

## EXTRACTION AND EVALUATION OF CHEMICAL COMPOSITION, BIOACTIVITY OF *LITSEA CUBEBA* FRUIT EXTRACTS

Le Huy Hoang<sup>1\*</sup>, Le Thuy Anh<sup>2</sup>, Nghiem Ngoc Hoa<sup>1</sup>, Pham Kien Cuong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of New Technology - Academy of Military Science and Technology

<sup>2</sup>VNU University of Science - Vietnam National University, Hanoi

| ARTICLE INFO               | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Received: 05/7/2023        | <i>Litsea cubeba</i> (Lour.) Pers fruit is a well-known traditional medicinal plant and contains many biologically active substances. However, most of studies are exploited to get essential oil, but there aren't many studies on obtaining the extract. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of extraction methods (maceration, reflux extraction and ultrasonic-assisted extraction) -on the <i>Litsea cubeba</i> fruit. The extraction efficiency was to determine -chemical composition and evaluate its <i>in vitro</i> antibacterial, antioxidant activities and ability to prevent meat spoilage. The results showed that <i>Litsea cubeba</i> fruit extracts have antibacterial activity against <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> and <i>Salmonella typhi</i> . Moreover, the ultrasonic-assisted extract have the maximum contents of phenolics and flavonoid (TPC was 276,38±11,88 mg GAE/g, TFC was 72,53 ±6,43 mg QE/g) and gained the highest antioxidant activity (IC <sub>50</sub> value is 114,46 µg/ml), the highest antibacterial activity (with the inhibition zone of <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. typhi</i> was 16,8 ± 0,5 mm; 13,5 ± 0,4 mm; 13,3 ± 0,4 mm, respectively). In addition, the ultrasonic-assisted extract at concentration of 0,5% has an ability to prevent meat spoilage in 7 days. The results are the prerequisites for the development of valuable scientific data about this plant in Vietnam. |
| Revised: 15/8/2023         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Published: 18/8/2023       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| KEYWORDS                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <i>Litsea cubeba</i> fruit |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Extraction                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Biological activity        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Chemical composition       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Fresh meat                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

## CHIẾT XUẤT VÀ KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ QUẢ MÀNG TANG [*LITSEA CUBEBA* (LOUR.) PERS]

Lê Huy Hoàng<sup>1\*</sup>, Lê Thúy Anh<sup>2</sup>, NghiêM Ngoc Hoa<sup>1</sup>, Phạm Kiên Cường<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ mới - Viện Khoa học và Công nghệ Quân sự

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐH Quốc gia Hà Nội

| THÔNG TIN BÀI BÁO          | TÓM TẮT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ngày nhận bài: 05/7/2023   | Quả màng tang <i>Litsea cubeba</i> (Lour.) Pers được sử dụng trong y học dân gian và có nhiều hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam, đa phần khai thác quả màng tang để lấy tinh dầu mà chưa có nhiều nghiên cứu thu nhận dịch chiết toàn phần. Vì vậy, nghiên cứu này thử nghiệm điều kiện chiết xuất trên cơ sở 3 phương pháp (phương pháp ngâm, phương pháp đun hồi lưu, phương pháp chiết xuất hỗ trợ siêu âm) để thu nhận các dịch chiết toàn phần của quả màng tang khô và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa <i>in vitro</i> và khả năng hạn chế sự hỏng thịt tươi. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các cao chiết quả màng tang có hoạt tính chống oxy hóa và có khả năng kháng các vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> và <i>Salmonella typhi</i> . Trong đó, cao chiết toàn phần bằng phương pháp chiết xuất hỗ trợ siêu âm có hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số là cao nhất (hàm lượng TPC là 276,38±11,88 mg GAE/g, hàm lượng TFC là 72,53 ±6,43 mg QE/g) với hoạt tính chống oxy hóa là cao nhất (giá trị IC <sub>50</sub> là 114,46 µg/ml) và hoạt tính kháng khuẩn (đường kính vòng kháng khuẩn ở các vi khuẩn <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. typhi</i> lần lượt là 16,8 ± 0,5 mm; 13,5 ± 0,4 mm; 13,3 ± 0,4 mm) là mạnh nhất. Ngoài ra, cao chiết quả màng tang bằng phương pháp chiết xuất hỗ trợ siêu âm ở nồng độ 0,5% có khả năng hạn chế sự hỏng thịt tươi trong thời gian dự trữ lạnh 7 ngày. Kết quả thu được góp phần bổ sung dữ liệu nghiên cứu về loại quả này tại Việt Nam. |
| Ngày hoàn thiện: 15/8/2023 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Ngày đăng: 18/8/2023       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| TỪ KHÓA                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Quả màng tang              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Chiết xuất                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Hoạt tính sinh học         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Thành phần hóa học         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Thịt tươi                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8283>

\* Corresponding author. Email: hoang201314@gmail.com

## 1. Giới thiệu

Cây màng tang [*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.] mọc tự nhiên ở các vùng núi cao ở các tỉnh miền núi phía Bắc, Việt Nam. Trên thế giới, loại cây này có đặc tính chữa bệnh và được sử dụng trong y học cổ truyền để hỗ trợ điều trị một số bệnh khác nhau, đặc biệt là các bệnh về tiêu hóa (tiêu chảy, đau bụng, khó tiêu và viêm dạ dày ruột). Quả màng tang là nguồn nguyên liệu được biết đến với hàm lượng tinh dầu cao có một số hoạt tính như khả năng chống oxy hóa [1], hoạt tính kháng khuẩn mạnh, đặc biệt là trên các loại vi khuẩn gây bệnh và hồng thực phẩm như *E.coli*, *Salmonella*, *S.aureus*, *L.monocytogenes* [2].

Ở Việt Nam, một số công trình nghiên cứu thành phần hóa học cây màng tang (lá, vỏ thân, vỏ rễ) cũng như thành phần tinh dầu từ quả đã được thực hiện. Về thành phần hóa học, bên cạnh tinh dầu ứng dụng cho bảo quản thực phẩm, quả màng tang còn chứa các hợp chất thứ cấp quan trọng khác như polyphenol, flavonoid [3]. Tuy nhiên, tính đến nay hướng nghiên cứu chiết xuất nhóm hợp chất này từ quả màng tang Việt Nam cho nghiên cứu hoạt tính sinh học chưa có nhiều. Trên thế giới, một số phương pháp nghiên cứu thu nhận dịch chiết quả màng tang đã được công bố như phương pháp ngâm, chiết Soxhlet, đun hồi lưu, chiết xuất hỗ trợ siêu âm... [3], [4]. Gần đây, ba phương pháp siêu âm, đun hồi lưu, ngâm đã được sử dụng để thu nhận dịch chiết toàn phần quả màng tang [5]-[8]. Các nghiên cứu được thực hiện với mục đích khảo sát hiệu suất thu nhận cao chiết toàn phần cũng như đặc tính hóa học của cao chiết từ quả màng tang để ứng dụng trong chăm sóc sức khỏe [9], [10]. Tuy nhiên, các điều kiện chiết xuất này chưa được áp dụng trên quả màng tang Việt Nam để thu nhận cao chiết cho nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện để khảo sát, lựa chọn điều kiện chiết xuất cao chiết từ quả màng tang theo 3 phương pháp ngâm, đun hồi lưu và chiết xuất hỗ trợ siêu âm; xác định sơ bộ thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cao chiết *in vitro* và thử nghiệm khả năng hạn chế sự hỏng thối tươi trong thời gian dự trữ lạnh 7 ngày.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.1.1. Đối tượng

Quả màng tang khô (*Litsea cubeba*) có màu nâu đen, đường kính quả khô từ 3-5 mm, có mùi thơm (Hình 1) được cung cấp bởi công ty TNHH gia vị Việt Hiệp.



Hình 1. Quả màng tang khô

Thịt thăn lợn tươi được mua tại chợ Nghĩa Tân, Cầu Giấy, thịt được chọn đáp ứng các chỉ tiêu cảm quan của thịt tươi theo TCVN 7046:2019 về màu sắc, trạng thái bên ngoài, độ đàn hồi.

#### 2.1.2. Thiết bị, dụng cụ

Các hoá chất, chất chuẩn của Viện Công nghệ mới đảm bảo độ tinh khiết P.A có nguồn gốc từ Trung Quốc, Mỹ, Đức, Canada, Việt Nam. Dụng cụ, thiết bị chính: Bể siêu âm (Elma, Đức), tủ sấy áp lực giảm (TaisiteLab, Mỹ), máy đo quang phổ UV-vis 1900i (Shimadzu, Nhật Bản), nồi khử trùng (Hirayama, Nhật Bản), tủ ẩm, tủ cấy vi sinh (Mettler, Đức), máy lắc (Yihder, Đài Loan). Các chủng vi sinh vật kiểm định gồm: *Salmonella typhi* ATCC 10428, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* VTCC 51, được cung cấp từ bộ môn Thực vật, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu nhận chiết xuất

Chiết xuất các hợp chất có trong quả màng tang khô với dung môi là ethanol 96% và tiến hành theo 3 phương pháp ngâm (N96), đun hồi lưu (H96) và chiết xuất hỗ trợ siêu âm (S96).

Phương pháp ngâm được tiến hành theo mô tả của Dalimunthe và cộng sự (2021) [8]. Cân chính xác 10g bột quả màng tang cho vào bình thủy tinh 450 ml và bổ sung 75 ml dung dịch

ethanol 96% (tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:7,5) vào bình thủy tinh, đậy kín. Hỗn hợp được lắc đều trộn đều và ngâm ở nhiệt độ phòng (khoảng 27°C) trong 72 giờ.

Phương pháp đun hồi lưu được tiến hành theo mô tả của Changlei và cộng sự (2015) [7]. Cân chính xác 10g bột quả màng tang vào bình cầu 250 ml chứa 100 ml dung dịch ethanol 96% (tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10). Hỗn hợp được chiết hồi lưu 2 chu kỳ ở nhiệt độ 65°C trong 2 giờ.

Phương pháp chiết xuất hỗ trợ siêu âm được thực hiện theo mô tả của Liu và cộng sự (2014) [4]. Cân chính xác 10g quả màng tang vào bình thủy tinh 450 ml và bổ sung 140 ml dung dịch ethanol 96% (tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:14). Sau đó, hỗn hợp được chiết xuất theo kỹ thuật siêu âm trong thời gian 50 phút, nhiệt độ 60°C, tần số 37 Hz.

Sau mỗi phương pháp chiết xuất, dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman để thu phần dịch. Sau đó, dịch chiết sau lọc được chuyển sang cốc thủy tinh chịu nhiệt loại 500 ml và sử dụng tủ sấy áp lực giảm để bốc hơi dung môi ở nhiệt độ dưới 60°C. Sau thời gian 18-24 tiếng bốc hơi áp lực giảm, cao đặc (dung môi còn lại không quá 20%) được thu lại. Hiệu suất thu nhận cao chiết được tính theo công thức (1):

$$H = \frac{m_{\text{cao chiết}}}{m_{\text{nguyên liệu}}} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó: H: Hiệu suất thu nhận cao chiết (%)

$m_{\text{cao chiết}}$ : Khối lượng cao (đã trừ ẩm) thu được sau khi loại dung môi (g)

$m_{\text{nguyên liệu}}$ : Khối lượng dược liệu (đã trừ ẩm) đem chiết (g).

#### 2.2.2. Phương pháp xác định một số thành phần có hoạt tính sinh học

Phương pháp định tính được thực hiện theo mô tả của Withule và cộng sự (2021) [9] và Manurung (2015) [10]. Mẫu chiết xuất từ quả màng tang được định tính để xác định một số nhóm hợp chất flavonoid, polyphenol, tanin, saponin, alkaloid, steroid/triterpenoid, glycoside.

Định lượng polyphenol (TPC): Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo phương pháp sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu [11]. Kết quả được thể hiện bằng mg đương lượng axit gallic trên gam cao chiết (mgGAE/g cao chiết).

Định lượng flavonoid (TFC): Hàm lượng flavonoid được xác định bằng phương pháp so màu theo mô tả của Bag và cộng sự (2015) [12]. Kết quả được thể hiện bằng đương lượng mg quercetin trên gam cao chiết (mg QE/g cao chiết).

#### 2.2.3. Khảo sát hoạt tính chống oxi hóa in vitro

Khả năng chống oxi hóa của dịch chiết được xác định theo phương pháp của Hara và cộng sự [13], tiến hành như sau: Dịch chiết được pha trong dung môi DMSO với nồng độ từ 20 đến 200 µg/ml. Thêm dung dịch DPPH 0,1 mM đã chuẩn bị vào các ống nghiệm đã có mẫu thử ở các nồng độ theo tỷ lệ 1:1 (v/v). Các ống nghiệm được ủ ở nhiệt độ phòng trong điều kiện tránh ánh sáng ở 30 phút, sau đó đo độ hấp thụ quang của các mẫu tại bước sóng 517 nm. Giá trị IC<sub>50</sub> là nồng độ của mẫu thử mà tại đó ức chế được 50% sự giải phóng gốc tự do, được xác định dựa trên đường chuẩn tuyến tính giữa nồng độ µg/ml và % chống oxi tương ứng.

#### 2.2.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch được sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết màng tang theo mô tả của Bauer và cộng sự (1966) [14]: Hút 100 µl dịch vi khuẩn đã được hoạt hóa (nồng độ 10<sup>6</sup> CFU/mL) trải đều lên bề mặt thạch. Cao chiết pha trong DMSO để đạt đến nồng độ 100 mg/ml. Sau đó, 20 µl đối chứng, dịch cao chiết tương ứng đã chuẩn bị được đưa lên tấm giấy lọc vô trùng có đường kính 0,6 cm. Sau 24 giờ khảo sát (ở 37°C), khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn được ghi nhận bằng cách đo đường kính vòng kháng khuẩn. Kháng sinh Ciprofloxacin ở nồng độ 5µg/ml được sử dụng là đối chứng dương và DMSO được dùng là đối chứng âm.

#### 2.2.5. Thử nghiệm khả năng hạn chế sự hỏng thối tươi của cao chiết

Cao chiết màng tang thu nhận theo 3 phương pháp ngâm, đun hồi lưu và siêu âm, sau khi đánh giá hoạt tính sinh học, lựa chọn cao chiết có hoạt tính cao nhất để đánh giá tác động lên một số chỉ tiêu của mẫu thịt. Thịt được cắt thành miếng đồng nhất có kích thước 2x3x5 cm và được nhúng vào các dung dịch trong 5 giây theo công thức: CT1 nước cất vô trùng, CT2 cao chiết màng tang 0,5%. Thịt sau khi nhúng các dung dịch được để ráo trên rổ nhựa khoảng 15 phút, sau đó xếp thịt vào khay xếp và được bọc lại bằng màng bọc thực phẩm PE. Các mẫu thịt sau xử lý và bao gói được đặt theo dõi trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Thịt được lấy phân tích vào ngày 7, đánh giá các chỉ tiêu:

Xác định pH theo TCVN 4835:2002 [15]. Định tính NH<sub>3</sub> bằng phương pháp dùng thuốc thử Eber (theo TCVN 3699: 1990) [16]. Định tính H<sub>2</sub>S bằng phản ứng màu với chì axetat (theo TCVN 3699: 1990) [16]. Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí theo TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013) [17]. Xác định chỉ số oxi hóa chất béo TBA theo Witte và cộng sự (1970) [18].

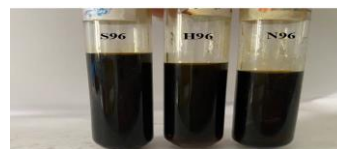
### 2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS, phân tích Anova với độ tin cậy 95%, các giá trị trung bình được so sánh bằng kiểm định Turkey.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Kết quả thu nhận cao chiết quả màng tang

Qua quá trình chiết xuất đã thu được cao chiết quả màng tang bằng phương pháp ngâm, đun hồi lưu và siêu âm với dung môi ethanol nồng độ 96%. Về cảm quan, các cao chiết thu được đều tương tự nhau, cụ thể đều có màu nâu sẫm, có mùi đặc trưng của tinh dầu quả màng tang (hình 2).



**Hình 2.** Cao chiết quả màng tang thu được từ các phương pháp khác nhau

Hiệu suất thu nhận cao chiết quả màng tang được trình bày tại bảng 1. Hiệu suất thu nhận cao chiết từ 10g bột nguyên liệu màng tang bằng các phương pháp chiết xuất là khác nhau ( $p < 0,05$ ). Cụ thể, phương pháp chiết xuất hỗ trợ siêu âm thu được khối lượng cao chiết lớn nhất trung bình gấp 1,31 lần phương pháp ngâm và gấp 1,21 lần phương pháp đun hồi lưu cũng như hiệu suất chiết trung bình là cao nhất 41,70%. Tuy nhiên, hiệu suất thu nhận cao chiết ở phương pháp đun hồi lưu và phương pháp ngâm khác biệt không có ý nghĩa thống kê; và phương pháp đun hồi lưu có xu hướng cao hơn phương pháp ngâm ( $34,38 \pm 2,21\%$  và  $31,77 \pm 1,76\%$ ).

**Bảng 1.** Hiệu suất thu nhận cao chiết quả màng tang

| Mẫu | Khối lượng (g)  |                   | Hiệu suất cao chiết(%) |
|-----|-----------------|-------------------|------------------------|
|     | Bột nguyên liệu | Cao chiết         |                        |
| S96 | 10,00           | $3,85 \pm 0,18^b$ | $41,68 \pm 1,98^b$     |
| H96 | 10,00           | $3,21 \pm 0,21^b$ | $34,67 \pm 2,17^a$     |
| N96 | 10,00           | $2,94 \pm 0,16^b$ | $31,77 \pm 1,76^a$     |

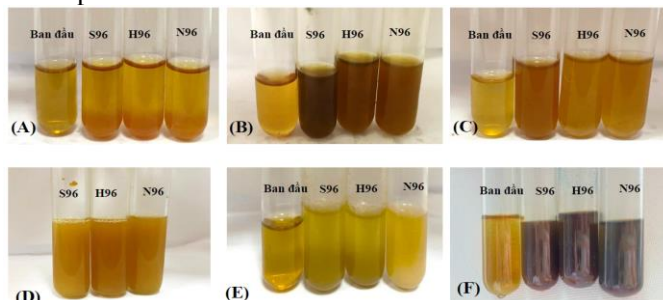
Kết quả ở bảng 1 cho thấy phương pháp ngâm (mẫu N96) hiệu suất chiết xuất là thấp nhất so với đun hồi lưu (H96) và siêu âm (S96). Nguyên nhân là do khi chiết xuất bằng phương pháp ngâm ở trạng thái tĩnh, mức độ phá vỡ thành vách tế bào thực vật là thấp hơn cũng như sự khuếch tán hỗn hợp dung môi - chất tan xảy ra với tốc độ chậm hơn so với hai phương pháp còn lại. Phương pháp chiết siêu âm có hiệu suất thu nhận cao chiết là lớn nhất do tác động của sóng siêu âm trong môi trường lỏng ở nhiệt độ 60°C sẽ tạo và nén các bọt khí. Khi các bọt khí nén, vỡ tạo ra áp lực làm phá vỡ cấu trúc tế bào, tăng sự khuếch tán của các chất nội bào vào dung môi [19]. Trong nghiên cứu này, hiệu suất thu nhận cao chiết bằng kỹ thuật siêu âm (S96, 41,70%, w/w) có kết quả tương đồng với nghiên cứu của Liu và cộng sự (2014) (41,35%, w/w) [4].

### 3.2. Xác định một số hợp chất thứ cấp trong các cao chiết

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, thành phần của cao chiết quả màng tang tương tự với các nghiên cứu về thành phần hóa học của Dalimunthe và cộng sự (2021) [8] khi có sự hiện diện của các



nhóm hợp chất flavonoid, polyphenol, alkaloid, saponin, steroid, tannin, glycoside (hình 3). Tuy nhiên, mẫu cao chiết xuất bằng phương pháp ngâm không phát hiện saponin. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Manurung và cộng sự (2015) [10] khi sử dụng phương pháp ngâm với dung môi ethanol để chiết xuất các hợp chất thứ cấp trong quả màng tang cho thấy, trong cao chiết màng tang có thành phần như alkaloid, flavonoid, tanin, steroid nhưng không có sự xuất hiện của nhóm hợp chất saponin.



**Hình 3.** Định tính một số hợp chất thứ cấp trong các cao chiết quả màng tang

A) Định tính alkaloid, (B) Định tính polyphenol, (C) Định tính flavonoid,  
(D) Định tính saponin, (E) Định tính tanin, (F) Định tính glycoside.

**Bảng 2.** Kết quả định tính một số hợp chất thứ cấp

| Nhóm chất             | N96 | H96 | S96 |
|-----------------------|-----|-----|-----|
| Flavonoid             | +   | +   | ++  |
| Polyphenol            | +   | +   | ++  |
| Saponin               | -   | +   | +   |
| Tanin                 | +   | +   | +   |
| Alkaloid              | ++  | ++  | ++  |
| Steroid/ triterpenoid | +   | +   | +   |
| Glycoside             | +   | ++  | ++  |

Ghi chú: (+++) Dương tính mạnh, (++) Dương tính vừa, (+) Dương tính yếu, (-) Không phát hiện

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, trong các hợp chất thứ cấp, polyphenol và flavonoid có vai trò quan trọng trong hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của thực vật [1]-[3], [20]. Vì vậy, trong nghiên cứu này hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số tiếp tục được xác định. Hàm lượng TPC với chất chuẩn là axit gallic có phương trình hồi quy tuyến tính  $y = 0,0122x - 0,0351$  ( $R^2=0,995$ ). Hàm lượng TFC từ chất chuẩn quercetin có phương trình hồi quy tuyến tính  $y = 0,0013x + 0,0495$  ( $R^2=0,9966$ ). Trên cơ sở đường chuẩn này, hàm lượng TPC và TFC của các cao chiết màng tang được trình bày ở Bảng 3. Trong các phương pháp khảo sát, phương pháp siêu âm cho khả năng thu hồi hợp chất polyphenol và flavonoid (276,38mgGAE/g và 72,53mgQE/g) cao hơn đáng kể so với chiết hồi lưu (241,94 mgGAE/g và 60,27 mgGAE/g) và phương pháp ngâm (178,40 mgGAE/g và 56,80 mgQE/g). Kết quả hàm lượng TPC của cao chiết tương tự với nghiên cứu của Dalimunthe và cộng sự (2021) [3] với hàm lượng TPC trong mẫu cao chiết quả màng tang là 282,93 mg GAE/g, tuy nhiên hàm lượng TFC trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn với 7,49 mgQE/g.

**Bảng 3.** Kết quả hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số

|     | TPC (mg GAE/g)            | TFC (mg QE/g)            |
|-----|---------------------------|--------------------------|
| N96 | 178,40±16,88 <sup>c</sup> | 56,80 ±3,42 <sup>b</sup> |
| H96 | 241,94±10,71 <sup>b</sup> | 60,27 ±3,84 <sup>b</sup> |
| S96 | 276,38±11,88 <sup>a</sup> | 72,53 ±6,43 <sup>a</sup> |

\*Chú thích: Các ký tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey.

Kết quả này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu chiết tách hợp chất polyphenol từ cỏ xạ hương (*Thymus serpyllum*) chiết xuất theo phương pháp siêu âm trong 5 phút cao hơn 64,3% và

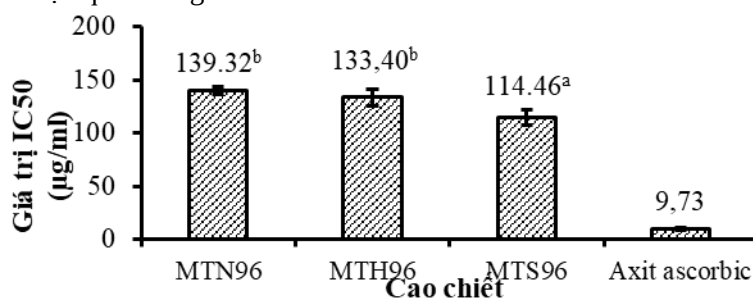
17,3% tương ứng so với phương pháp ngâm sau 60 phút và đun hồi lưu [21]. Pan và cộng sự (2012) [22] nghiên cứu chiết rút flavonoid từ hạt táo gai (hawthorn seed) cho thấy việc chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho hiệu suất thu hồi flavonoid cao hơn phương pháp chiết hồi lưu 1,32 lần.

### 3.3. Xác định một số hoạt tính sinh học của các cao chiết

#### 3.3.1. Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết quả mãng tang được đánh giá qua khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH, được thể hiện qua giá trị nồng độ của mẫu mà tại đó có thể ức chế 50% DPPH (Hình 4). Giá trị  $IC_{50}$  của cao chiết mãng tang trích ly theo phương pháp siêu âm, hồi lưu và ngâm lần lượt là 114,46  $\mu\text{g/ml}$ , 133,39  $\mu\text{g/ml}$  và 139,32  $\mu\text{g/ml}$ , thể hiện khả năng chống oxy hóa thấp hơn 11,76, 13,71 và 14,31 lần so với vitamin C.

Cao chiết theo kỹ thuật siêu âm cho khả năng chống oxy hóa cao hơn đáng kể so với phương pháp ngâm và đun hồi lưu (gấp 1,22 lần và 1,17 lần,  $p < 0,05$ ). Nghiên cứu của Gan và cộng sự (2010) [20] cho thấy mối tương quan cao giữa khả năng chống oxy hóa và TPC, TFC, cụ thể là các hợp chất polyphenol, flavonoid có thể đóng góp chính cho khả năng chống oxy hóa của cây. Cây có càng nhiều hợp chất polyphenol và flavonoid thì khả năng chống oxy hóa càng cao. Điều này cho thấy, trong cao chiết bằng kỹ thuật siêu âm có chứa hàm lượng polyphenol và flavonoid lớn hơn cao chiết tạo bằng phương pháp hồi lưu và ngâm (Bảng 3) nên có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn. Bên cạnh đó, giá trị  $IC_{50}$  trong nghiên cứu thấp hơn của tinh dầu mãng tang (190  $\mu\text{g/ml}$ ) [1]. Điều này, có thể do trong cao chiết toàn phần quả mãng tang có nhiều hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa như polyphenol, flavonoid, alkaloid, tanin... nên sự hiệp đồng giữa các hợp chất này cho hiệu quả chống oxy hóa cao hơn tinh dầu.



Hình 4. Giá trị làm giảm 50% DPPH ( $IC_{50}$ ) của các mẫu cao chiết

\*Ghi chú: Các ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey

#### 3.3.2. Hoạt tính kháng khuẩn

Kích thước vòng kháng khuẩn thu được khi thực hiện các thí nghiệm theo mô tả trong mục 2.2.3 nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết mãng tang 100 mg/ml đối với 3 loại vi khuẩn được thể hiện trong bảng 4, hình 5.

Bảng 4. Hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết quả mãng tang ở nồng độ 100 mg/ml

|               | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) |                        |                        |
|---------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|
|               | <i>B. subtilis</i>               | <i>B. cereus</i>       | <i>S. typhi</i>        |
| S96           | 16,8±0,5 <sup>bb</sup>           | 13,5±0,4 <sup>ba</sup> | 13,3±0,4 <sup>ca</sup> |
| H96           | 15,7±0,3 <sup>bc</sup>           | 13,8±0,3 <sup>ba</sup> | 12,8±0,6 <sup>ba</sup> |
| N96           | 13,9±0,5 <sup>ab</sup>           | 12,5±0,7 <sup>a</sup>  | 11,2±0,2 <sup>a</sup>  |
| DMSO          | 0                                | 0                      | 0                      |
| Ciprofloxacin | 17,5±0,8 <sup>ca</sup>           | 15,6±1,5 <sup>ca</sup> | 21,0±2,0 <sup>db</sup> |

Ghi chú: (<sup>a,b,c</sup>) Các số trong cùng một hàng trên cùng một nồng độ mang các chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$ ; (<sup>a,b,c</sup>) Các ký tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey.

Mẫu đối chứng âm DMSO không xuất hiện vòng kháng khuẩn đối với các vi khuẩn thử nghiệm. Kháng sinh Ciprofloxacin 5  $\mu\text{g/ml}$  có hoạt tính ức chế mạnh vi khuẩn *B. subtilis*, *B.*

*cereus*, *S. typhi* thể hiện ở đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 17,5 mm, 15,6 mm và 21 mm [23]. Kết quả tại bảng 3 cho thấy, cao chiết quả màng tang có khả năng ức chế sự phát triển của cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm ở nồng độ cao chiết 100 mg/ml. Trong 3 chủng vi khuẩn bị ức chế, đối với chủng *B. subtilis*, cao chiết có tác dụng kháng khuẩn mạnh hơn so với 2 chủng còn lại (đường kính vòng kháng khuẩn trung bình của cao chiết S96 là 15,8 mm).

Theo Dalimunthe và cộng sự (2021), sự thay đổi về hoạt tính sinh học của các cao chiết màng tang thu nhận bằng các phương pháp khác nhau là do sự khác biệt về thành phần, tỉ lệ cũng như hoạt tính riêng lẻ của từng hợp chất hóa học có trong cao chiết [8]. Trong nghiên cứu này, các cao chiết ethanol từ quả màng tang đều có hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với chủng vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Trong đó, cao chiết S96 có hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn cao chiết N96 và H96. Điều này là phù hợp với kết quả định tính hợp chất thứ cấp (Bảng 2), hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số (Bảng 3), cụ thể là cao chiết S96 chứa nhiều hợp chất sinh học và hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số cao hơn cao chiết N96 và H96.



**Hình 5.** Hoạt tính kháng vi khuẩn *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. typhi* của cao chiết màng tang  
1: Đối chứng âm DMSO; 2: Đối chứng dương Ciproflaxacin 5µg/ml;  
3: Cao chiết S96; 4: Cao chiết H96; 5: Cao chiết N96

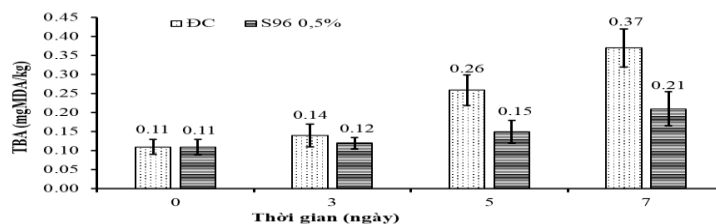
### 3.3.3. Đánh giá khả năng hạn chế sự hỏng thối tươi khi dự trữ lạnh trong 7 ngày

Thịt tươi là loại thực phẩm dễ bị hỏng do tác nhân vi sinh vật cũng như quá trình oxi hóa chất béo. Trong cao chiết toàn phần quả màng tang thu được từ các phương pháp, cao chiết bằng phương pháp chiết xuất hỗ trợ siêu âm (S96) có khả năng chống oxi hóa và kháng khuẩn tốt nhất. Vì vậy, cao chiết S96 tiếp tục được sử dụng để đánh giá khả năng hạn chế sự hỏng thối tươi ở điều kiện dự trữ lạnh trong 7 ngày.

#### 3.3.3.1. Mức độ oxi hóa chất béo (TBA) trên mẫu thịt lợn tươi trước và sau khi xử lý bề mặt bằng cao chiết màng tang S96

Kết quả theo dõi mức độ oxi hóa của các chất béo (TBA) trong các mẫu thịt cho thấy giá trị TBA tăng dần theo thời gian nghiên cứu, ở ngày thứ 3 giữa 2 công thức không có sự khác biệt. Đến ngày thứ 5, giá trị TBA giữa 2 công thức đã có sự khác biệt, mẫu đối chứng là 0,26 mgMDA/kg so với mẫu sử dụng cao chiết màng tang 0,5% là 0,15 mgMDA/kg (Hình 6). Giá trị TBA trung bình của mẫu đối chứng cao gấp 1,76 lần so với mẫu có bổ sung màng tang tại ngày thứ 7.

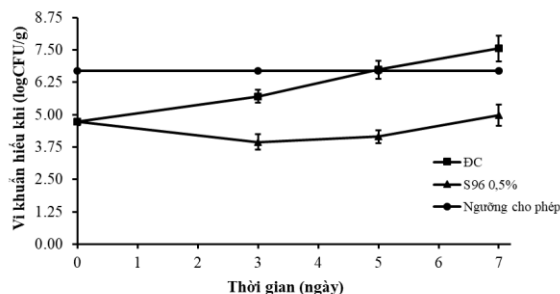
Mức độ oxi hóa lipid của thịt có xử lý bằng cao chiết quả màng tang thấp hơn so với đối chứng, nguyên nhân có thể do khi nhúng với dung dịch màng tang, màng tang có vai trò như lớp phủ, tạo ra một rào cản vận chuyển oxi dẫn đến các mẫu. Kết quả cho thấy giá trị TBA thấp hơn so với đối chứng. Như vậy, việc bổ sung cao chiết màng tang đã có hiệu quả tích cực tới việc làm giảm quá trình oxi hóa chất béo của thịt theo thời gian.



**Hình 6.** Chỉ số oxi hóa chất béo của các mẫu thịt lợn

### 3.3.3.2. Tổng số vi khuẩn hiếu khí trên mẫu thịt lợn trước và sau khi xử lý bề mặt bằng cao chiết màng tang S96

Tổng số vi khuẩn hiếu khí trên mẫu thịt lợn trước và sau khi xử lý bề mặt bằng cao chiết màng tang S96 được thể hiện trong hình 7.



**Hình 7.** Tổng số vi khuẩn hiếu khí trên mẫu thịt lợn tươi theo thời gian

Số lượng tổng vi khuẩn hiếu khí trong các mẫu thịt có xu hướng tăng dần theo thời gian. Ở điều kiện nhiệt độ 4°C, sau 3 ngày, 2 mẫu thịt có và không xử lý cao chiết màng tang có lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí đều ở dưới ngưỡng cho phép. Tại ngày thứ 5, mẫu đối chứng đã vượt ngưỡng cho phép ( $\text{Log}(\text{CFU/g}) = 6,73$ ). Trong khi đó, ở mẫu thịt xử lý cao chiết màng tang, lượng vi khuẩn hiếu khí ( $\text{Log}(\text{CFU/g}) = 4,97$ ) vẫn đạt theo TCVN 7046:2019 tại ngày thứ 7 [24].

### 3.3.3.3. Xác định một số chỉ tiêu hóa lý của mẫu thịt trước và sau khi xử lý bề mặt bằng cao chiết màng tang S96

Kết quả Bảng 5 cho thấy giá trị pH các mẫu thịt xử lý bằng cao chiết trong 7 ngày gần như không thay đổi và nằm trong khoảng pH = 5,5 - 6,2 và không có sự khác nhau giữa 2 công thức ( $p > 0,05$ ). Bên cạnh đó, mẫu thịt đối chứng không xử lý cao chiết tại ngày thứ 7 xuất hiện phản ứng dương tính yếu với  $\text{H}_2\text{S}$  và  $\text{NH}_3$  (hình 8), trong khi đó mẫu thịt xử lý với cao chiết màng tang có kết quả âm tính.

**Bảng 5.** Kết quả một số chỉ tiêu chất lượng thịt tươi trong 7 ngày

| Mẫu thịt  | pH                | $\text{H}_2\text{S}$ | $\text{NH}_3$ |
|-----------|-------------------|----------------------|---------------|
| Đối chứng | $5,78 \pm 0,03^a$ | (+)                  | (+)           |
| S96 0,5%  | $5,72 \pm 0,04^a$ | (-)                  | (-)           |

\*Chú thích: Các ký tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey.

Mẫu thịt

Định tính  $\text{NH}_3$

Định tính  $\text{H}_2\text{S}$

Đối chứng



S96 0,5%



**Hình 8.** Kết quả định tính  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  của mẫu thịt xử lý bằng cao chiết S96 so với mẫu đối chứng

Xu hướng khác biệt giữa 2 nhóm về một số chỉ tiêu hóa lý (bảng 5) là phù hợp với kết quả về tổng số vi sinh vật hiếu khí (hình 6) và mức độ chống oxy hóa (hình 7) của mẫu thịt được xử lý bằng cao chiết màng tang S96 so với nhóm đối chứng. Kết quả thu được cho thấy cao chiết S96 có khả năng hạn chế sự hỏng thịt nhờ khả năng kháng khuẩn và chống oxy hóa chất béo.



#### 4. Kết luận và kiến nghị

##### 4.1. Kết luận

- Nghiên cứu đã chiết xuất và đánh giá hiệu suất thu nhận cao chiết quả màng tang theo phương pháp chiết xuất hỗ trợ siêu âm, hồi lưu hoặc ngâm. Trong ba phương pháp, chiết xuất hỗ trợ siêu âm (S96, hiệu suất 41,68%) cho hiệu suất thu nhận là cao nhất, sau đó là đun hồi lưu (H96, 34,67%) và thấp nhất là ngâm (N96, 31,77%).

- Kết quả đã xác định sơ bộ thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các cao chiết toàn phần từ quả màng tang. Trong đó, cao S96 có hàm lượng TFC (72,53 mg QE/g) và TPC (276,38 mg GAE/g) với hoạt tính chống oxy hóa là cao nhất (giá trị  $IC_{50}$  là 114,46  $\mu$ g/ml) và hoạt tính kháng khuẩn (đường kính vòng kháng khuẩn ở các vi khuẩn *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. typhi* lần lượt là  $16,8 \pm 0,5$  mm;  $13,5 \pm 0,4$  mm;  $13,3 \pm 0,4$  mm) là mạnh nhất; ở nồng độ 0,5% (w/w), cao chiết S96 có khả năng hạn chế sự hồng thối qua khả năng ức chế vi khuẩn hiếu khí và chống oxy hóa chất béo khi dự trữ lạnh (7 ngày, 0- 4°C).

##### 4.2. Kiến nghị

- Tiếp tục định lượng các thành phần khác có trong cao chiết toàn phần của quả màng tang.
- Đánh giá độc tính của các cao chiết toàn phần từ quả màng tang để làm cơ sở định hướng cho nghiên cứu ứng dụng.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Công thương mã số 080.2021.ĐT.BO/HĐKHCN.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Y. Wang, Z.-T. Jiang, and R. Li, "Antioxidant Activity, Free Radical Scavenging Potential and Chemical Composition of *Litsea cubeba* Essential Oil," *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 15, no. 1, pp. 134-143, 2012.
- [2] X. Wang, M. Gao, L. Wu, Y. Zhao, Y. Wang, and Y. Chen, "Antimicrobial activity of essential oils extracted from *Litsea cubeba*," *Forestry Research*, vol. 2, no. 1, pp. 1-9, 2022.
- [3] A. Dalimunthe, D. Pertiwi, M. Muhammad, and D. Satria, "Analysis of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of *Litsea cubeba* Lour. Bark," *E3S Web of Conferences*, vol. 332, p. 08005, 2021.
- [4] Z. R. Liu, Y. F. Zhang, Y. G. Bi, and H. L. Li, "Study on Extraction Process of Technics of *Litsea Cubeba* Oil," *Applied Mechanics and Materials*, vol. 602-605, pp. 81-85, 2014.
- [5] V. D. Doan et al., "Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using *Litsea cubeba* Fruit Extract for Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2020, pp. 1-10, 2020.
- [6] Y. Li, X. Zhuang, X. Wu, C. Qiu, and Y. Wang, "Sustainable Valorization of *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. Residue as the New Lauric Oil Source Using Alternative Green Extraction and Refining Methods," *Foods*, vol. 11, no. 14, p. 2047, 2022.
- [7] C. Sun, J. Li, D. Wang, J. Yu, X. Wang, and L. Huang, "Preparative separation of alkaloids from *Litsea cubeba* using combined applications of pH-zone-refining and high-speed counter-current chromatography," *RSC Advances*, vol. 5, no. 92, pp. 75831-75837, 2015.
- [8] A. Dalimunthe, P. A. Z. Hasibuan, M. Fujiko, Masfria, and D. Satria, "Phytochemicals Analysis And Cell Cycle Arrest Activity of Ethanol Extract of *Litsea cubeba* Lour. Fruits Towards MCF-7/HER-2 Cell Line," *Rasayan Journal of Chemistry*, vol. 14, no. 1, pp. 16-18, 2021.
- [9] T. T. Jamir, P. L. Konyak, and A. Kichu, "A preliminary phytochemical analysis of a medicinal plant *Litsea cubeba* found in Kohima district, Nagaland India," *Journal of Medicinal Plants Studies*, vol. 9, no. 1, pp. 21-24, 2021.
- [10] H. Manurung, R. A. Nugroho, and E. Marina, "Phytochemical screening and antibacterial activity of leaves extract Balangla (*Litsea cubeba* (Lour) Pers.) from Malinau, East Borneo," *Proceedings of the 5th International Seminar on New Paradigm and Innovation on Natural Sciences and Its Application*, 2015, p. 7.

- 
- [11] L. Othman, A. Sleiman, and R. M. Abdel-Massih, "Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants," *Front Microbiol*, vol. 10, p. 911, 2019.
- [12] G. C. Bag, P. G. Devi, and T. Bhaigyabati, "Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley," *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 30, no. 1, pp. 154-159, 2015.
- [13] K. Hara, T. Someya, K. Sano, Y. Sagane, T. Watanabe, and R. G. S. Wijesekara, "Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay," *Data Brief*, vol. 17, pp. 870-875, Apr. 2018.
- [14] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method," *Tech Bull Regist Med Technol*, vol. 36, no. 3, pp. 49-52, March 1966.
- [15] Technical Standard 4835:2002, "Meat and meat products - Measurement of pH - Reference method," 2002.
- [16] Technical Standard 3699:1990, "Aquatic products - Qualitative test for hydrogen sulfide and ammonia," 1990.
- [17] Technical Standard 4833-1:2013, "Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique," 2013.
- [18] V. C. Witte, G. F. Krause, and M. E. Bailey, "A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage," *Journal of Food Science*, vol. 35, pp. 582-585, 1970.
- [19] T. S. Awad, H. A. Moharram *et al.*, "Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review," *Food Research International*, vol. 48, no. 2, pp. 410-427, 2012.
- [20] R. Y. Gan, X. R. Xu, F. L. Song, L. Kuang, and H. B. Li, "Antioxidant activity and total phenolic content of medicinal plants associated with prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 4, no. 22, pp. 2438-2444, 2010.
- [21] A. A. Jovanović *et al.*, "Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques," *Separation and Purification Technology*, vol. 179, pp. 369-380, 2017.
- [22] G. Pan, G. Yu, C. Zhu, and J. Qiao, "Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS)," *Ultrason Sonochem*, vol. 19, no. 3, pp. 486-90, May 2012.
- [23] D. P. Mohapatra, V. Thakur, and S. K. Brar, "Antibacterial efficacy of raw and processed honey," *Biotechnol Res Int*, vol. 2011, 2011, Art. no. 917505.
- [24] Technical Standard 7046:2019, *Fresh meat*, 2019.