \cdot V_1 \cdot f_1 + \dots + n_i \cdot V_i \cdot f_i}$$

Trong đó:

A: Số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1 g hay 1 mL mẫu,

N: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn,

n_i : Số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i ,

V: Thể tích mẫu (mL) cấy trong mỗi đĩa,

f_i : Độ pha loãng tương ứng.

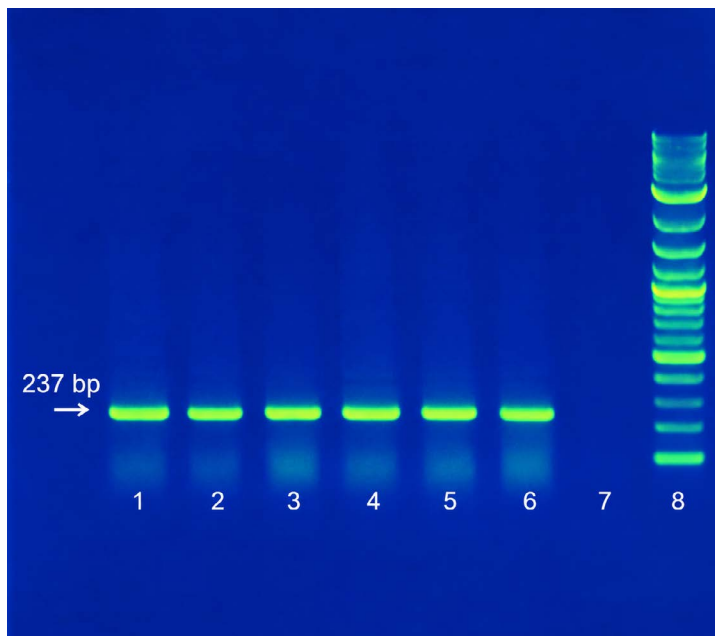
2.5. Xử lý thống kê

Phần mềm Minitab 17.0 và test Tukey 1 yếu tố được sử dụng để so sánh sự khác biệt về mặt thống kê của các số liệu trong đề tài với độ tin cậy 95%.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *B. bronchiseptica* trên chó

Từ 45 mẫu bệnh phẩm phân lập được 10 chủng *B. bronchiseptica* bằng phương pháp PCR (Hình 1), chiếm tỷ lệ 22,22%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Lappin & ctv. (2017), ghi nhận tỷ lệ phân lập *B. bronchiseptica* ở chó dao động từ 22 - 49%.



Hình 1. Kết quả PCR của vi khuẩn *B. bronchiseptica*. Giếng 1 - 5: sản phẩm PCR; giếng 6: đối chứng dương; giếng 7: đối chứng âm; giếng 8: ladder (2000 bp).

3.2. Kháng sinh đồ của các chủng *B. bronchiseptica* phân lập được

Kết quả kháng sinh đồ của các chủng *B. bronchiseptica* Bảng 6 cho thấy amikacin và enrofloxacin là hai kháng sinh có hiệu quả cao nhất, với tỷ lệ nhạy cảm lần lượt là 90 (9/10) và

80% (8/10). Tuy nhiên, đáng lo ngại là tỷ lệ đề kháng với amoxicillin là 70% (7/10). Từ kết quả này, hai chủng vi khuẩn đa kháng kháng sinh là *B. bronchiseptica*_{Bb3} và *B. bronchiseptica*_{Bb4} (Bảng 7) được chọn để thực hiện các thí nghiệm thử tính kháng khuẩn của tinh dầu trà trà.

Bảng 6. Kết quả kháng sinh đồ của các chủng *B. bronchiseptica* phân lập được

Loại kháng sinh	Kết quả (n = 10)			
	Đề kháng		Nhạy cảm	
	n1	Tỷ lệ (%)	n2	Tỷ lệ (%)
Amikacin (Ak)	1	10	9	90
Amoxicillin (Ax)	7	70	3	30
Cephalosporin (Cp)	6	60	4	40
Doxycycline (Dx)	4	40	6	60
Enrofloxacin (Ef)	2	20	8	80
Erythromycin (Er)	4	40	6	60
Gentamicin (Ge)	5	50	5	50
Tetracycline (Te)	3	30	7	70

Bảng 7. Đề kháng kháng sinh của 2 chủng *B. bronchiseptica* Bb3 và Bb4

Chủng phân lập được	Kí hiệu	Kháng sinh đề kháng
<i>B. bronchiseptica</i> Bb3	Bb3	AxCpDxEfErGeTe
<i>B. bronchiseptica</i> Bb4	Bb4	AxCpErGe

3.3. Hiệu suất điều chế TTO

Sản phẩm tinh dầu sau chiết xuất có dạng lỏng trong suốt, màu vàng nhạt đến không màu, mùi hơi cay nhẹ. Hiệu suất chiết tinh dầu trung bình khoảng $2,58 \pm 0,26\%$ (Bảng 8). Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Duong & ctv. (2016)

cũng sử dụng dung dịch NaCl 10% kết hợp cùng điều kiện nhiệt độ, thời gian tối ưu nên cho hiệu suất chiết là $4,91 \pm 0,06\%$. Sự khác biệt này có thể xuất phát từ yếu tố thổ nhưỡng, khí hậu ở các vùng trồng khác nhau kết hợp với yếu tố độ tuổi thu hoạch của lá, dẫn đến sự chênh lệch trong kết quả chiết xuất.

Bảng 8. Hiệu suất chiết xuất tinh dầu

STT	Khối lượng nguyên liệu (g)	Thể tích dung môi chiết (mL)	Thể tích thu được (mL)	Hiệu suất (%)
1	50	500	1,5	2,67
2	50	500	1,2	2,14
3	50	500	1,6	2,85
4	50	500	1,4	2,49
5	50	500	1,4	2,49
Trung bình			$1,42 \pm 0,15$	$2,58 \pm 0,26$

Tỷ trọng trung bình của tinh dầu trầm trà là 0,879 g/mL (Bảng 9), như vậy TTO thuộc nhóm tinh dầu nhẹ hơn nước. Theo Dược điển Việt Nam, tinh dầu trầm trà có tỷ trọng dao động từ 0,9 đến 0,925 g/mL. Sự khác biệt này có thể do sự tăng giảm của hàm lượng tinh dầu trong cây

trầm trà giữa các mùa trong năm. Nhờ chứa hàm lượng cao các hợp chất eucalyptol và terpineol trong cấu tạo phân tử mà tinh dầu trầm trà có tỷ trọng và hiệu suất chiết khá cao. Đó cũng là thành phần chính đem lại hiệu quả kháng khuẩn của tinh dầu (Khang & ctv., 2019).

Bảng 9. Tỷ trọng mẫu tinh dầu thu được

STT	Kết quả đo tỉ trọng (g/mL)
1	0,890
2	0,871
3	0,874
4	0,875
5	0,887
Trung bình	0,879 ± 0,009

3.4. Hoạt tính kháng khuẩn của TTO trên các chủng vi khuẩn *B. bronchiseptica* trên môi trường MHA

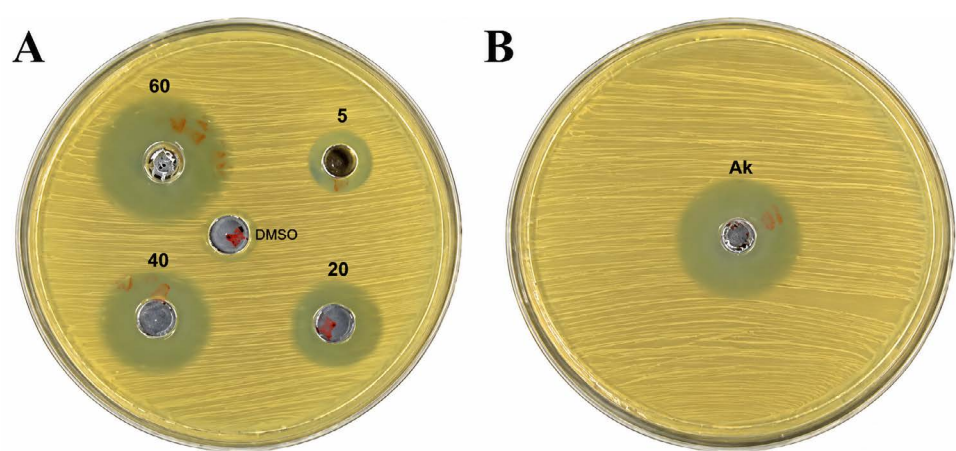
Tinh dầu trầm trà đã được thử nghiệm khả năng kháng khuẩn trên hai chủng *B. bronchiseptica* đa kháng thuốc bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường MHA với nồng độ TTO từ 5 đến 60 mg/mL. Kết quả được đánh giá dựa trên đường kính vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh giếng chứa tinh dầu trầm trà sau 24 giờ ủ ở 37°C (Bảng 10). Dung dịch DMSO tuyệt đối dùng để pha tinh dầu trầm trà không thể hiện tính kháng khuẩn (Bảng 10), do đó được sử dụng làm dung môi trong các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả thí nghiệm cho thấy TTO có khả năng ức chế đối với cả hai chủng vi khuẩn *B. bronchiseptica* đa kháng ở tất cả các nồng độ thử nghiệm (Bảng 10, Hình 3, và Hình 4). Đường kính vòng vô khuẩn tỷ lệ thuận với nồng độ TTO, dao động trong khoảng từ 7,3 đến 24 mm. Ở nồng độ thấp nhất (5 mg/mL), đường

kính vòng vô khuẩn từ 7,33 - 9,83 mm. Ở nồng độ cao nhất (60 mg/mL), đường kính vòng vô khuẩn từ 22,00 - 23,33 mm. Bắt đầu từ nồng độ 20 và 40 mg/mL hoạt tính kháng khuẩn của TTO đã tương đương với kháng sinh amikacin trên chủng cả hai chủng *B. bronchiseptica* Bb3 và *B. bronchiseptica* Bb4. Trên chủng *B. bronchiseptica* Bb3 hoạt tính kháng khuẩn của TTO ở nồng độ 60 mg/mL còn hiệu quả hơn so với kháng sinh đối chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$). Kết quả thí nghiệm phù hợp với nghiên cứu của Cox & ctv. (2000). Nghiên cứu này cho rằng TTO có khả năng ức chế quá trình hô hấp và tăng cường tính thấm của màng tế bào vi khuẩn. Cụ thể, ở nồng độ 0,5% (v/v) TTO đã ức chế hô hấp của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* sau chỉ 10 phút tiếp xúc, đồng thời làm tăng tính thấm của màng tế bào sau 30 phút, đây là hai cơ chế có khả năng gây chết tế bào cao nhất của tinh dầu trầm trà ở nồng độ ức chế tối thiểu.

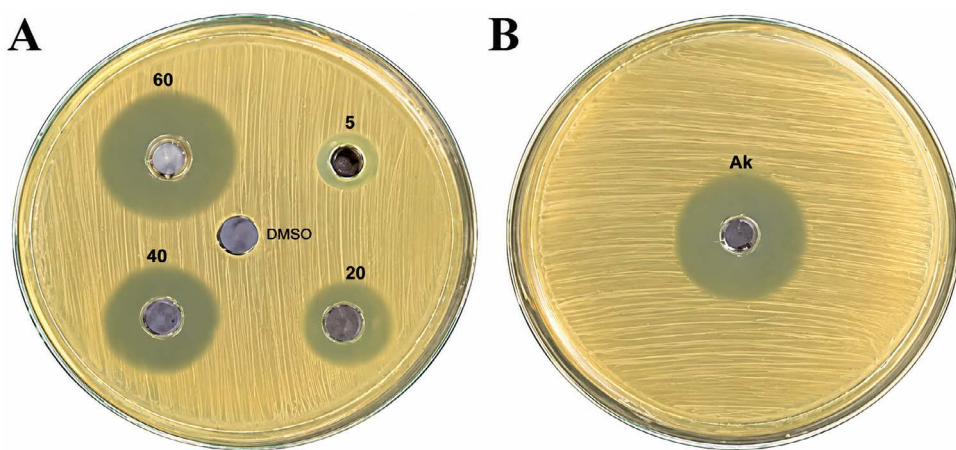
Bảng 10. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của tinh dầu trầm trà (TTO) đối với *B. bronchiseptica*_{Bb3} và *B. bronchiseptica*_{Bb4}

Nồng độ (mg/mL)	<i>B. bronchiseptica</i> _{Bb3}	<i>B. bronchiseptica</i> _{Bb4}
5	9,83a ± 0,29	7,33d ± 5,06
20	18,67b ± 0,58	11,83d± 0,29
40	18,83b ± 0,76	19,33e ± 1,16
60	22,00c ± 1,00	23,33e ± 0,58
Amikacin (30 µg/mL)	18,67b ± 0,58	20,67e ± 0,58
DMSO 100%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Ghi chú: Các chữ cái (a, b, c, d, e) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau rất có ý nghĩa thống kê với ($P < 0,01$) trên cả 2 chủng *B. bronchiseptica*.



Hình 2. Vòng vô khuẩn của tinh dầu trầm trà (TTO) và dimethylsulfoxide (DMSO) 100% (A), kháng sinh Amikacin (B) đối với chủng *B. bronchiseptica*_{Bb3} trên môi trường thạch đĩa Mueller-Hinton (MHA).



Hình 3. Vòng vô khuẩn của tinh dầu trầm trà (TTO) và dimethylsulfoxide (DMSO) 100% (A), kháng sinh Amikacin (B) đối với chủng *B. bronchiseptica*_{Bb4} trên môi trường thạch đĩa Mueller-Hinton (MHA).

3.5. Xác định giá trị MIC và MBC của TTO đối với hai chủng *B. bronchiseptica*

Phương pháp pha loãng nồng độ được áp dụng để xác định giá trị MIC và MBC của TTO trên hai chủng *B. bronchiseptica* đa kháng kháng sinh. Kết quả cho thấy giá trị MIC của TTO đối với chủng *B. bronchiseptica*_{Bb3} và *B. bronchiseptica*_{Bb4} lần lượt là 0,08 và 0,04 mg/mL, trong khi giá trị MBC là 0,156 mg/mL cho cả hai chủng.

Nghiên cứu của Carson & ctv. (1995) cho rằng khả năng kháng khuẩn của TTO chủ yếu từ terpinene-4-ol, đây cũng là thành phần chính của tinh dầu. Terpinen-4-ol có hoạt tính kháng lại 12 loại vi khuẩn gây bệnh được sử dụng trong thí nghiệm, trong khi đó p-cymene không biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn. Nghiên cứu của Hammer & ctv. (1996) đã chỉ ra rằng, TTO có khả năng ức chế hầu hết các vi khuẩn Gram âm được thử nghiệm, trong đó *Serratia marcescens* là nhạy nhất với giá trị MIC ở mức 0,25% (v/v) và *Pseudomonas aeruginosa* có giá trị MIC cao nhất là 3% (v/v). Điều này cho thấy TTO có thể là một lựa chọn hiệu quả cho việc điều trị các nhiễm trùng do vi khuẩn gây ra, đặc biệt khi nhiều chủng vi khuẩn hiện nay đã trở nên kháng thuốc. Nghiên cứu của Inouye & ctv. (2001) cũng ghi nhận rằng TTO có thể ức chế các vi khuẩn gây bệnh trên đường hô hấp như *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* với MIC (w/v) lần lượt là 0,16 và 0,32.

Kết Luận và Đề Nghị

Tinh dầu trà trà (TTO) thu được có hiệu suất trung bình đạt 2,58% và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng *B. bronchiseptica* đa kháng. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) dao động từ 0,04 đến 0,08 mg/mL và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) là 0,156 mg/mL. Điều này mở ra tiềm năng ứng dụng TTO trong

điều trị nhiễm trùng do vi khuẩn kháng thuốc ở động vật. Khả năng diệt khuẩn vượt trội của TTO mở ra triển vọng ứng dụng rộng rãi trong thú y, không chỉ giúp giải quyết vấn đề kháng kháng sinh mà còn thúc đẩy việc sử dụng các liệu pháp tự nhiên trong chăm sóc sức khỏe vật nuôi. Để khai thác tối đa hiệu quả của tinh dầu, cần đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của TTO trên nhiều loại vi khuẩn kháng thuốc khác, không chỉ giới hạn ở *B. bronchiseptica*, để xác định rõ hơn tiềm năng ứng dụng của tinh dầu trong việc kiểm soát nhiều bệnh nhiễm khuẩn hơn nữa. Từ đó, nghiên cứu và phát triển các chế phẩm có thành phần chính là TTO như dung dịch sát khuẩn, thuốc xịt, hoặc các dạng bào chế khác, nhằm phòng ngừa và hỗ trợ điều trị các bệnh nhiễm khuẩn cho vật nuôi một cách hiệu quả và an toàn.

Lời Cảm Ơn

Nhóm tác giả thực hiện không có xung đột về lợi ích.

Lời Cảm Ơn

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ từ các Khoa và Thầy Cô đã tạo điều kiện thực hiện đề tài này.

Tài liệu tham khảo

- Andani, R., Fajrina, A., Asra, R., & Eriadi, A. (2021). Antibacterial activity test of mangosteen plants (*Garcinia mangostana* L.): A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development* 9(1), 164-171. <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v9i1.927>.
- Carson, C. F., Cookson, B. D., Farrelly, H. D., & Riley, T. V. (1995). Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35, 421-424.

- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warming, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88(1), 170-175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>.
- Dashti, A., Jadaon, M., Abdulsamad, A., & Dashti, H. (2009). Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal* 41(2), 111-115.
- Duong, M. H., Vo, H. D., & Nguyen, T. D. C. (2016). Study on extraction, chemical composition and preliminary application of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) in mouthwash production. *Can Tho University Journal of Science* 45a, 90-96.
- Inouye, S., Yamaguchi, H., & Takizawa, T. (2001). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of Infection and Chemotherapy* 7(4), 251-254. <http://dx.doi.org/10.1007/s101560170022>.
- Isvand, M., Mokhtari, A., & Esmailnejad, A. (2020). Genomic and immunological identification of canine distemper virus (cdv) and investigation of coinfection with *Bordetella bronchiseptica* among dogs in Iran. *Jentashapir Journal of Cellular and Molecular Biology* 11(4), e111677.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1996). Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *American Journal of Infection Control* 24(3), 186-189.
- Kadlec, K., Wiegand, I., Kehrenberg, C., & Schwarz, S. (2007). Studies on the mechanisms of β -lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59(3), 396-402. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl517>.
- Khang, L. T., Huong, N. T. T., & Tien, L. T. T. (2019). Antifungal activity of tea tree essential oils (*Meleleuca alternifolia*) against phytopathogenic fungi. *International Journal of Advanced Research* 7(9), 1239-1248.
- Lappin, M. R., Blondeau, J., Boothe, D., Breitschwerdt, E. B., Guardabassi, L., Lloyd, D. H., Papich, M. G., Rankin, S. C., Sykes, J. E., Turnidge, J., & Weese, J. S. (2017). Antimicrobial use guidelines for treatment of respiratory tract disease in dogs and cats: Antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31(2), 279-294. <https://doi.org/10.1111/jvim.14627>.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases* 8(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>.
- Prüller, S., Rensch, U., Meemken, D., Kaspar, H., Kopp, P. A., Klein, G., & Kehrenberg, C. (2015). Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from swine and companion animals and detection of resistance genes. *PLoS One* 10(8), e0135703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135703>.
- Salam, M., Al-Amin, M., Salam, M. T., Pawar, J., Akhter, N., Rabaan, A., & Alqumber, M. (2023). Antimicrobial resistance: A growing serious threat for global public health. *Healthcare* 11. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>.
- Speakman, A. J., Binns, S. H., Dawson, S., Hart, C. A., & Gaskell, R. M. (1997). Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from cats and a comparison of the agar dilution and E-test methods. *Veterinary Microbiology* 54(1), 63-72. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01256-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01256-4).
- TCVN (Vietnamese national standards). (2010). TCVN 8444:2010 dated on December 29, 2010. Essential oils: Determination of relative density at 20°C - Reference method. Retrieved January

- 18, 2025, from <https://tieuchuan.vsqi.gov.vn/tieuchuan/view?sohieu=TCVN+8444%3A2010>.
- WOAH (World Organisation for Animal Health). (2023). The OIE strategy on antimicrobial resistance and the prudent use of antimicrobials. Retrieved February 20, 2025, from <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/>.
- Zhao, Z., Wang, C., Xue, Y., Tang, X., Wu, B., Cheng, X., & He, Q. (2011). The occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in pigs with clinical respiratory disease. *The Veterinary Journal* 188(3), 337-340.