

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM LEAVE OF *GAULTHERIA SLEUMERI* SMITINAND & P.H.HỒ

Hoang Thi Binh*, Nguyen Van Phuc, Nguyen Van Ngoc

Dalat University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 19/7/2023	In this study, the chemical composition of essential oils extracted from the leaves of <i>Gaultheria sleumeri</i> Smitinand & P.H.(Benth.) in Vietnam was analyzed, and their biological activities were evaluated. The essential oils were obtained through hydro-distillation of <i>G. sleumeri</i> leaves and subsequently analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results revealed that the essential oil primarily consisted of two constituents: methyl salicylate (99.92%) and eugenol (0.08%). To assess the antimicrobial activity of the essential oil, the agar well diffusion method was employed. The results demonstrated that the essential oil exhibited significant activity against two bacterial strains comprising <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> , and a pathogenic yeast (<i>Candida albicans</i>) at the different concentrations of essential oils. This study provided valuable insights into the chemical composition and biological activities of essential oils derived from <i>G. sleumeri</i> leaves in Vietnam.
Revised: 15/8/2023	
Published: 18/8/2023	
KEYWORDS	
Antimicrobial activity	
Bach Chau Da Lat	
Da Lat	
Essential oil	
<i>Gaultheria sleumeri</i>	

THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT CỦA TINH DẦU LÁ LOÀI BẠCH CHÂU ĐÀ LẠT (*GAULTHERIA SLEUMERI* SMITINAND & P.H.HỒ)

Hoàng Thị Bình*, Nguyễn Văn Phúc, Nguyễn Văn Ngọc

Trường Đại học Đà Lạt

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 19/7/2023	Trong nghiên cứu này, thành phần hóa học của tinh dầu chiết xuất từ lá loài <i>Gaultheria sleumeri</i> Smitinand & P.H.(Benth.) ở Việt Nam đã được phân tích và đánh giá hoạt tính sinh học của chúng. Tinh dầu lá loài <i>G. sleumeri</i> thu được thông qua quá trình chưng cất lôi cuốn hơi nước, sau đó phân tích thành phần bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC-MS). Kết quả cho thấy, tinh dầu chủ yếu bao gồm hai thành phần: methyl salicylate (99,92%) và eugenol (0,08%). Để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu, phương pháp khuếch tán giếng thạch được sử dụng trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, tinh dầu loài này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật chống lại hai chủng vi khuẩn bao gồm <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> và một loại nấm men gây bệnh (<i>Candida albicans</i>) ở các nồng độ khác nhau. Nghiên cứu cung cấp những hiểu biết có giá trị về thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu chiết xuất từ lá loài <i>G. sleumeri</i> ở Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 15/8/2023	
Ngày đăng: 18/8/2023	
TỪ KHÓA	
Kháng vi sinh vật	
Bạch châu Đà Lạt	
Đà Lạt	
Tinh dầu	
<i>Gaultheria sleumeri</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8356>

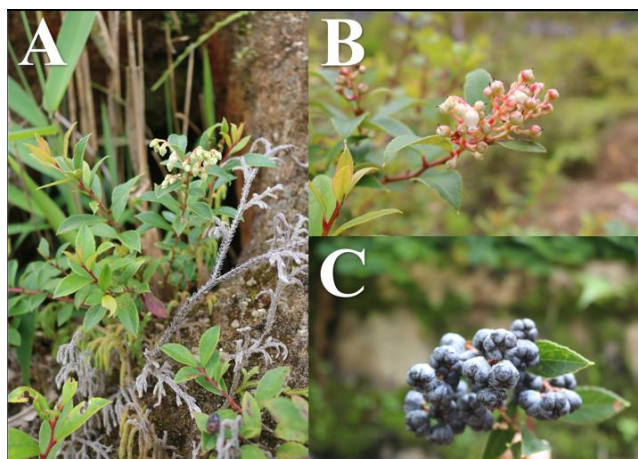
* Corresponding author. Email: binhht@dlu.edu.vn

1. Giới thiệu

Chi *Gaultheria*, thuộc họ Đỗ Quyên (Ericaceae), bao gồm khoảng 135 loài được ghi nhận phân bố trên toàn thế giới, chủ yếu được tìm thấy ở các vùng ôn đới và nhiệt đới của Châu Mỹ, Úc, Đông và Đông Nam Á [1]. Các loài thuộc chi *Gaultheria* thường là cây bụi thường xanh, có quả nang, có điểm tương đồng về mặt phân loại học với chi *Vaccinium* [2], [3]. Từ xưa, các loài thuộc chi *Gaultheria* đã được con người sử dụng rộng rãi làm thực phẩm và làm thuốc, đặc biệt là ở Trung Quốc. Một số loài trong chi này có hoạt tính sinh học cao như hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và gây độc tế bào [2], [4]. Những đặc tính chữa bệnh này chủ yếu do tinh dầu thu từ những loài thuộc chi *Gaultheria*, thường được gọi là tinh dầu lộc đề xanh [3].

Tinh dầu lộc đề xanh được biết đến là tinh dầu thu được từ lá của các loài thuộc chi *Gaultheria* thông qua quá trình chưng cất bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước, với nồng độ methyl salicylate rất cao (ví dụ như tinh dầu thu từ lá loài *G. procumbens* và *G. aromaissima* có hàm lượng methyl salicylate lần lượt là 96,90% và 94,16%) [5]-[7]. Methyl salicylate là metyl este của salicylic acid và có mùi trái cây ngọt ngào gợi nhớ đến mùi bạc hà, được sử dụng để điều trị đau và sốt, cũng như có đặc tính kháng khuẩn và chống viêm [2], [3], [6], [8]. Do có nhiều đặc tính có lợi, tinh dầu lộc đề xanh được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp hương liệu và dược phẩm, có giá trị thương mại cao ở nhiều quốc gia [9].

Ở Việt Nam, có 6 loài thuộc chi *Gaultheria* được ghi nhận gồm *G. leucocarpa*, *G. fragrantissima*, *G. sleumeri*, *G. semi-infera*, *G. prostrata*, *G. longibracteolata* [10], [11]. Trong đó, loài *Gaultheria sleumeri* Smitinand & P.H.Hô hay còn gọi là Bạch châu Đà Lạt hoặc Gan tiền sleumer được ghi nhận chỉ phân bố ở khu vực Đà Lạt [11]. Theo mô tả của Phạm Hoàng Hộ và Smitinand năm 1987, *G. sleumeri* là cây bụi thường xanh, thân mọc thẳng, lá xếp vòng xoắn, có cuống; phiến lá có răng cưa hoặc hiếm khi nguyên, tròng hoa màu trắng; về mặt thực vật, nó thuộc nhóm quả nang [11] (Hình 1). Mặc dù thành phần hóa học của một số loài trong chi *Gaultheria* phân bố ở Serbia, Trung Quốc đã được nghiên cứu [3], [6], hiện nay vẫn chưa có báo cáo nào về thành phần hoá học cũng như hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu thu từ lá các loài thuộc chi *Gaultheria* ở Việt Nam. Do đó, nghiên cứu này thực hiện nhằm đánh giá thành phần hoá học và hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu loài *Gaultheria sleumeri* Smitinand & P.H.Hô.



Hình 1. *Gaultheria sleumeri* Smitinand & P.H.Hô. (A) Cây trưởng thành, (B) Cụm Hoa, (C) Chùm quả chín (Hình: Nguyễn Văn Phúc)

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu này là cành và lá loài Bạch châu Đà Lạt (*Gaultheria sleumeri* Smitinand & P.H.Hô.) thu vào tháng 10/2021 tại khu vực Cổng Trời thuộc huyện Lạc

Dương, Lâm Đồng. Kí hiệu tiêu bản mẫu là LD35, được định danh bởi TS. Nguyễn Văn Ngọc và được lưu giữ tại Bảo tàng thực vật của Trường Đại học Đà Lạt (DLU).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chứng cất tinh dầu

Tinh dầu được chưng cất từ lá tươi của cây Bạch châu Đà Lạt bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước [12]. Tinh dầu sau khi thu được được làm khan bằng Na_2SO_4 và giữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C.

2.2.2. Xác định hàm lượng và thành phần tinh dầu

Xác định hàm lượng tinh dầu theo công thức:

Hàm lượng tinh dầu = thể tích tinh dầu (ml) / khối lượng mẫu (g)

Thành phần hoá học của tinh dầu được xác định bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (Gas chromatography– mass spectrometry: GC-MS). Trong đó, điều kiện thực hiện sắc ký cụ thể như sau:

Thiết bị: Thermo scientific ISQ 7000 single Quad w/Trane 1310 GC-MS Cột: Agilent DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μm)

Nhiệt độ MS tranferline: 220°C

Nhiệt độ Ion source: 29-650 amu

Chương trình nhiệt: 70°C (1 phút) => 12°C/phút => 280°C (10 phút)

Nhiệt độ inlet: 220°C

Tốc độ dòng: 1,2ml/phút

Khí mang: He

Thể tích tiêm: 1 μl

Chuẩn bị mẫu: Hòa tan 20 μl tinh dầu Bạch châu Đà Lạt trong methanol và định mức thành 1ml bằng methanol.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu

Phương pháp khuếch tán giếng thạch [13] được sử dụng trong nghiên cứu này để đánh giá hoạt tính kháng 3 chủng vi sinh vật được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc tại thành phố Hồ Chí Minh và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam bao gồm: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 và *Candida albicans*. Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường LB (Luria-Bertani) có điều chỉnh (môi trường LB: 1% tryptone, 0,5% chiết xuất men, 0,5% NaCl; được sửa đổi với 1,5% agar cho môi trường rắn và 0,01% Tween 20 để hỗ trợ sự khuếch tán của tinh dầu vào môi trường tăng trưởng). Tinh dầu được pha loãng với nước cất và 0,01% Tween 20 đến các nồng độ khác nhau (20%, 40%, 60%, 80% và 100%). Giữa các đĩa thạch đã cấy trải vi sinh vật sẽ được đục các lỗ thạch (giếng thạch) có đường kính 6 mm. Sau đó, hút 25 μL tinh dầu ở các nồng độ khác nhau, đối chứng âm (nước cất và 0,01 % Tween 20) và đối chứng dương (kháng sinh amoxicillin 500 mg của Công ty cổ phần xuất nhập khẩu y tế Domesco, Việt Nam) bổ sung vào các giếng trên đĩa thạch đã trải vi sinh vật. Ở các đĩa này ở điều kiện 4°C trong 2 giờ để mẫu khuếch tán, sau đó tiếp tục ủ ở điều kiện 30°C trong 24 giờ. Đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK) sau đó được đo và ghi lại. Phép đo cuối cùng của ĐKVVK của mỗi mẫu thử được tính trung bình và độ lệch chuẩn với 3 lần thí nghiệm lặp lại cho mỗi mẫu thử.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hàm lượng và thành phần hoá học của tinh dầu thu từ lá loài Bạch châu Đà Lạt

Hàm lượng tinh dầu thu từ lá tươi của loài Bạch châu Đà Lạt (*Gaultheria sleumeri* Smitinand & P.H.Hô) là 1,08%. Tinh dầu Bạch châu Đà Lạt có màu trắng được thể hiện ở hình 2, có mùi đặc trưng của methyl salicylate.



Hình 2. Sự tách chiết tinh dầu từ lá loài Bạch châu Đà Lạt và tinh dầu của loài này

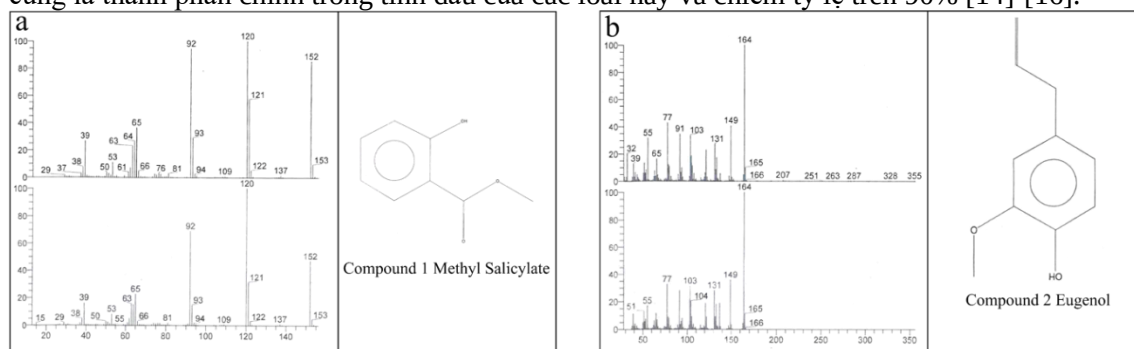
Thành phần hoá học của tinh dầu thu từ lá tươi loài Bạch châu Đà Lạt phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ được thể hiện ở bảng 1 và hình 3a, b.

Bảng 1. Thành phần hoá học của tinh dầu loài Bạch châu Đà Lạt

STT	RT	Hợp chất	Hàm lượng (%)
1	6,40	Methyl salicylate	99,92
2	9,33	Eugenol	0,08

Ghi chú: RT là thời gian lưu

Kết quả phân tích cho thấy, tinh dầu loài Bạch châu Đà Lạt thu bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước có chứa 2 hợp chất bao gồm methyl salicylate chiếm 99,92% và eugenol chiếm 0,08%. Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây về thành phần tinh dầu của các loài thuộc chi *Gaultheria* trên thế giới. Theo các nghiên cứu trước đây về thành phần hoá học của tinh dầu loài *G. procumbens*, *G. yunnanensis* và *G. fragrantissima* thì methyl salicylate cũng là thành phần chính trong tinh dầu của các loài này và chiếm tỷ lệ trên 90% [14]-[16].



Hình 3. Thành phần hoá học tinh dầu Bạch châu Đà Lạt: (a) Methyl salicylate và (b) Eugenol

Methyl salicylate (hình 3a) là một hợp chất hữu cơ có hoạt tính giảm đau bên ngoài, có mùi thơm, do đó chất này được sử dụng rộng rãi trong y học, công nghiệp, nông nghiệp, thực phẩm (dùng làm chất tạo hương vị trong các sản phẩm như bánh, kẹo, siro, đồ uống... [17]. Tuy nhiên, nếu sử dụng methyl salicylate với liều lượng 4 ml và 6 ml thì nó có thể gây tử vong cho trẻ em và người lớn [18].

Hợp chất eugenol (hình 3b) là một hydroxyphenyl propene được tìm thấy trong các loài thuộc họ hoa môi (Lamiaceae), họ long não (Lauraceae) v.v... [19]. Theo các nghiên cứu trước đây, eugenol đã được chứng minh là có đặc tính kháng khuẩn mạnh, bao gồm các đặc tính diệt nấm, diệt khuẩn, giảm đau, chống oxy hóa và chống viêm, cũng như diệt côn trùng [20], [21]. Eugenol có vị cay, mùi phenolic mạnh [22] và đã được sử dụng rộng rãi trong y học như dùng trong nha khoa vì chất này có đặc tính giảm đau tốt [23].

Như vậy, hai hợp chất có trong tinh dầu loài Bạch châu Đà Lạt cho thấy tiềm năng khai thác, sử dụng và phát triển loài này cho ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm, nông nghiệp cho địa phương trong tương lai.

3.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu lá Bạch châu Đà Lạt

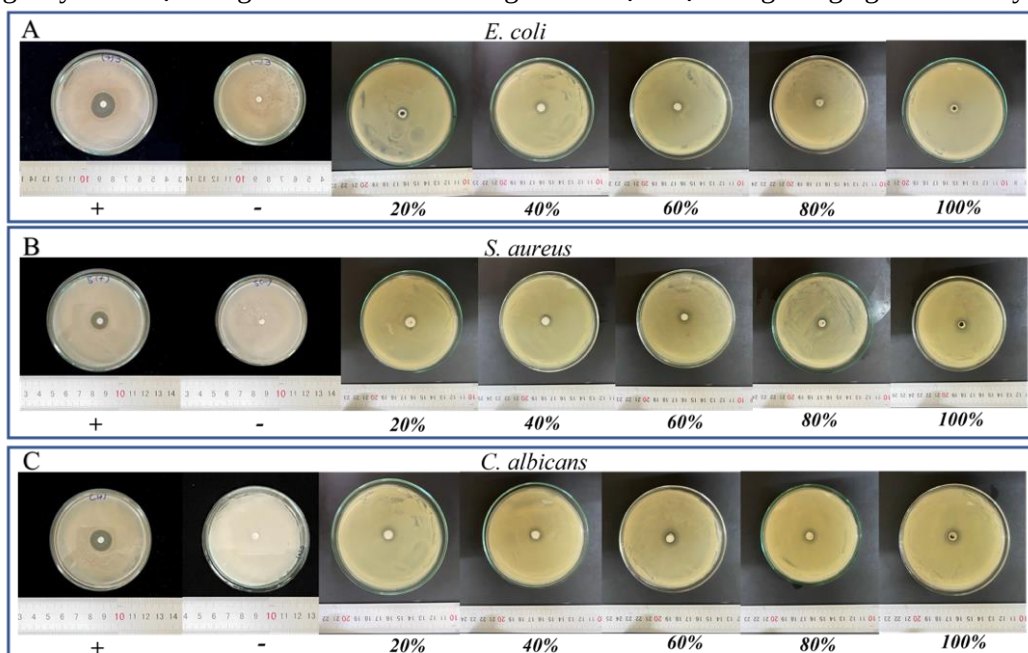
Trong nghiên cứu này, kết quả kiểm tra hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu lá Bạch châu Đà Lạt bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch được thể hiện ở bảng 2 và hình 4.

Bảng 2. Hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu lá Bạch châu Đà Lạt

Vi sinh vật	Amoxicillin (0,5 mg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)					
		Nồng độ tinh dầu (% trong Tween 20 (0,01%))					
		Tween 20 (0,01%)	100%	80%	60%	40%	20%
<i>E. coli</i>	33,3 ± 0,6	-	13,3 ± 0,6 ^b	11,0 ± 1,0 ^c	8,8 ± 0,3 ^b	6,7 ± 0,6 ^a	6,0 ± 0,5 ^c
<i>S. aureus</i>	31,7 ± 0,6	-	10,3 ± 0,6 ^c	8,5 ± 0,5 ^b	7,5 ± 0,5 ^c	6,3 ± 0,3 ^a	4,7 ± 0,3 ^c
<i>C. albicans</i>	29,7 ± 1,5	-	11,3 ± 0,6 ^c	9,2 ± 0,6 ^b	8,3 ± 0,6 ^b	7,3 ± 0,6 ^c	5,0 ± 0,5 ^a

Ghi chú: “-” không kháng. Amoxicillin là đối chứng dương và Tween 20 (0,01%) là đối chứng âm. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được thể hiện thông qua các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng.

Bảng 2 chỉ ra rằng, ba chủng vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu này đều bị ức chế bởi tinh dầu lá Bạch châu Đà Lạt ở cả năm nồng độ thử nghiệm và đối chứng dương. Trong đó, đối chứng dương là amoxicillin cho ĐKVVK cao nhất đối với cả 3 chủng vi sinh vật thử nghiệm, cụ thể 33,3 mm đối với chủng *E. coli*; 31,7 mm đối với chủng *S. aureus* và 29,7 mm đối với nấm *C. albicans*. Ngược lại, các nghiệm thức thí nghiệm có bổ sung đối chứng âm là Tween 20 (0,01%) thì không thấy xuất hiện vòng vô khuẩn ở cả 3 chủng vi sinh vật được dùng trong nghiên cứu này.



Hình 4. Hoạt tính kháng 3 chủng vi sinh vật của tinh dầu lá Bạch châu Đà Lạt ở các nồng độ pha loãng khác nhau: **A** - *E. coli*, **B** - *S. aureus*, **C** - *C. albicans*

Đối với các nồng độ tinh dầu khác nhau thì ĐKVVK có xu hướng giảm dần theo nồng độ pha loãng của tinh dầu khảo sát ở cả 3 chủng vi sinh vật thử nghiệm. Cụ thể, đối với chủng *E. coli* ở nồng độ tinh dầu 100% cho ĐKVVK lớn nhất (13,3 ± 0,6 mm) và nồng độ 20% cho ĐKVVK là nhỏ nhất (6,0 ± 0,5 mm). *E. coli* là nhóm vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy và là đối tượng gây bệnh do thực phẩm [24, [25]. Tinh dầu lá bạch châu Đà Lạt cho thấy khả năng kháng *E. coli* rõ rệt, đặc

biệt là ở nồng độ 100%. Theo các nghiên cứu trước đây, tinh dầu của loài *G. procumbens* và *G. longibractolata* cũng có khả năng kháng *E. coli* [3], [6], [7]. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn *E. coli* của tinh dầu lá Bạch châu Đà Lạt đã bổ sung thêm loài thuộc chi *Gaultheria* có khả năng kháng được chủng vi khuẩn này.

Đối với chủng *S. aureus* ĐKVVK lớn nhất là $10,3 \pm 0,6$ mm ở nồng độ 100% và nhỏ nhất là $4,7 \pm 0,3$ mm ở nồng độ 20%. *S. aureus* là loại vi khuẩn có thể gây ra nhiều loại bệnh nhiễm trùng liên quan đến da và mô mềm, gây ra tỷ lệ mắc bệnh và tử vong cao [26]. Một nghiên cứu đã cho thấy methyl salicylate tinh khiết có khả năng kháng *S. aureus* kém [3], nhưng kết quả nghiên cứu này cho thấy tinh dầu của loài bạch châu Đà Lạt có khả năng kháng *S. aureus*, điều này có thể là do thành phần eugenol có trong tinh dầu loài này. Đây là một hợp chất có khả năng kháng khuẩn tốt [27] và tính kháng của tinh dầu Bạch châu trong trường hợp này có thể là do tác dụng hiệp đồng của methyl salicylate và eugenol.

Tinh dầu Bạch châu Đà Lạt cũng thể hiện tính kháng đối với chủng nấm *C. albicans* ở nồng độ 100% cho ĐKVVK lớn nhất ($11,3 \pm 0,6$ mm) và nhỏ nhất ở nồng độ 20% ($5,0 \pm 0,5$ mm). *C. albicans* là một loại nấm men gây bệnh cơ hội và là tác nhân chính gây nhiễm trùng cơ hội ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch và bệnh nan y ở khoang miệng [28]. Kết quả cho thấy tinh dầu *G. sleumeri* có khả năng kháng *C. albicans*. Các nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng tinh dầu của loài *G. procumbens* cũng thể hiện tính kháng tương tự [6]. Khả năng kháng nấm *C. albicans* của loài này cho thấy nó là một loại tinh dầu tiềm năng để sử dụng trong điều trị các bệnh về khoang miệng.

Các kết quả về hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu lá Bạch châu Đà Lạt cho thấy đây là loài có tiềm năng để khai thác và sử dụng trong các lĩnh vực như y học, công nghiệp thực phẩm, nông nghiệp ở địa phương.

4. Kết luận

Tinh dầu từ lá loài Bạch châu Đà Lạt (*Gaultheria sleumeri*) thu được bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước đạt hiệu suất 1,08%. Phân tích GC/MS cho thấy thành phần chính của tinh dầu là methyl salicylate chiếm 99,92%, và một thành phần khác là eugenol chiếm 0,08%. Tinh dầu của loài này cũng đã được chứng minh là có khả năng chống lại ba chủng vi sinh vật thử nghiệm bao gồm *E. coli*, *S. aureus* và *C. albicans* ở tất cả các nồng độ pha loãng được dùng trong thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ môi trường thiên nhiên Nagao (Nagao Natural Environment Foundation – NEF, năm 2020-2021).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] M. Mukhopadhyay, P. Bantawa, T. K. Mondal, and S. K. Nandi, "Biological and phylogenetic advancements of *Gaultheria fragrantissima*: Economically important oil-bearing medicinal plant," *Industrial Crops and Products*, vol. 81, pp. 91-99, 2016.
- [2] B. S. Luo, R. H. Gu, E. J. Kennelly, and C. L. Long, "*Gaultheria* ethnobotany and bioactivity: Blueberry relatives with anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer constituents," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 25, no. 38, pp. 5168-5176, 2018.
- [3] B. Luo, E. Kastrat, T. Morcol, H. Cheng, E. Kennelly, and C. Long, "*Gaultheria longibracteolata*, an alternative source of wintergreen oil," *Food Chemistry*, vol. 342, 2021, Art. no. 128244.
- [4] Y. H. Wang, L. Lu, Y. H. Wang, and H. Wang, "The survey of plant germplasm resources and evaluation of application on Chinese *Gaultheria*," *J. Yunnan Univ*, vol. 35, pp. 378-389, 2013.
- [5] F. M. Salleh, T. S. Anuar, A. M. Yasin, and N. Moktar, "Wintergreen oil: a novel method in Wheatley's trichrome staining technique," *Journal of microbiological methods*, vol. 91, no. 1, pp. 174-178, 2012.
- [6] M. Nikolić, T. Marković, M. Mojović, B. Pejin, A. Savić, T. Perić, and M. Soković, "Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil," *Industrial crops and products*, vol. 49, pp. 561-567, 2013.

- [7] S. Joshi and P. C. Subedi, "Phytochemical and biological studies on essential oil and leaf extracts of *Gaultheria fragrantissima* Wall.," *Nepal Journal of Science and Technology*, vol. 14, no. 2, pp. 59-64, 2013.
- [8] P. Aruna, K. Murugan, A. Priya, and S. Ramesh, "Larvicidal, pupicidal and repellent activities of *Gaultheria* oil (Plantae: Ericaceae) against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Insecta: Diptera: Culicidae)," *Journal of Ethnology and Zoology Studies*, vol. 2014, no. 2, pp. 290-294, 2014.
- [9] B. P. Pandey, R. Thapa, and A. Upreti, "Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Artemisia vulgaris* and *Gaultheria fragrantissima* collected from Nepal," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 10, no. 10, pp. 952-959, 2017.
- [10] T. T. H. Nguyen and T. H. Nguyen, "*Gaultheria longibracteolata* RC Fang (Ericaceae Juss.) a new record species for the flora of Vietnam," *Academia Journal of Biology*, vol. 34, no. 2, pp. 201-203, 2012.
- [11] H. H. Pham, *An illustrated flora of Vietnam*. Young Publishing House, Ho Chi Minh City, 1999, vol. 1, pp. 628-629.
- [12] T. B. Hoang, M. T. Nguyen, H. Q. Nguyen, and V. N. Nguyen, "Antibacterial activities and chemical composition of essential oil of *Blumea balsamifera* (L.) DC distributed in Lamdong Province, Vietnam," *Dalat Journal of Science*, vol. 10, no. 2, pp. 3-13, 2020.
- [13] N. G. Heatley, "A method for the assay of penicillin," *Biochemical Journal*, vol. 38, no. 1, p. 61, 1944.
- [14] D. M. Ribnicky, A. Poulev, and I. Raskin, "The determination of salicylates in *Gaultheria procumbens* for use as a natural aspirin alternative," *Journal of nutraceuticals, functional & medical foods*, vol. 4, no. 1, pp. 39-52, 2003.
- [15] Y. H. Wang, L. Lu, Y. H. Wang, and H. Wang, "The survey of plant germplasm resources and evaluation of application on Chinese *Gaultheria*," *J. Yunnan Univ*, vol. 35, pp. 378-389, 2013.
- [16] P. Bantawa, J. A. T. Da Silva, S. K. Ghosh, and T. K. Mondal, "Determination of essential oil contents and micropropagation of *Gaultheria fragrantissima*, an endangered woody aromatic plant of India," *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 86, no. 5, pp. 479-485, 2011.
- [17] T. Greene, S. Rogers, A. Franzen, and R. Gentry, "A critical review of the literature to conduct a toxicity assessment for oral exposure to methyl salicylate," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 47, no. 2, pp. 98-120, 2017.
- [18] P. A. Chyka, A. R. Erdman, G. Christianson, P. M. Wax, L. L. Booze, A. S. Manoguerra, and W. G. Troutman, "Salicylate poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management," *Clinical toxicology*, vol. 45, no. 2, pp. 95-131, 2007.
- [19] A. Marchese, R. Barbieri, E. Coppo, I. E. Orhan, M. Daglia, S. F. Nabavi, and M. Ajami, "Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint," *Critical reviews in microbiology*, vol. 43, no. 6, pp. 668-689, 2017.
- [20] M. He, M. Du, M. Fan, and Z. Bian, "In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms," *Mycopathologia*, vol. 163, pp. 137-143, 2007.
- [21] S. A. Guénette, F. C. Uhland, P. Hélie, F. Beaudry, and P. Vachon, "Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)," *Aquaculture*, vol. 266, no. 1-4, pp. 262-265, 2007.
- [22] A. Öztürk and H. Özbek, "The Anti-Inflammatory Activity of *Eugenia caryophyllata* Essential Oil: An animal model of anti-inflammatory activity," *European Journal of General Medicine*, vol. 2, no. 4, pp. 159-163, 2005.
- [23] A. Santos, G. Chierice, K. Alexander, A. Riga, and E. Matthews, "Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L.," *Journal of thermal analysis and calorimetry*, vol. 96, no. 3, pp. 821-825, 2009.
- [24] J. L. Kornacki and E. H. Marth, "Foodborne illness caused by *Escherichia coli*: a review," *Journal of Food Protection*, vol. 45, no. 11, pp. 1051-1067, 1982.
- [25] L. R. Beuchat, "Pathogenic microorganisms associated with fresh produce," *Journal of Food Protection*, vol. 59, no. 2, pp. 204-216, 1996.
- [26] T. J. Foster, "Staphylococcus aureus," *Molecular Medical Microbiology*, pp. 839-888, 2002.
- [27] A. Marchese, R. Barbieri, E. Coppo, I. E. Orhan, M. Daglia, S. F. Nabavi, and M. Ajami, "Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint," *Critical reviews in microbiology*, vol. 43, no. 6, pp. 668-689, 2017.
- [28] G. Ramage, A. Jose, B. Coco, R. Rajendran, R. Rautemaa, C. Murray, and J. Bagg, "Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms in vitro," *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, vol. 111, no. 4, pp. 456-460, 2011.