

SCREENING OF SOME PLANTS SAMPLED IN KIEN GIANG WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST BACTERIA CAUSING DISEASES IN AQUACULTURE

Hong Mong Huyen^{1*}, Nguyen Thi Phuong¹, Pham Trong Nghia¹,
Lai Thi My Uyen², Nguyen Truong Duy², Hong Phuc Nguon³, Nguyen Thi Truc Linh⁴

¹Kien Giang University, ²Can Tho University,

³Ca Mau Investment Promotion and Enterprise Support Center, ⁴Tra Vinh University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 27/3/2025	Research on the production of biological products from medicinal herbs to prevent and control diseases in aquaculture in a biosafety direction is receiving attention. The antibacterial activity of nine wild or commonly grown plant species in Vinh Thuan and An Bien districts, Kien Giang province was surveyed and screened. The extract from <i>Annona glabra</i> leaves had the highest antibacterial activity, reaching the sensitivity level for <i>Aeromonas hydrophyla</i> , <i>Streptococcus iniae</i> and <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> (antibacterial diameter > 14 mm). The test to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) showed that the <i>Annona glabra</i> leaf extract had the ability to kill bacteria against all three types of bacteria above. The composition of the extract of <i>Annona glabra</i> leaves includes total phenols of 119.5±2.2 mg GAE/g, total flavonoids of 256.4±1.8 mg QE/g and total alkaloids of 137.2±2.3 mg AE/g. The study shows that leaf of <i>Annona glabra</i> is one of the potential sources of raw materials to produce products serving the trend of safe biological aquaculture.
Revised: 02/12/2025	
Published: 02/12/2025	
KEYWORDS	
<i>Annona glabra</i>	
Herbal Extracts	
Bioactivity	
Antibacterial	
Bacteria	

SÀNG LỘC MỘT SỐ THỰC VẬT THU HÁI Ở KIÊN GIANG CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH TRÊN ĐỘNG VẬT THỦY SẢN

Hồng Mộng Huyền^{1*}, Nguyễn Thị Phương¹, Phạm Trọng Nghĩa¹, Lại Thị Mỹ Uyên²,
Nguyễn Trường Duy², Hồng Phúc Nguồn³, Nguyễn Thị Trúc Linh⁴

¹Trường Đại học Kiên Giang, ²Trường Đại học Cần Thơ,

³Trung tâm Xúc tiến đầu tư và hỗ trợ doanh nghiệp Cà Mau, ⁴Trường Đại học Trà Vinh

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 27/3/2025	Nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học từ cây thảo dược để phòng trừ dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản theo hướng an toàn sinh học đang được quan tâm. Hoạt tính kháng khuẩn của chín loài thực vật hoang dại hoặc trồng phổ biến ở huyện Vĩnh Thuận và An Biên, tỉnh Kiên Giang được khảo sát và sàng lọc. Chất chiết từ lá Bình bát (<i>Annona glabra</i>) có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất, đạt mức nhạy đối với <i>Aeromonas hydrophyla</i> , <i>Streptococcus iniae</i> và <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> (đường kính kháng khuẩn > 14 mm). Thử nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) cho thấy cao chiết lá Bình bát có khả năng diệt khuẩn đối với cả 3 loại vi khuẩn trên. Thành phần có trong cao chiết lá Bình bát gồm có phenols tổng là 119,5±2,2 mg GAE/g, flavonoids tổng là 256,4±1,8 mg QE/g và alkaloids tổng là 137,2±2,3 mg AE/g. Nghiên cứu cho thấy lá Bình Bát là một trong những nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất chế phẩm phục vụ xu hướng nuôi trồng thủy sản an toàn sinh học.
Ngày hoàn thiện: 02/12/2025	
Ngày đăng: 02/12/2025	
TỪ KHÓA	
Bình bát	
Cao chiết thảo dược	
Hoạt tính sinh học	
Kháng khuẩn	
Vi khuẩn	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.12407>

* Corresponding author. Email: hmhuyen@vknkgu.edu.vn

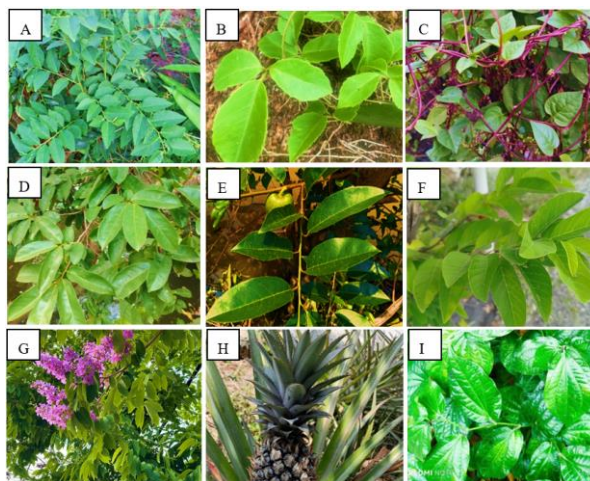
1. Giới thiệu

Bệnh do vi khuẩn là một trong những nguyên nhân chính gây thiệt hại nghiêm trọng trong nuôi trồng thủy sản, gây ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất, chất lượng sản phẩm và kinh tế của người nuôi [1]. *Aeromonas hydrophila* là vi khuẩn gram âm, gây bệnh xuất huyết trên cá nước ngọt, bao gồm cá tra, cá bông tượng, cá trê lai, ếch [2], cá rô đồng (*Anabas testudineus*) [3], lươn đồng (*Monopterus albus*) [4], cá thát lát còm (*Chitala Chitala*) [5] và cá lóc [6]. Bệnh có các dấu hiệu lâm sàng điển hình như xuất huyết dưới da, viêm ruột và hoại tử cơ quan nội tạng. Bên cạnh đó, *Streptococcus iniae* là vi khuẩn gram dương, gây bệnh nhiễm trùng huyết trên nhiều loài cá biển và nước ngọt, dẫn đến viêm màng não, xuất huyết và tổn thương thần kinh trung ương [7]. Ở Việt Nam, *S. iniae* được xác định là tác nhân chính gây bệnh trên cá chêm [8], ở cá nước ngọt *S. iniae* gây bệnh đen thân trên cá rô đồng [9]. Đặc biệt, các loài cá có giá trị kinh tế cao như cá mú, cá bóp và cá hồi thường chịu ảnh hưởng nặng nề từ loại vi khuẩn này. Trong khi đó, *Vibrio parahaemolyticus* là vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) trên tôm, dẫn đến tỷ lệ chết cao, đặc biệt trong các hệ thống nuôi thâm canh và siêu thâm canh. Bệnh AHPND có cơ chế gây bệnh phức tạp, liên quan đến độc tố có tên là *PirA* và *PirB* do vi khuẩn tiết ra, làm suy giảm chức năng gan tụy và gây tổn thương nghiêm trọng đến hệ tiêu hóa của tôm [10], [11]. Dịch bệnh này đã gây ra thiệt hại hàng tỷ USD cho ngành tôm nuôi toàn cầu trong những năm gần đây [12].

Trước thực trạng đó, phương pháp áp dụng cao chiết từ thực vật trong phòng và trị bệnh cho động vật thủy sản đang được quan tâm nghiên cứu nhằm thúc đẩy nuôi trồng thủy sản bền vững. Trong những năm gần đây, các hợp chất có nguồn gốc từ thảo dược đã thu hút sự quan tâm lớn nhờ khả năng kháng khuẩn tự nhiên, ít gây tác dụng phụ và có tiềm năng thay thế kháng sinh [13]. Chúng còn được biết đến với khả năng chống lại nhiều tác nhân gây bệnh trên tôm, cá như kháng vi khuẩn, virus, nấm và ký sinh trùng [14]. Ở các thí nghiệm *in-vitro* và *in-vivo* đều có hiệu quả hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản, nhiều loài thảo dược không những có hoạt tính kháng khuẩn cao mà còn có phổ kháng rộng, nghĩa là chúng có khả năng diệt hoặc ức chế được cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm [15] - [18].

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu



Hình 1. Các loài thảo dược dùng trong nghiên cứu: (A) lá Bồ ngót, (B) lá Dây vác, (C) Mồng tơi tím, (D) lá Bình bát, (E) Măng cầu gai, (F) lá Na, (G) Bằng lăng, (H) Dứa (Khóm), (I) lá Lốt

Chúng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (phân lập từ cá tra bệnh xuất huyết), *Streptococcus iniae* (phân lập từ cá rô bệnh đen thân) và *Vibrio parahaemolyticus* (phân lập từ tôm thẻ chân

trắng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính) sử dụng trong nghiên cứu được lấy từ bộ sưu tập vi khuẩn của Bộ môn Thủy sản, Khoa Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Trường Đại học Kiên Giang. Các chủng này được phân lập từ tôm, cá bệnh.

09 loài thực vật được sử dụng trong nghiên cứu được thu hái ở huyện Vĩnh Thuận và An Biên, tỉnh Kiên Giang, bao gồm lá cây Bình bát (*Annona glabra*) (9°48'13.2"N 105°05'45.6"E), lá Dây vác (*Cayratia trifolia*) (9°48'13.2"N 105°05'45.6"E), lá Mồng tơi tím (*Basella rubra*) (9°36'10.9"N 105°15'40.2"E), lá cây Rau ngót (*Sauropus androgynus*) (9°35'55.0"N 105°15'26.9"E), lá và vỏ Dứa (Khóm) (*Ananas comosus*) (10°09'44.7"N 104°36'48.6"E), lá Mãng cầu gai (*Annona muricata*) (9°48'13.2"N 105°05'45.6"E), lá Na (*Annona squamosa*) (9°35'55.0"N 105°15'26.9"E), lá Bàng lã (*Lagerstroemia speciosa*) (10°01'26.2"N 105°46'07.9"E), lá Lót (*Piper sarmentosum*) (9°35'55.0"N 105°15'26.9"E) (Hình 1).

2.2. Phương pháp ly trích thảo dược

Lá của từng loài thực vật được chọn lựa và thu hái đồng nhất, loại bỏ những lá non hay quá già và bị sâu bệnh. Chúng được rửa sạch dưới vòi nước, sấy khô ở 45°C trong vài ngày đến khi lá khô hoàn toàn, tiếp tục cắt và nghiền mịn. Bột mịn của từng loại lá được ngâm riêng với dung dịch ethanol theo tỉ lệ 1:10 (100 g bột lá thực vật trong 1 L ethanol). Sau 3 ngày tiến hành lọc dịch chiết bằng giấy lọc Whatman No. 1. Dung dịch thu được sau đó được cô quay chân không để thu cao chiết ethanol [19]. 9 loại cao chiết thu được sẽ được bảo quản trong tủ lạnh 4°C và được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

2.3. Phương pháp hoạt hóa vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus* từ tủ lưu mẫu -80°C được hoạt hóa bằng cách cấy rìa trên đĩa môi trường TSA (Tryptic Soy Agar: Tryptose (15.000 g/L), Soya peptone (5.000 g/L), Natri clorua (5.000 g/L), và Agar (15.000 g/L) (M290-500G, Himedia, Ấn Độ), sau đó nuôi ở 28°C trong 24 giờ. Sau đó chọn một khuẩn lạc rời nuôi trong môi trường NB (Nutrient Borth: HM peptone B#: 1.500 g/L, Peptone: 5.000 g/L, Sodium chloride: 5.000 g/L, Yeast extract: 1.500 g/L) (M002-500G, Himedia, Ấn Độ), lắc nhẹ ở 28°C trong 24 giờ. Đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* các môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm 1,5% NaCl. Thu vi khuẩn bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Vi khuẩn được rửa 2 lần trong 1 mL dung dịch NaCl 0,85%. Sau đó pha loãng vi khuẩn về nồng độ 10⁸ CFU/mL để sử dụng cho khảo sát hoạt tính kháng khuẩn [20].

2.4. Chuẩn bị khoanh giấy tẩm cao chiết thảo dược

Quá trình chuẩn bị khoanh giấy tẩm thảo dược được thực hiện theo Najiah và cs., (2011) [21]. Pha loãng từng loại cao chiết bằng dung môi Dimethyl sulfoxide (DMSO) nồng độ 20%, nồng độ dung dịch cao chiết cuối cùng là 400 mg/mL. Sau đó tiến hành nhỏ 50 µL mỗi loại cao chiết khác nhau vào từng khoanh giấy vô trùng có đường kính 8 mm (LOT No. 49005020, Advantec, Tokyo, Nhật Bản). Các khoanh giấy này để ở nhiệt độ phòng cho đến khi khô hoàn toàn để đảm bảo cao chiết thấm hết vào khoanh giấy.

2.5. Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được thực hiện theo mô tả của Mohammed và Arias (2016) [20]. Chuẩn bị đĩa thạch TSA đảm bảo đĩa có độ dày 4 mm. Sau đó trải vi khuẩn đều trên mặt đĩa thạch cho đến khi thạch khô, mỗi lần xoay đĩa 60 độ để đảm bảo vi khuẩn dàn đều khắp mặt đĩa thạch. Dùng kẹp tiệt trùng dán khoanh giấy tẩm cao chiết thảo dược đã chuẩn bị sẵn lên đĩa đã trải vi khuẩn. Ấn nhẹ để khoanh giấy tẩm cao chiết dính chặt vào mặt thạch agar, để đĩa khô tự nhiên. Đối chứng âm là khoanh giấy được tẩm DMSO 20%, đối chứng dương là khoanh giấy tẩm kháng sinh doxycycline (Dx, 30µg). Mỗi loại cao chiết thảo dược được thực hiện lặp lại 3 lần. Ủ

đĩa ở 28°C trong 24 giờ. Sau đó đo đường kính vòng kháng khuẩn bằng thước đo, giá trị vùng không có sự phát triển của vi khuẩn là hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thảo dược [22].

2.6. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Dựa vào kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, nghiên cứu chọn cao chiết lá bình bát để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus*. Phương pháp thực hiện theo Oonmetta-aree và cs., (2006) [22]. Cụ thể, cao chiết được pha loãng và tẩm vào khoanh giấy ở các nồng độ thí nghiệm 1X (25 mg/mL), 2X (12,5 mg/mL), 4X (6,25 mg/mL), 8X (3,125 mg/mL), 16X (1,5625 mg/mL), 32X (0,78125 mg/mL), 64X (0,390625 mg/mL), 128X (0,1953125 mg/mL), 256X (0,09765625 mg/mL), 512X (0,048828126 mg/mL). Sau đó, các khoanh giấy này được cho lần lượt vào các ống nghiệm chứa sẵn 1 mL dung dịch NB có vi khuẩn khảo sát. Đồng thời chuẩn bị một ống nghiệm chứa vi khuẩn có để khoanh giấy tẩm DMSO 20% (+) và ống nghiệm chứa dung dịch NB không có vi khuẩn khảo sát làm đối chứng cho sự sinh trưởng của vi khuẩn (-). Thí nghiệm ở mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Các ống nghiệm ủ ở 28°C lắc trong 24 giờ. Giá trị MIC được xác định là nồng độ thấp nhất của cao chiết trong môi trường lỏng không có vi khuẩn phát triển (nồng độ ở ống nghiệm không có độ đục do vi khuẩn phát triển).

2.7. Phương pháp xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường TCBS Agar (Yeast extract: 5.000 g/L, Peptone, special: 15.000 g/L, Sodium citrate: 10.000 g/L, Sodium thiosulphate: 10.000 g/L, Sodium cholate: 5.000 g/L, Bile: 3.000 g/L, Sucrose: 20.000 g/L, Sodium chloride: 10.000 g/L, Ferric citrate: 1.000 g/L, Bromo thymol blue: 0.040 g/L, Thymol blue: 0.040 g/L, Agar: 15.000 g/L) (M870, Himedia, Ấn Độ) (vi khuẩn *V. parahaemolyticus*) hoặc TSA (vi khuẩn *A. hydrophyla* và *S. iniae*). Cụ thể, thể tích 100 µL dung dịch (từ các ống nghiệm không có vi khuẩn phát triển trong thí nghiệm MIC) được trải đều trên đĩa TCBS hoặc TSA. Mỗi nồng độ khảo sát được lặp lại 3 lần. Sau đó, các đĩa này được ủ ở 28°C trong 24 giờ và tiến hành đếm số lượng khuẩn lạc phát triển trên môi trường TCBS hoặc TSA. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất của chất chiết thảo dược trong môi trường nuôi cấy có khả năng diệt vi khuẩn từ 99,9% trở lên [22].

2.8. Phương pháp định tính một số thành phần hợp chất hóa học trong cao chiết Bình bát

Sử dụng phương pháp định tính để xác định sự hiện diện của alkaloids, flavonoids, steroid và triterpenoids, đường khử, phenol, tannins và sesquiterpene lactones trong cao chiết lá Bình bát [23]. Thuốc thử và phản ứng của phương pháp phân tích được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học, thuốc thử và phản ứng của phương pháp phân tích

Nhóm chất	Thuốc thử	Kết quả phản ứng
Alkaloids	Dragendorff	Kết tủa nâu cam
	Wagner	Kết tủa nâu
Flavonoids	FeCl ₃ 5%	Kết tủa nâu đỏ hay xanh đen
	NaOH 1%	Dung dịch vàng, cam đến đỏ
Steroid và Triterpenoid	Liebermann-Burchard	Dung dịch đỏ cam
	Rosenthaler	Dung dịch xanh lục hoặc tím
Đường khử	Tollens	Có kết tủa đen Ag
	Fehling	Kết tủa đỏ gạch
	Keller-Killiani	Dung dịch có màu xanh lục
Tannins	Gelatin mặn	Kết tủa bông trắng
	Chì acetate bão hòa	Kết tủa bông trắng
Sesquiterpene lactones	Legal	Dung dịch hồng đến đỏ đậm

Cách thực hiện:

Alkaloid được định tính bằng thuốc thử Wagner: Nhỏ vài giọt thuốc thử Wagner (1,27 g I₂ và 2 g KI trong 20 mL nước cất; sau đó thêm nước đến 100 mL) vào mẫu, nếu mẫu có alkaloid thì sẽ xuất hiện màu nâu.

Alkaloid được định tính bằng thuốc thử Dragendorff: Nhỏ vài giọt thuốc thử Dragendorff (8 g BiNO₃.H₂O trong 25 mL HNO₃ 30% (Dung dịch 1) và 28 g KI trong 1 mL HCl 6N thêm 5 mL nước cất (Dung dịch 2); hỗn hợp 2 dung dịch để yên trong tủ lạnh ở 5°C cho tủa màu nâu sậm và tan trở lại, lọc thêm nước cất cho đủ 100 mL) vào mẫu, nếu mẫu có alkaloid thì sẽ xuất hiện màu nâu cam.

Flavonoids được định tính bằng NaOH 1%: Nhỏ vài giọt dung dịch NaOH 1% vào mẫu, nếu mẫu có flavonoids thì dung dịch có màu vàng, cam đến đỏ.

Flavonoids được định tính bằng FeCl₃ 5%: Nhỏ vài giọt dung dịch FeCl₃ 5% vào mẫu, nếu mẫu có flavonoids thì dung dịch có kết tủa nâu đỏ hay xanh đen.

Steroid và Triterpenoid được định tính bằng thuốc thử Liebermann-Burchard: cho từ từ 1mL thuốc thử Liebermann-Burchard, sau đó tiếp tục cho từ từ 1mL H₂SO₄ đậm đặc, nếu mẫu có triterpenoid thì dung dịch đỏ cam.

Steroid và Triterpenoid được định tính bằng phản ứng Rosenthaler: cho 1% dung dịch vanilin (1 giọt) và HCl đậm đặc (1 giọt) vào mẫu, nếu mẫu có steroid và Triterpenoid thì dung dịch có màu xanh lục hoặc tím.

Đường khử được định tính bằng Tollens: Cho 5 giọt pyridin và 4 giọt thuốc thử (10% nitrat bạc, 10%NaOH, vài giọt NH₄OH) vào mẫu, nếu mẫu có đường khử sẽ xuất hiện kết tủa đen Ag.

Đường khử Fehling Kết tủa đỏ gạch.

Đường khử được định tính bằng Keller-Killiani: Cho 1 mL thuốc thử 5% Fe₂(SO₄)₃ vào mẫu, nếu mẫu có đường khử thì dung dịch có màu xanh lục.

Tannins được định tính bằng Gelatin mặn: Nhỏ vài giọt dung dịch thuốc thử (NaCl và gelatin) vào mẫu, nếu mẫu có Tannins thì xuất hiện tủa bông trắng

Tannins được định tính bằng chì acetate bão hòa: cho 2% chì acetate bão hòa vào mẫu, nếu mẫu có tannins sẽ kết tủa bông trắng.

Sesquiterpene lactones được định tính bằng thuốc thử Legal: Nhỏ 1 giọt dung dịch 1 (0,5% natri nitroprussiat) và 4 giọt dung dịch 2 (10% NaOH), quan sát sự thay đổi màu trong 5 phút, nếu mẫu có sesquiterpene lactones thì sẽ xuất hiện hồng đến đỏ đậm.

2.9. Phương pháp định lượng phenols, flavonoids và alkaloids tổng trong cao chiết ethanol lá Bình bát

Hàm lượng phenol tổng của cao chiết ethanol lá bình bát được xác định dựa vào dung dịch phenolic chuẩn là gallic acid (GAE) [24]. Xây dựng đường chuẩn gallic acid bằng cách cho 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% vào các ống nghiệm có chứa sẵn 1 mL dung dịch chuẩn gallic acid ở các nồng độ khác nhau. Để yên 5 phút sau đó thêm vào 2 mL dung dịch Na₂CO₃ 2%. Để ống nghiệm ở nhiệt độ phòng sau 45 phút thì tiến hành đo mẫu ở bước sóng 765 nm. Dựa vào giá trị OD của mẫu chuẩn gallic acid để xây dựng đường chuẩn. Chất chiết ethanol lá bình bát cũng được thực hiện ương tự như dung dịch gallic acid. Hàm lượng phenolic tổng trong lá bình bát được tính theo công thức:

$$P = a \times V/m \quad (1)$$

Trong đó: P: hàm lượng phenolic tổng (mg GAE/g chiết xuất); a: giá trị x từ đường chuẩn với gallic acid (μg/mL); V: thể tích dung dịch cao chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

Hàm lượng flavonoid tổng của cao chiết ethanol lá Bình bát bằng cách xây dựng đường chuẩn với quercetin (QE) [25]. Quercetin cho phản ứng tạo màu với với AlCl₃. Cụ thể, xây dựng đường chuẩn bằng cách lần lượt cho 0,5 mL dung dịch quercetin vào ống nghiệm có chứa 1,5 mL methanol sau 5 phút tiếp tục cho thêm 0,1 mL AlCl₃ 10%, tiếp tục để trong 6 phút. Sau đó cho 0,1

mL CH₃COOK 1M và 2,8 mL nước cất lắc đều và để yên ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Mẫu được đo độ hấp thụ ở bước sóng 415 nm. Chất chiết ethanol lá bình bát cũng được thực hiện tương tự như quercetin. Hàm lượng flavonoid tổng trong lá bình bát được tính theo công thức:

$$F = a \times V/m \quad (2)$$

Trong đó: F: hàm lượng flavonoid tổng (mg QE/g chiết xuất); a: giá trị x từ đường chuẩn với quercetin (mg/mL); V: thể tích dịch chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

Hàm lượng alkaloid tổng của cao chiết ethanol lá bình bát thông qua đường chuẩn của dung dịch atropine (AE) cho phản ứng với bromocresol green, phản ứng có màu vàng [26]. Xây dựng đường chuẩn bằng cách cho 1 mL dung dịch atropine pha loãng vào ống nghiệm có chứa 1 mL dung dịch HCl 2N chờ 5 phút cho phản ứng xảy ra hoàn toàn thì tiến hành lọc dung dịch này bằng giấy lọc để loại bỏ cặn. Dung dịch thu được sau khi lọc tiếp tục cho vào bình tách chiết và cho thêm lần lượt 5 mL bromocresol green và 5 mL dung dịch đệm phosphate (pH 4,7). Sau đó, 10 mL dung dịch chloroform được cho vào bình và lắc mạnh ở nhiệt độ phòng trong 2 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn thì tiến hành lấy mẫu đo ở bước sóng 470 nm. Chất chiết ethanol lá bình bát cũng được thực hiện tương tự như atropine. Hàm lượng alkaloid tổng được tính theo công thức:

$$A = a \times V/m \quad (3)$$

Trong đó: A: hàm lượng alkaloid tổng (mg AE/g chiết xuất); a: giá trị x từ đường chuẩn với atropine (µg/mL); V: thể tích dung dịch cao chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thảo dược đối với vi khuẩn *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus*

Qua kết quả trình bày Bảng 2 cho thấy khả năng kháng khuẩn của chín loại cao chiết thảo dược đối với 3 loài vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản (*A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus*) là khác nhau. Giá trị ghi nhận được từ đường kính vòng kháng khuẩn được tạo ra trên đĩa petri chính là giá trị để đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn của các cao chiết.

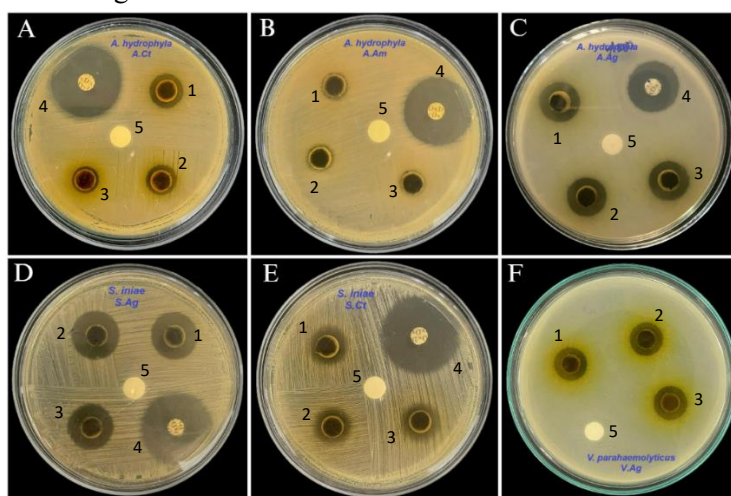
Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược đối với vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản

Cao chiết	Đường kính vòng kháng khuẩn đối với vi khuẩn (mm)		
	<i>A. hydrophyla</i>	<i>S. iniae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Bình bát (<i>A. glabra</i>)	14,6 ± 0,5	18,0 ± 0	19,0 ± 0,8
Dây vác (<i>C. trifolia</i>)	12,0 ± 0,8	13,3 ± 0	11,0 ± 1,6
Mãng cầu gai (<i>A. muricata</i>)	9,6 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0
Rau ngót (<i>S. androgynus</i>)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Khóm (<i>A. comosus</i>)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Na (<i>A. squamosa</i>)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Lá Lót (<i>P. lolot</i>)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Mồng toi tím (<i>B. rubra</i>)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Bàng lằng (<i>L. speciosa</i>)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Dx (30µg)	21,3 ± 1,7	28,3 ± 0,5	23,0 ± 0
DMSO (20%)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Ghi chú: Kháng: ≤ 9 mm; Trung bình: ≥ 10 – 13 mm; Nhạy: ≥ 14 mm (Lorian, 1995); Dx: doxycycline và DMSO: dimethyl sulfoxide (20%)

Cao chiết lá Bình bát (*A. glabra*) có vòng kháng khuẩn lớn nhất (nhạy) trong các cao chiết khảo sát đối với cả 3 chủng vi khuẩn *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus*, giá trị vùng kháng khuẩn lần lượt là 14,6 mm; 18,0 mm và 19,0 mm. Kế đến là cao chiết lá Dây vác (*C. trifolia*), có giá trị hoạt tính kháng khuẩn ở mức trung bình, đường kính kháng khuẩn là 12,0 mm đối với *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus* lần lượt là 13,3 và 11,0 mm. Đối với cao chiết Mãng cầu gai (*A. muricata*) chỉ kháng được *A. hydrophyla* với đường kính vòng kháng khuẩn là 9,6 mm. Các cao chiết còn lại bao gồm cao chiết lá Mồng toi tím (*B. rubra*), lá cây Rau ngót (*S. androgynus*), lá Khóm (*A. comosus*), lá Mãng cầu gai (*A. muricata*), lá Na (*A.*

squamosa), lá Bằng lăng (*L. speciosa*), lá Lột (*P. sarmentosum*) không cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của cả 3 chủng vi khuẩn khảo sát.



Hình 2. Hoạt tính kháng vi khuẩn của các cao chiết

Kháng vi khuẩn *A. hydrophyla*: A) Vác (*C. trifolia*); B) Mãng cầu gai (*A. muricata*); C) Bình bát (*A. glabra*).

Kháng vi khuẩn *S. iniae*: D) Bình bát (*A. glabra*); E) Dây vác (*C. trifolia*)

Kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*: F) Bình bát (*A. glabra*).

(1, 2, 3) cao chiết thảo dược; (4) kháng sinh doxycycline, (5) dimethyl sulfoxide

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết thảo dược còn phụ thuộc vào loài thảo dược và kỹ thuật chiết xuất. Theo kết quả khảo sát của Huỳnh Kim Diệu (2010) [27] cho thấy đa số các cao chiết thảo dược trồng ở các tỉnh vùng Đồng bằng Sông Cửu Long đều thể hiện có hiệu quả khả năng kháng khuẩn, như vi khuẩn *E. ictaluri*, *E. tarda* và *A. hydrophila*, các chủng vi khuẩn này gây bệnh trên cá, với đường kính vòng kháng khuẩn từ 6 - 37 mm. Trong đó, cây cỏ sữa lá nhỏ có đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất (37 mm), kế đến Rau muống (35 mm), Tràu không (33 mm), cỏ mực và Diệp hạ châu đắng (32 mm) và lá Bằng (30 mm). Theo Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2009) [28], cùng một loài thực vật, cao chiết bằng dung môi ethanol có hoạt tính kháng *S. agalactiae* lớn hơn so với cao chiết bằng nước trong thử nghiệm *in-vitro*. Thông thường dung môi ethanol, methanol được sử dụng trong ly trích các hợp chất hóa học có hoạt tính kháng khuẩn cũng như tăng cường miễn dịch (chống oxy hóa) trong thực vật như các nhóm chức hydroxy, amin, ester, amid [27]. Đối với cao chiết lá Bình bát cũng giống như các loại cao chiết khác đều cho thấy hiệu quả về đặc tính diệt vi khuẩn, chúng có hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri* và *Pseudomonas aeruginosa* [29].

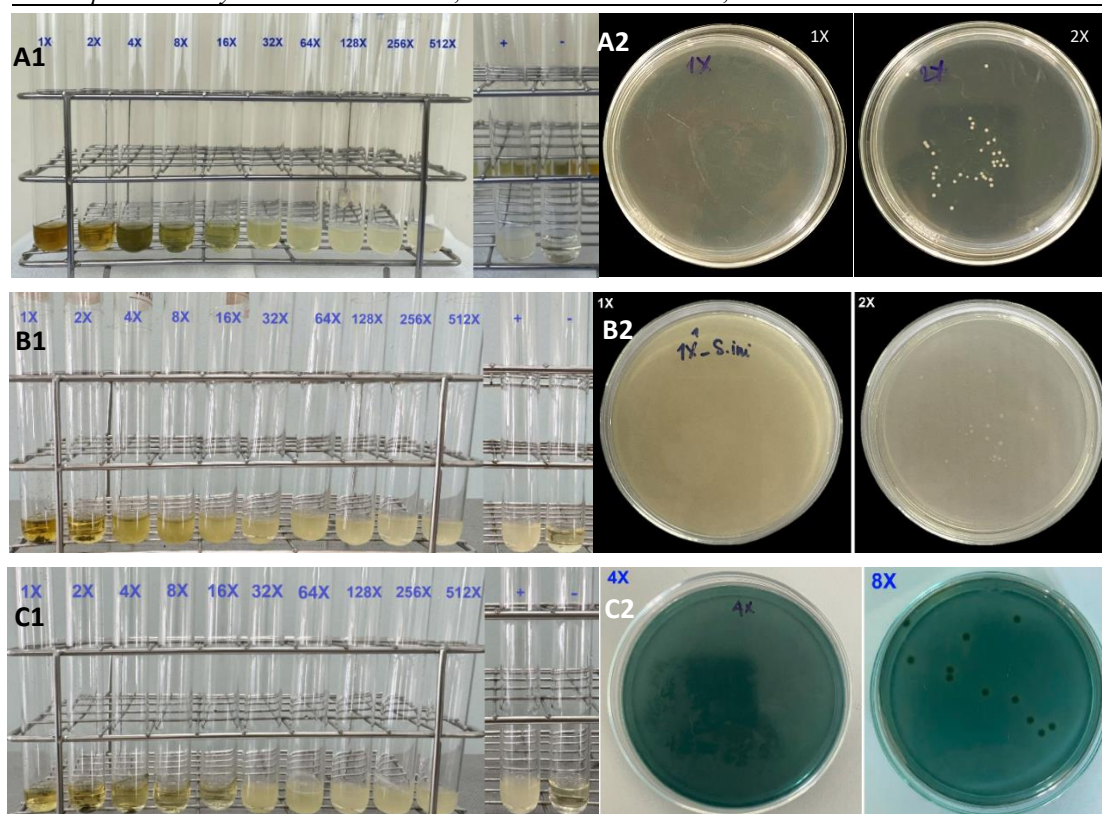
Như vậy, cao chiết Bình bát (*A. glabra*) trong dung môi ethanol có hoạt tính kháng khuẩn trên cả 3 chủng *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. Parahaemolyticus*, và cho kết quả tốt nhất so với các cao chiết còn lại, có nghĩa là cao chiết này có khả năng kháng được cả vi khuẩn Gram âm (*A. hydrophyla*, *S. iniae*) và Gram dương (*V. parahaemolyticus*) gây bệnh trên cá, tôm trong điều kiện *in-vitro*. Trên cơ sở đó cao chiết lá bình bát sẽ được tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đối với cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm.

3.2. Xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu và giá trị nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của cao chiết lá bình bát lên vi khuẩn *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus*

Kết quả khảo sát về khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết cho thấy, cao chiết bình bát (*A. glabra*) kháng vi khuẩn *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. Parahaemolyticus* cao nhất và được chọn để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC). Kết quả được mô tả chi tiết qua Bảng 3, Hình 3.

Bảng 3. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết Bình bát (*A. glabra*) đối với *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus*

Chủng vi khuẩn	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
<i>A. hydrophyla</i>	6,25	25	4
<i>S. iniae</i>	6,25	25	4
<i>V. parahaemolyticus</i>	1,5625	6,25	4



Hình 3. Giá trị MIC, MBC của cao chiết Bình bát đối với từng loại vi khuẩn gây bệnh. A1) kết quả MIC đối với vi khuẩn *A. hydrophyla*; A2) kết quả MBC đối với vi khuẩn *A. hydrophyla* trên môi trường TSA; B1) kết quả MIC đối với vi khuẩn *S. iniae*; B2) kết quả MBC đối với vi khuẩn *S. iniae* trên môi trường TSA; C1) kết quả MIC đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*; C2) kết quả MBC đối với vi khuẩn *V. Parahaemolyticus* trên môi trường TCBS

Kết quả cho thấy, giá trị MIC của lá Bình bát (*A. glabra*) đối với vi khuẩn *A. hydrophyla* và *S. iniae* là 6,25 mg/mL, trong khi đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thấp hơn là 1,5625 mg/mL. Qua đó cho thấy, nồng độ MIC của cao chiết có sự khác nhau giữa các vi khuẩn khác nhau. Tương tự, giá trị MBC của cao chiết lá bình bát đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* là 6,25 mg/mL thấp hơn so với vi khuẩn *A. hydrophyla* và *S. Iniae* (giá trị đều là 25 mg/mL). Theo Canillac & Mourey (2002) [30], nếu tỷ lệ MBC/MIC nhỏ hơn hoặc bằng 4 ($MBC/MIC \leq 4$), thì chất chiết được xem là có khả năng diệt khuẩn; tỷ lệ MBC/MIC lớn hơn 4 ($MBC/MIC > 4$) thì chất chiết có tác dụng kìm khuẩn. Trong nghiên cứu này, cao chiết bình bát đóng vai trò là một chất diệt khuẩn đối với cả 3 chủng vi khuẩn *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. Parahaemolyticus* ($MBC/MIC = 4$). Das và cộng sự [31] cho rằng chất diệt khuẩn là những chất có khả năng tác động trực tiếp lên tế bào vi khuẩn làm vi khuẩn không phát triển; chất kìm khuẩn là những chất có tác dụng ngăn chặn sự tăng trưởng của vi khuẩn, cụ thể là dựa vào hệ thống miễn dịch để loại bỏ vi khuẩn, không cho vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể. Như vậy, cao chiết lá Bình bát (*A. glabra*) trong nghiên cứu này có khả năng diệt trực tiếp cả 3 chủng vi khuẩn *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. parahaemolyticus*.

Kamel [32] cho rằng giá trị MIC và MBC của cao chiết thảo dược đối với chủng vi khuẩn khảo sát sẽ bị phụ thuộc vào nồng độ hoạt chất có trong cao chiết và độ tinh khiết của chúng. Dung môi có độ phân cực khác nhau sẽ dẫn đến thành phần hợp chất ly trích từ thực vật khác nhau, như cao chiết Trâm bầu ly trích bằng nước cho thấy có hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh tốt hơn cao chiết Trâm bầu ly trích bằng cồn, hay cao chiết hạt Trâm bầu thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn cao chiết từ lá. Ngoài ra, nghiên cứu này còn xác định giá trị MIC của cao chiết lá và hạt Trâm bầu có giá trị MIC là như nhau đối với vi khuẩn *E. ictaluri* ở 16 $\mu\text{L/mL}$; giá trị MIC của cao chiết hạt (12 $\mu\text{L/mL}$) thấp hơn so với cao chiết lá (28,8 $\mu\text{L/mL}$) ở vi khuẩn *A. hydrophila*; giá trị MIC cao chiết từ hạt trên vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (14,4 $\mu\text{L/mL}$) cũng thấp hơn từ lá (21,6 $\mu\text{L/mL}$) [33]. Mức độ nhạy cảm của vi khuẩn đối với cao chiết thử nghiệm cũng phụ thuộc vào cấu trúc màng tế bào của vi khuẩn đó, đồng thời còn phụ thuộc vào các hoạt chất có trong cao chiết có thể ức chế chúng [34], [35]. Cao chiết Bình bát (*A. glabra*) có chứa nhiều hợp chất như alkaloid, flavonoid, tannin, saponin [36]. Kamel [32] cho rằng nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu đối với chủng vi khuẩn gây bệnh có liên quan đến nồng độ hoạt chất và độ tinh khiết của cao chiết.

3.3. Định tính và định lượng một số thành phần hóa học trong cao chiết ethanol lá Bình bát

Kết quả định tính ở Bảng 3 cho thấy, cao chiết ethanol lá Bình bát có sự hiện diện alkaloids, flavonoids, steroid, triterpenoids, tanins, saponins và sesquiterpene lactones. Tuy nhiên glycoside cho kết quả âm tính với các thuốc thử (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả định tính thành phần hợp chất hóa học trong cao chiết ethanol lá bình bát

Nhóm chất	Thuốc thử	Kết luận
Alkaloids	Dragendorff	+
	Wagner	++
Flavonoids	FeCl_3 5%	+
	NaOH 1%	+
Steroid và Triterpenoid	Liebermann-Burchard	+
	Salkowski	+
Khử đường	Tollens	-
	Fehling	-
	Keller-Killiani	-
Phenol	FeCl_3 (5%)	+
	Gelatin mẫn	+
Tanins	Chì acetate bão hòa	++
	Chì acetat bão hòa	++
	Legal	+
Sesquiterpene lactones	Legal	+

Chú thích: - Không hiện tượng; + Có hiện tượng; ++ Có hiện tượng nhiều

Các hợp chất hóa học có trong thực vật tồn tại rất nhiều trong tự nhiên và mỗi chất đều mang một đặc tính và hoạt tính khác nhau [37], [38]. Theo Cown (1999) [39] một số hợp chất hóa học có khả năng kháng khuẩn phân lập từ thảo dược như phenols, quinones, flavonoids, flavones, tannins, coumarins.

Tannin có cơ chế kháng khuẩn là ức chế các enzyme ngoại bào của vi khuẩn. Tannin lấy chất nền cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật bằng cách tạo phức các ion kim loại hoặc thông qua ức chế quá trình phosphoryl hóa [40]. Ngoài ra, các hợp chất alkaloids, glycosides, polyphenols, và terpenes từ chiết xuất thực vật cũng được xác định có khả năng kháng khuẩn [41]. Do vậy, kết quả này giúp khẳng định thêm về khả năng kháng khuẩn của cao chiết lá Bình bát đối với vi khuẩn.

Bảng 5. Hàm lượng phenols tổng, flavonoids tổng và alkaloids tổng trong cao chiết methanol bình bát

Hàm lượng	Phenols tổng (mg GAE/g)	Flavonoids tổng (mg QE/g)	Alkaloids tổng (mg AE/g)
Cao chiết lá bình bát	119,5±2,2	256,4±1,8	137,2±2,3

Kết quả từ Bảng 5 cho thấy hàm lượng phenols tổng trong cao chiết lá Bình bát là $119,5 \pm 2,2$ mg GAE/g và flavonoids tổng là $256,4 \pm 1,8$ mg QE/g, alkaloids tổng là $137,2 \pm 2,3$ mg AE/g. Hàm lượng phenol, flavonoid và alkaloids trong cao chiết ethanol lá Bình bát có giá trị tương đối cao. Như vậy, chúng ta có thể kết luận rằng cao chiết ethanol lá Bình bát có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhờ vào sự hiện diện của các hợp chất hóa học thông qua phân tích định tính và định lượng. Kết quả nghiên cứu này sẽ là cơ sở cho các thử nghiệm tiếp theo sử dụng cao chiết lá Bình bát trong nghiên cứu về khả năng kích thích miễn dịch của động vật thủy sản.

4. Kết luận

Có 2/9 loại cao chiết có khả năng kháng cả 3 loài vi khuẩn *A. hydrophyla*, *S. iniae* và *V. Parahaemolyticus*, đó là cao chiết lá Bình bát và cao chiết Dây vác với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 12-19 mm, các cao chiết còn lại không có hoạt tính kháng khuẩn đối với ba chủng thử nghiệm. Cao chiết lá Bình bát là chất diệt khuẩn đối với cả 3 chủng thử nghiệm thông qua hệ số MBC/MIC = 4. Cao chiết ethanol lá bình bát có chứa các hợp chất như alkaloids, flavonoids, steroid, triterpenoids, tanins, saponins và sesquiterpene lactones. Phenols tổng có hàm lượng là $119,5 \pm 2,2$ mg GAE/g và flavonoids tổng là $256,4 \pm 1,8$ mg QE/g, alkaloids tổng là $137,2 \pm 2,3$ mg AE/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Z. Zhang, Q. Deng, L. Wan, X. Cao, Y. Zhou, and C. Song, "Bacterial communities and enzymatic activities in sediments of long-term fish and crab aquaculture ponds," *Microorganisms*, vol. 9, no. 501, pp. 1-12, 2021.
- [2] T. H. O. Dang, "Biochemical characters and ribotyping profiles of *Aeromonas* bacteria isolated from diseased fishes in aquaculture in the Mekong River Delta, Vietnam," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 5, pp. 85-94, 2006.
- [3] T. M. T. Dang, T. T. C. Tran, C. P. L. Nguyen, D. H. Nguyen, and T. H. O. Dang, "Histopathology of Climbing perch (*Anabas testudineus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp.," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 22c, pp. 183-193, 2012.
- [4] T. H. O. Dang, Q. N. Truong, and D. H. Nguyen, "Isolation and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* on rice eel (*Monopterus albus*)," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 22c, pp. 173-182, 2012.
- [5] M. D. Pham, N. T. Tran, and T. T. H. Tran, "An investigation on pathogen infection to cultured snakehead (*Channa striata*) in An Giang and Dong Thap province," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 21b, pp. 124-132, 2012.
- [6] M. D. Pham, N. T. Tran, and K. Hata, "*Aeromonas hydrophila* Infection in Fingerlings of Snakehead *Channa striata* in Viet Nam," *Fish Pathology*, vol. 48, pp. 48-51, 2013.
- [7] W. Agnew and A. C. Barnes, "*Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination," *Veterinary Microbiology*, vol. 122, no. 1-2, pp. 1-15, 2007.
- [8] T. V. Huynh, D. H. Q. Vu, H. D. Nguyen and H. I. Wergeland, "Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam," *International Journal of Aquatic Science*, vol. 4, no.1, pp. 3-12, 2013.
- [9] T. D. Tu, K. D. Nguyen, and T. N. T. Huynh, "*Streptococcus iniae* as a causative gent of "dark body" disease in limbing perch (*Anabas testudineus*) in the Mekong Delta," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 26, pp. 96-103, 2013.
- [10] L. Tran, L. Nunan, R. M. Redman, L. L. Mohny, C. R. Pantoja, K. Fitzsimmons, and D.V. Lightner, "Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 105, pp. 45-55, 2013.
- [11] H. Kondo, P. T. Van, L. T. Dang, and I. Hirono, "Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam," *Genome Announc*, vol. 3, pp. 1-15, 2015.
- [12] D. V. Lightner, C. R. Redman B. L. Pantoja, L.M. Noble, and T. Loc, "Documentation of an Emerging Disease (Early Mortality Syndrome) in SE Asia and Mexico," OIE Reference Laboratory for Shrimp Diseases, Department of Veterinary Science & Microbiology, School of Animal and Comparative Biomedical Sciences, 2013.
- [13] T. Citarasu, "Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry," *Aquaculture International*, vol. 18, no. 3, pp. 403-414, 2010.
- [14] S. Direkbusarakom, "Application of Medicinal Herbs to Aquaculture in Asia," *Walailak Journal of Science and Technology*, vol. 1, pp. 7-14, 2004.
- [15] S. B. Chakraborty and C. Hancz, "Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture," *Reviews in Aquaculture*, vol. 3, pp. 103-119, 2011.

- [16] R. Harikrishnan, C. Balasundaram, and M. S. Heo, "Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish," *Aquaculture*, vol. 317, pp. 1–15, 2011.
- [17] S. B. R. Castro, C. A. G. Leal, F. R. Freire, D. A. Carvalho, D. F. Oliveira, and H. C. P. Figueiredo, "Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 39, no. 4, pp. 756-760, 2008.
- [18] L. Roomiani, M. Soltani, A. Akhondzadeh, A. Basti, A. Mahmoodi, and F. Yadollahi, "Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish," *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, vol. 12, no. 3, pp. 702-716, 2013.
- [19] K. P. N. Phung, *Fractionation Method for Organic Compounds*. Viet Nam National University Ho Chi Minh Press, 2007, p. 528.
- [20] H. H. Mohammed and C. R. Arias, "Protective efficacy of *Nigella sativa* seeds and oil against columnaris disease in fishes," *Journal of Fish Diseases*, vol. 39, no. 6, pp. 693-703, 2016.
- [21] M. Najiah, M. Nadirah, Z. Arief, S. Zahrol, L. W. Tee, A. D. Ranzi, and R. J. Aida, "Antibacterial activity of Malaysian edible herbs extracts on fish pathogenic bacteria," *Research Journal of Medicinal Plant*, vol. 5, no. 6, pp. 772-778, 2011.
- [22] J. Oonmetta-Aree, T. Suzuki, P. Gasaluck, and G. Eumkeb, "Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 39, no. 10, pp. 1214-1220, 2006.
- [23] R. N. S. Yadav and M. Agarwala, "Phytochemical analysis of some medicinal plants," *Journal of Phytology*, vol. 3, no. 12, pp. 10-14, 2011.
- [24] V. L. Singleton, R. M. Orthofer & R. M. Lamuela-Raventos, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent," *Methods Enzymol*, vol. 299, pp. 152-178, 1999.
- [25] C. Chang, M. Yang, H. Wen, and J. Chen, "Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 10, no. 3, pp. 178-182, 2002.
- [26] F. Shamsa, H. Monsef, R. Ghamooshi, and M. Verdianrizi, "Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants," *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 32, pp. 17-20, 2008.
- [27] K. D. Huynh, "Antibacterial activity of some medicinal plants in the Mekong Delta of Viet Nam against common fish pathogens," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 15b, pp. 222-229, 2010.
- [28] P. Rattanachaikunsopon and P. Phumkhachorn, "Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)," *Journal of Bioscience & Bioengineering*, vol. 107, no. 5, pp. 579-582, 2009.
- [29] D. S. K. Sivagnanam, M. Ram, and M. R. K. Rao, "In vitro inhibitory effects of *Annona glabra* on selected human pathogens," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 8, no. 1, pp. 1-6, 2016.
- [30] N. Canillac and A. Mourey, "Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria," *Food Microbiology*, vol. 18, no. 3, pp. 261-268, 2001.
- [31] B. Das, S. K. Dash, D. Mandal, T. Ghosh, S. Chattopadhyay, S. Tripathy, and S. Roy, "Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, no. 6, pp. 862-876, 2015.
- [32] C. Kamel, "Tracing modes of action and the roles of plant extracts in nonruminants," In: *Garmsworthy, P.C. and Wiseman, J., Eds., Recent Advances in Animal Nutrition*, Nottingham University Press, Nottingham, pp. 135-150, 2001.
- [33] T. T. H. Tran, C. T. Nguyen, C. D. Tran, and T. L. V. Tran, "Study on the anti-bacterial activities of extracts from sakae naa (*Combretum quadrangulare*) on diseased aquatic animals-bacteria under in vitro conditions," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 54, pp. 151-157, 2020.
- [34] J. M. Tomás, "The main *Aeromonas* pathogenic factors," *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, pp. 1-22, 2012.
- [35] D. Ceccarelli, N. A. Hasan, and R. R. Colwell, "*Vibrio parahaemolyticus*: a review of pathogenicity and implications for risk assessment," *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, pp. 1-13, 2013.
- [36] D. Gupta, R. Bharti, and P. Vishwakarma, "*Annona glabra* flavonoids act as antimicrobials by binding to *Pseudomonas aeruginosa* cell walls," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, pp. 1-9, 2016.
- [37] B. K. Diggles, G. A. Moss, J. Carson, and C. D. Anderson, "Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: *Palinuridae*) *phyllosoma* larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 43, pp. 127–137, 2000.
- [38] H. R. Vasanthi, N. ShriShriMal, and D. K. Das, "Phytochemicals from Plants to Combat Cardiovascular Disease," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, pp. 2242-2251, 2012.
- [39] R. Castro, J. Lamas, P. Morais, M. L. Sanmartín, F. Orallo, and J. Leiro, "Resveratrol modulates innate and inflammatory responses in fish leucocytes," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 126, pp. 9–19, 2008.
- [40] A. Scalbert, "Antimicrobial properties of tannins," *Phytochemistry*, vol. 30, no. 12, pp. 3875-3883, 1991.
- [41] K. Ahn, "The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs," *BMB Reports*, vol. 50, no. 3, pp. 111–116, 2017.