

NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC CÁC LOẠI THẢO DƯỢC VÀ KHẢO SÁT TỈ LỆ PHỐI TRỘN TẠO CHẾ PHẨM GIÚP PHÒNG NGỪA TIÊU CHẢY VÀ TĂNG KHỐI LƯỢNG CHO LỢN, GÀ

Phạm Hải Sơn, Nguyễn Văn Toàn, Nguyễn Thị Liễu, Bùi Lê Khả Tú, Nguyễn Thị Dung*

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành Phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: thuydung9810@gmail.com

Ngày nhận bài: 04.07.2023

Ngày chấp nhận đăng: 23.05.2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm khảo sát tỉ lệ phối trộn để tạo chế phẩm thảo dược từ sáu loại cao chiết là đinh hương, cam thảo bắc, xuyên tâm liên, gừng, diệp hạ châu, ôi nhằm hỗ trợ tăng khối lượng và phòng ngừa tiêu chảy trên lợn, gà. Thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp MIC, sàng lọc theo ma trận Plackett-Burman và đánh giá hiệu quả của chế phẩm thảo dược tạo thành trên lợn, gà. Kết quả khảo sát tỉ lệ phối trộn cho thấy đinh hương, cam thảo bắc và xuyên tâm liên với tỉ lệ phối trộn 1:1:1 cho hiệu quả kháng khuẩn MIC tốt nhất đạt 2,083 mg/ml trên cả *E. coli* và *Salmonella typhi*. Chế phẩm thảo dược sau khi thử nghiệm cho thấy lợn, gà tăng trưởng tốt và giảm hệ số FCR. Tỉ lệ sống ở lợn đạt 100% và gà đạt 98,44%. Kết quả còn cho thấy lợn sử dụng chế phẩm còn giúp lông mượt và vận động tốt hơn. Điều này cho thấy chế phẩm thảo dược tạo ra có tác dụng hỗ trợ sức đề kháng cho lợn và gà, giúp chúng khỏe mạnh, tăng khối lượng tốt nhờ vào các hoạt chất sinh học có trong các thảo dược được phối trộn trong chế phẩm.

Từ khóa: Chế phẩm thảo dược, gà, lợn, kháng khuẩn, tăng khối lượng, thảo dược.

Screening Herbs and Determining Their Mixing Ratio to Create a Product for Preventing Diarrhea and Improving Weight Gain for Pigs and Chickens

Abstract

The purpose of this study was to investigate the mixing ratio to create a herbal product from six types of extracts: *Syzygium aromaticum*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Andrographis paniculata*, *Zingiber officinale*, *Phyllanthus urinaria*, and *Psidium guajava* to support weight gain and prevent diarrhea in pigs and chickens. The antibacterial activity was evaluated using the MIC method, screened by the Plackett-Burman matrix, and the efficacy of the herbal product on pigs and chickens was assessed. The mixing ratio of herbs was screened by Plackett-Burman matrix. The results showed that the mixture of three extracts *Syzygium aromaticum*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Andrographis paniculata* mixed in a 1:1:1 ratio exhibited good antibacterial using MIC. The MIC was obtained at 2.083 mg/ml on *E. coli* và *S. typhimurium*. This herbal product formulation yielded better weight gain and disease prevention efficiency in both pigs and chickens. Results on disease preventive efficiency showed that the survival rate in pigs and chickens after 6 weeks was 100% and 98.44%, respectively. This indicates that the herbal product had significant effect on supporting the resistance of pigs and chickens and on improving weight gain for pigs and chickens due to the biologically active ingredients of herbs combined in the product.

Keywords: Antibacterial, chicken, gain weight, herbal, herbal product, pig.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành chăn nuôi đang đối mặt với một thách thức nghiêm trọng liên quan đến sự gia

tăng của sự kháng kháng sinh. Sự sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi không chỉ gây ra mối nguy cơ cho sức khỏe con người và môi trường, mà còn làm giảm đi hiệu quả của chúng

trong việc điều trị và phòng ngừa bệnh (World Health Organization, 2021). Tình trạng này càng nâng cao mối lo ngại về tương lai khi kháng sinh trở nên không còn hiệu quả trong việc kiểm soát các bệnh truyền nhiễm. Điều này đặt ra một nhu cầu quan trọng để tìm kiếm các giải pháp thay thế an toàn và hiệu quả cho kháng sinh trong ngành chăn nuôi.

Một hướng tiếp cận tiềm năng là sử dụng thảo dược như một phương pháp thay thế cho kháng sinh. Thảo dược tự nhiên chứa nhiều hoạt chất tự nhiên như các hợp chất phenolic (tannin và flavonoid). Việc sử dụng các loại thảo dược như đinh hương (*Syzygium aromaticum*), cam thảo bắc (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), gừng (*Zingiber officinale*), diệp hạ châu (*Herba Phyllanthi Urinariae*) và ổi (*Psidium guajava*) là một ví dụ điển hình cho tiềm năng này.

Các thảo dược đinh hương, cam thảo bắc, xuyên tâm liên, gừng, ổi, diệp hạ châu được sử dụng trong dân gian từ lâu đời ở Việt Nam như các bài thuốc cổ truyền có tác dụng giải độc, thanh nhiệt, rối loạn tiêu hóa, đầy bụng, tiêu chảy (Adedapo & cs., 2015; Lê Thị Bích Hiền & cs., 2018). Nhiều nghiên cứu khoa học cũng chứng minh các loại thảo dược này có với nhiều hoạt tính sinh học như hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa, hạ đường huyết, chống viêm, đầy hơi, khó tiêu và có thể kích thích sự thèm ăn và hỗ trợ tiêu hóa, chuyển hóa thức ăn cho vật nuôi (Nguyễn Thị Kim Loan, 2010). Nhiều hợp chất sinh học được tìm thấy trong các chiết xuất của thảo dược này như flavonoid, tanin, triterpen, saponins, phenol...

Các hoạt chất trong các thảo dược này hoạt động như các chất kháng những vi khuẩn đường ruột (Dorman & Deans., 2000); tăng tiêu hóa và hấp thụ chất dinh dưỡng (Oetting & cs., 2006a); tăng cường hấp thụ nitơ (Alçiçek & cs., 2004); cải thiện đáp ứng miễn dịch (Namkung & cs., 2004); hoạt động chống oxy hóa (Botsoglou & cs., 2002); có khả năng ức chế nhiều loại vi khuẩn Gram âm và Gram dương kể cả vi khuẩn đã kháng với nhiều loại kháng sinh.

Để tận dụng tiềm năng sinh học của các thành phần từ thảo dược, việc quyết định lựa chọn loại thảo dược và xác định tỷ lệ phối trộn

thích hợp là một thách thức quan trọng. Nghiên cứu này nhằm đánh giá, chọn lọc các cây thảo dược trên nhằm tìm ra công thức phối trộn tạo chế phẩm có hoạt tính kháng khuẩn mạnh và khả năng thúc đẩy tăng khối lượng cho lợn và gà, đáp ứng nhu cầu ngành chăn nuôi hiện nay. Qua đó, góp phần đưa ra một hướng đi mới trong việc sử dụng chế phẩm sinh học để thay thế kháng sinh, từ đó thúc đẩy sự bền vững trong ngành chăn nuôi và đảm bảo an toàn thực phẩm cho con người.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các thảo dược: đinh hương (ĐH), ổi (OI), diệp hạ châu (DHC), cam thảo bắc (CTB), gừng (G), xuyên tâm liên (XTL) được thu nhận ở Vườn thực nghiệm Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh và mua tại Thành phố Hồ Chí Minh (các loại thảo dược được sử dụng cùng một nguồn gốc, được thu hái cùng thời điểm, đảm bảo tính đồng nhất và đồng đều của mẫu). Các bộ phận của cây được sử dụng: cây đinh hương (nụ), diệp hạ châu (thân và lá), cam thảo bắc (thân rễ), xuyên tâm liên (nguyên cây), ổi (lá), gừng (củ), được thu hái, rửa sạch và sấy khô.

Chủng vi sinh vật: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 từ Ngân hàng chủng VSV Trung tâm Công nghệ sinh học TP.HCM.

Động vật thử nghiệm:

- Chuột nhắt trắng đực (chủng Swiss albino, 5-6 tuần tuổi, 20 ± 2 g) được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang và được để ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm.

- Gà Ri: ở 7 ± 2 ngày tuổi và được để ổn định ít nhất 1 tuần trước khi thử nghiệm được cung cấp bởi trang trại Tam Nông Quận 12.

- Lợn Duroc \times (Yorkshire \times Landrace): ở 60 ± 2 ngày tuổi được cung cấp bởi hộ chăn nuôi ở xã Phú Hòa Đông, huyện Củ Chi, TP HCM.

Hóa chất: Ethanol, Na_2CO_3 , Mueller Hinton agar (MHA) Brain Heart Infusion (BHI), Luria Bertani Broth (LB), resazurin đặt mua của Merck (Đức).

2.2. Thu nhận cao chiết

Mẫu thảo dược khô (có độ ẩm khoảng từ 15-17%) được xay nhỏ thành bột, sau đó cân 100g bột và chiết bằng phương pháp chiết ngâm (Zhang & cs., 2013) có chỉnh sửa với dung môi ethanol 96% theo tỉ lệ 1:10 (m/v) trong 24 giờ, ở nhiệt độ phòng. Quá trình chiết được lặp lại 3 lần. Dịch chiết sau đó được lọc qua máy lọc chân không (Merck Millipore) để loại cặn và được cô quay ở 50°C, áp suất 100mbar bằng máy cô quay (Buchi Rotavapor R-300) để thu nhận cao chiết. Cao chiết thu được có độ ẩm khoảng từ 10-15% và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Hiệu suất thu nhận cao chiết được tính theo công thức: $H\% = A/B \times 100$. Trong đó, A: khối lượng cao chiết (g), B: khối lượng mẫu thảo dược (g).

2.3. Định tính polyphenol và flavonoid

Các cao chiết được pha ở nồng độ 10 mg/ml để thực hiện định tính hàm lượng polyphenol và flavonoid bằng các phương pháp so màu với một số chỉnh sửa (Kamaruddin & cs., 2021; Pecal & Pyrzynska, 2014; Terletska & cs., 2022).

Định tính polyphenol bằng phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu: 3ml mẫu cao chiết được cho vào ống nghiệm, sau đó vài giọt Folin-Ciocalteu 10% và Na_2CO_3 20% được thêm vào. Sau khi lắc đều, dung dịch được quan sát để xác định sự hiện diện của polyphenol. Dung dịch chuyển sang màu xanh tím nếu chứa polyphenol. Nước cất được sử dụng làm đối chứng.

Định tính flavonoid bằng phản ứng với axit sulfuric (H_2SO_4): 3ml mẫu cao chiết được cho vào ống nghiệm, sau đó vài giọt axit sulfuric đậm đặc được thêm vào. Sau khi lắc đều, dung dịch được quan sát để xác định sự hiện diện của flavonoid. Nếu mẫu có chứa flavonoid, dung dịch sẽ chuyển sang màu vàng đậm; ngược lại, dung dịch sẽ không có màu hoặc có màu vàng nhạt. Nước cất được sử dụng làm đối chứng.

Định tính flavonoid bằng phản ứng với AlCl_3 : 3ml mẫu cao chiết được cho vào ống nghiệm, sau đó vài giọt AlCl_3 5% được thêm vào. Sau khi lắc đều, dung dịch được quan sát để xác định sự hiện diện của flavonoid. Dung dịch chuyển sang màu xanh lục nếu chứa flavonoid. Nước cất được sử dụng làm đối chứng.

2.3. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng MIC

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn được thực hiện bằng phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng để xác định MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB và được pha loãng đến mật độ 10^6 CFU/ml bằng nước muối sinh lý. Cao chiết thảo dược được pha loãng thành các nồng độ khác nhau theo tỉ lệ 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Mỗi giếng nhận 50µl dịch cao chiết và 50µl dịch khuẩn, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Tiếp theo, 20µl thuốc thử resazurin 0,01% được bổ sung, ủ tiếp ở 37°C trong 30 phút (Elshikh & cs., 2016). Dịch vi khuẩn và ethanol 50% được sử dụng làm đối chứng âm, ampicillin (50 mg/ml) được sử dụng làm đối chứng dương. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Ghi nhận giá trị MIC dựa trên sự đổi màu từ xanh sang hồng của dung dịch resazurin.

2.4. Khảo sát tỉ lệ phối trộn giữa các cao chiết để tạo chế phẩm

Sáu loại cao chiết được đánh giá bao gồm: ĐH, OI, DHC, CTB, G, XTL với độ hòa tan tối đa đạt 200 mg/ml. Khối lượng cao chiết từ 20-40mg được chọn để thử nghiệm. Phương pháp sàng lọc theo ma trận Plackett-Burman qua phần mềm JMP sẽ thiết lập được 13 nghiệm thức phối trộn giữa các cao chiết. Hiệu quả của các nghiệm thức được thể hiện qua giá trị kháng khuẩn MIC trên hai chủng vi khuẩn *Salmonella* và *E. coli*.

Ba cao chiết có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất được khảo sát tiếp bằng phương pháp MIC để chọn tỉ lệ phối trộn ngẫu nhiên để tạo chế phẩm thảo dược.

2.5. Xác định độc tính cấp trên chuột

Nghiên cứu độc tính cấp của mẫu cao chiết trên động vật thí nghiệm theo Đỗ Trung Đàm (2014), chủ yếu nhằm xác định liều chết trung bình nếu có (liều làm chết 50% số con vật thí nghiệm, gọi là LD50: lethal dose 50%) trong những điều kiện nhất định. Mười con chuột nhất chia thành các lô tương tự, những chuột ở cùng một lô sẽ nhận cùng một liều chất khảo

Nghiên cứu sàng lọc các loại thảo dược và khảo sát tỉ lệ phối trộn tạo chế phẩm giúp phòng ngừa tiêu chảy và tăng khối lượng cho lợn, gà

sát, từ liều cao nhất đến liều thấp nhất có thể uống được qua kim, chuột được uống mẫu thử trước khi cho ăn. Sự đánh giá dựa vào phản ứng toàn ứng hay bất ứng (sống hay chết) nhận thấy ở mỗi chuột trong nhóm sau 72 giờ. Nếu gặp trường hợp sau khi chuột uống mẫu thử liều cao nhất có thể qua đường uống, mà không có chuột thử nghiệm nào chết. Chuột được tiếp tục theo dõi sau 14 ngày uống để ghi nhận những triệu chứng bất thường (nếu có), với trường hợp này sẽ kết thúc thí nghiệm không cần phải thực hiện các lô thử nghiệm tiếp theo. Thể tích cho uống trong thử nghiệm là 20 ml/kg thể trọng chuột và không quá 0,5 ml/chuột.

2.6. Đánh giá hiệu quả của chế phẩm trên lợn, gà

Đối với thử nghiệm trên lợn, giống lợn Duroc × (Landrace × Yorkshire) cai sữa ở 60 ± 2 ngày tuổi có khối lượng trung bình khoảng 25 ± 2 kg, và bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức (NT), 10 con lợn/NT. Đối với thí nghiệm trên gà, giống gà Ri ở 7 ± 2 ngày tuổi có khối lượng trung bình 160 ± 30 g, được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 NT và 33 con/NT. Các nghiệm thức được lặp lại 2 lần, đảm bảo đồng đều về giống, tuổi, tình trạng sức khỏe, các điều kiện về chuồng trại, thức ăn và kỹ thuật chăm sóc nuôi dưỡng.

Bảng 1. Công thức thí nghiệm được bố trí theo ma trận Plackett-Burman trên phần mềm JMP cho sáu loại cao chiết

CT	DHC (mg)	CTB (mg)	OI (mg)	ĐH (mg)	XTL (mg)	G (mg)
1	20	20	20	40	20	20
2	20	20	40	20	20	40
3	20	20	40	20	40	40
4	20	40	20	20	40	20
5	20	40	20	40	40	40
6	20	40	40	40	20	20
7	30	30	30	30	30	30
8	40	20	20	20	40	20
9	40	20	20	40	20	40
10	40	20	40	40	40	20
11	40	40	20	20	20	40
12	40	40	40	20	20	20
13	40	40	40	40	40	40

Bảng 2. Thành phần dinh dưỡng của thức ăn hỗn hợp cho lợn và gà

Thành phần dinh dưỡng	Hàm lượng trong thức ăn cho lợn	Hàm lượng trong thức ăn cho gà
Protein thô (%) min	16	17,5
Độ ẩm (%) max	14	13
Canxi (%) min-max	0,4-1,2	3-4,5
P tổng số (%) min-max	0,4-1,2	0,5-1,1
Xơ thô (%) max	8	7
Lysine tổng số (%) min	0,8	0,9
Methionine + Cystine tổng số (%) min	0,4	0,7
Năng lượng trao đổi (Kcal/kg) min	3050	2700

Thức ăn được cung cấp đầy đủ trong suốt quá trình thử nghiệm. Các nghiệm thức được sử dụng NT1: Thức ăn hỗn hợp dành cho lợn, gà có bổ sung chế phẩm thảo dược; NT2: Thức ăn hỗn hợp dành cho lợn, gà có bổ sung chế phẩm thương mại Biovita Thảo Mộc Việt (chế phẩm có chứa curcumin, các thành phần như tỏi, quế, gừng); NT3: Thức ăn hỗn hợp dành cho lợn, gà. Thời gian theo dõi trong vòng 5 tuần. Sử dụng thức ăn hỗn hợp cho lợn và gà của công ty Rico Feed. Tỷ lệ chế phẩm bổ sung vào thức ăn hỗn hợp là 3g chế phẩm/1kg thức ăn hỗn hợp.

Đánh giá khả năng sinh trưởng qua các chỉ tiêu: Khối lượng, tăng khối lượng, lượng thức ăn thu nhận theo ngày, hệ số chuyển hóa thức ăn FCR. Đánh giá khả năng phòng ngừa bệnh qua các chỉ tiêu: Tỷ lệ mắc bệnh, tỷ lệ nuôi sống.

- Khối lượng: Mỗi con lợn, gà được cân bằng cân điện tử khi bắt đầu thử nghiệm, sau đó mỗi 1 tuần được cân một lần và được tính thành giá trị trung bình cho mỗi nghiệm thức.

- Tăng khối lượng toàn kỳ = Khối lượng trung bình cuối kỳ – khối lượng trung bình đầu kỳ.

- Tăng khối lượng bình quân = Tăng khối lượng toàn kỳ/Số ngày thử nghiệm.

- Lượng thức ăn thu nhận được xác định bằng cách cân tổng lượng thức ăn mỗi tuần/Tổng số lượng lợn, gà và được tính thành giá trị trung bình cho mỗi nghiệm thức.

- Hệ số chuyển hóa thức ăn FCR = Tổng lượng thức ăn đưa vào/Tăng khối lượng bình quân của lợn, gà.

- Tỷ lệ nuôi sống được tính bằng cách chia tổng số lượng con lợn hoặc gà còn sống cho tổng số con lợn hoặc gà ban đầu của mỗi nghiệm thức, sau đó nhân 100 để biểu diễn dưới dạng phần trăm.

Tỷ lệ nuôi sống (%) = (Tổng số con lợn, gà sống × 100)/Tổng số con lợn, gà ban đầu.

2.7. Xử lý số liệu

Số liệu thu được được xử lý sơ bộ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016, sàng lọc theo ma trận Plackett-Burman bằng phần mềm JMP Pro 13. Các tham số thống kê bao gồm:

lượng mẫu (n), trung bình cộng (Mean), độ lệch chuẩn (SD). Phân tích phương sai một yếu tố ANOVA, kiểm định LSD (Least Significant Difference) được sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa các trung bình nghiệm thức, được tính toán bằng chương trình Statgraphics Centurion XV.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu nhận cao chiết thảo dược

Kết quả hiệu suất thu nhận cao chiết từ 100g mẫu thảo dược mỗi loại được thể hiện ở bảng 3. Trong đó kết quả 4 mẫu cao chiết đỉnh hương, diệp hạ châu, ổi, gừng đã được công bố trên tuyến tập báo cáo toàn văn hội nghị CNSH toàn quốc 2019. Ngoài ra, nghiên cứu này có bổ sung thêm hai kết quả thu nhận của 2 mẫu cao chiết cam thảo bắc và xuyên tâm liên. Kết quả cho thấy mẫu diệp hạ châu và đỉnh hương có hiệu suất thu nhận khá cao. Các mẫu thảo dược còn lại có hiệu suất thu nhận dao động từ khoảng 3% đến 12%. Có thể nhận thấy, trên cùng một điều kiện tách chiết, các loại thảo dược khác nhau cho hiệu suất thu hồi khác nhau. Sự khác biệt về hiệu suất thu nhận cao chiết giữa các loại thảo dược là do nhiều nguyên nhân như thành phần cấu tạo của mỗi loại cây và bộ phận lấy mẫu, điều kiện thổ nhưỡng, độ tuổi của mẫu thảo dược khi thu thập, các yếu tố tác động đến quá trình tách chiết.

Bên cạnh đó kết quả định tính các thành phần trong các chiết thu nhận được cho thấy sự hiện diện của các hợp chất polyphenol và flavonoid, được thể hiện ở bảng 4.

3.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng MIC

Dựa vào kết quả trên hình 1, cao chiết đỉnh hương cho hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất ở trên cả 2 chủng vi khuẩn khảo sát. Cao chiết cao thảo bắc và diệp hạ châu có hoạt tính kháng khuẩn tốt thứ hai. Cao chiết xuyên tâm liên và ổi có giá trị MIC dao động từ 12,5-25 mg/ml. Giá trị MIC thấp nhất trong sáu loại thảo dược khảo sát là cao gừng.

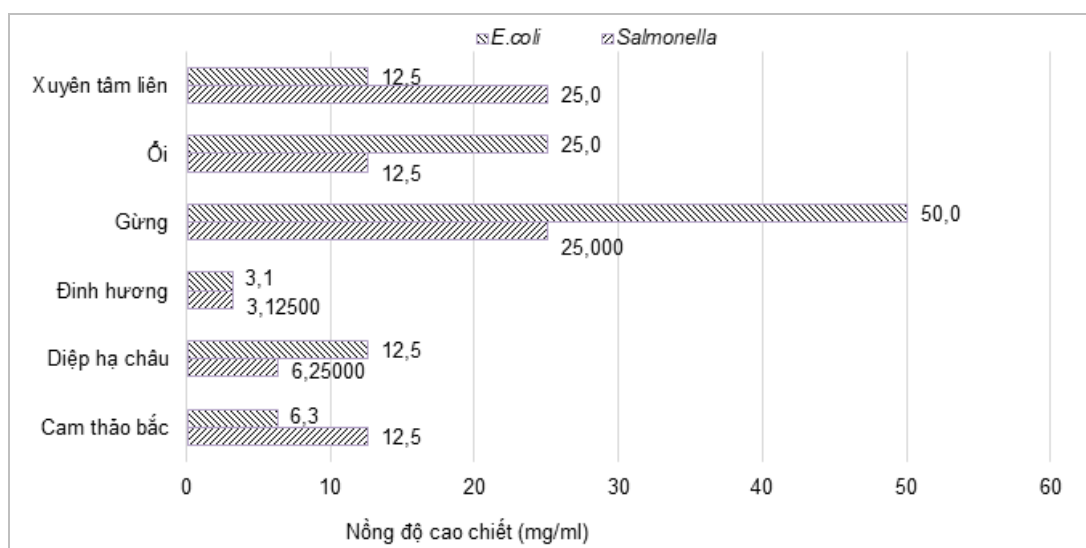
Nghiên cứu sàng lọc các loại thảo dược và khảo sát tỉ lệ phối trộn tạo chế phẩm giúp phòng ngừa tiêu chảy và tăng khối lượng cho lợn, gà

Bảng 3. Hiệu suất thu nhận cao chiết

Tên thảo dược	Tên khoa học	Hiệu suất (%)	Tài liệu trích dẫn
Diệp Hạ Châu	<i>Phyllanthus urinaria</i>	24,26 ± 0,37	Nguyễn Thị Dung & cs. (2019)
Đinh hương	<i>Syzygium aromaticum</i>	22,36 ± 5,2	
Ồi	<i>Psidium guajava</i>	8,71 ± 0,48	
Gừng	<i>Zingiber officinale</i>	3,93 ± 0,15	
Cam thảo bắc	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	11,4 ± 0,57	
Xuyên tâm liên	<i>Andrographis paniculata</i>	5,87 ± 0,19	

Bảng 4. Kết quả định tính polyphenol và flavonoid bằng các phương pháp so màu

Tên thảo dược	Định tính polyphenol		Định tính flavonoid	
	Folin-Ciocalteu	AlCl ₃	H ₂ SO ₄ đđ	
Diệp Hạ Châu	++	+	+++	
Đinh hương	+++	+++	++	
Ồi	++	+	++	
Gừng	+	+	+	
Cam thảo bắc	++	++	+	
Xuyên tâm liên	++	++	+	

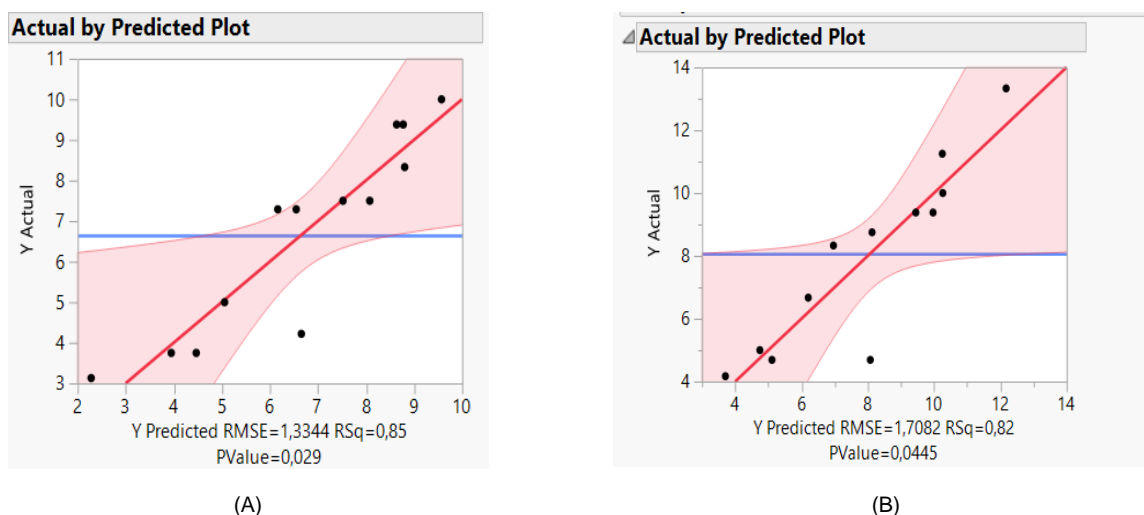


Hình 1. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC của các mẫu cao chiết

3.3. Kết quả khảo sát tỉ lệ phối trộn của các cao thảo dược tạo chế phẩm

Sàng lọc theo ma trận Plackett-Burman, qua phần mềm JMP đã thiết lập được 13 nghiệm thức phối trộn giữa các cao chiết, kết quả cho ra phương trình hồi quy của mô hình

bề mặt đáp ứng trên chuẩn *Salmonella* và *E.coli* lần lượt như sau như sau: $Y = 6,655 + 8,153X1 - 1,127X2 - 1,407X4 - 1,025X5$ và $Y = 8,078 - 1,5X1 - 1,641X4$ (với X1, X2, X3, X4, X5, X6 là các biến biểu thị khối lượng của từng loại cao chiết lần lượt là DHC, CTB, OI, ĐH, XTL, G.).



Ghi chú: A: Kết quả trên *Salmonella* ($R^2 = 0,85$; $P_{value} = 0,029 < 0,05$); B: Kết quả trên *E.coli* ($R^2 = 0,82$; $P_{value} = 0,044 < 0,05$).

Hình 2. Đồ thị thể hiện mối tương quan giữa hiệu quả kháng khuẩn theo MIC thu được trên thực tế và mô hình dự đoán

Source	LogWorth	PValue	Source	LogWorth	PValue
DH(20,40)	1,800	0,01586	DH(20,40)	1,971	0,01068
CTB(20,40)	1,644	0,02270	CTB(20,40)	1,577	0,02646
XTL(20,40)	1,176	0,06673	XTL(20,40)	1,426	0,03748
DHC(20,40)	0,489	0,32447	DHC(20,40)	0,997	0,10067
Gung(20,40)	0,339	0,45821	OI(20,40)	0,081	0,82945
OI(20,40)	0,006	0,98577	Gung(20,40)	0,016	0,96358

Hình 3. Tổng hợp hiệu quả kháng khuẩn MIC của các cao chiết trên chủng *E. coli* (trái) và *Salmonella* (phải)

Kết quả hình 2 cho thấy giá trị MIC trên *Salmonella* và *E. coli* thu được từ thực tế giống với mô hình dự đoán với độ tin cậy lần lượt là 85% và 82%. Do phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC cho độ tin cậy không cao. Tuy vậy, với hàm lượng các cao chiết và các tỉ lệ phối trộn cao chiết khác nhau đều ảnh hưởng có ý nghĩa ($P < 0,05$) đến hiệu quả kháng khuẩn MIC trên cả hai chủng *Salmonella* và *E. coli* lần lượt là $P = 0,029$ và $P = 0,044$

Kết quả hình 3 cho thấy cao chiết đinh hương, cam thảo bắc và xuyên tâm liên tác động nhiều nhất đến hiệu quả kháng khuẩn MIC trên cả hai chủng là *Salmonella* và *E. coli*. Điều này chứng tỏ công thức phối trộn có chứa cao chiết đinh hương, xuyên tâm liên, cam thảo bắc cho hiệu quả kháng khuẩn tốt hơn.

Ba cao chiết đinh hương, xuyên tâm liên, cam thảo bắc được khảo sát tiếp để xác định tỉ lệ đưa vào chế phẩm. Tỉ lệ 1:2:5 của các công thức được bố trí phối trộn ngẫu nhiên 7 công thức phối trộn (Bảng 5) và đánh giá qua chỉ tiêu MIC trên chủng *E. coli*.

Kết quả thể hiện ở bảng 5 cho thấy hiệu quả kháng khuẩn trên CT1 và CT2 là tốt nhất với giá trị MIC đều bằng 2,083 mg/ml. Đồng thời so sánh với kết quả khảo sát MIC với từng loại cao chiết ở hình 4 thì MIC đinh hương, cam thảo bắc và xuyên tâm liên đều thấp hơn so với khi tiến hành phối trộn các cao chiết lại với nhau. Chứng tỏ việc phối trộn các cao chiết lại với nhau giúp tăng sự hỗ trợ các thành phần hoạt chất kháng khuẩn trong công thức, từ đó tăng hoạt tính kháng khuẩn. Tuy nhiên giá thành của nụ đinh hương khô theo thị trường là

Nghiên cứu sàng lọc các loại thảo dược và khảo sát tỉ lệ phối trộn tạo chế phẩm giúp phòng ngừa tiêu chảy và tăng khối lượng cho lợn, gà

khoảng giao động từ 350.000-400.000 đ/kg còn của xuyên tâm liên và cam thảo bắc khô là khoảng 150.000-200.000 đ/kg. Nếu chọn CT2 (ĐH:CTB:XTL 5:1:1) thì chi phí sản xuất sẽ lớn, từ đó giá thành sản xuất sẽ cao. Do đó, để đạt hiệu quả tối ưu và giảm giá thành sản phẩm, chúng tôi lựa chọn CT1 làm công thức sản xuất chế phẩm thảo dược.

3.4. Kết quả khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột của chế phẩm thảo dược

Bảng 6 ghi nhận kết quả khảo sát độc tính cấp đường uống của mẫu chế phẩm thảo dược. Sau khi cho chuột uống ở liều cao nhất có thể

hòa tan qua kim mà không làm chết chuột ở liều 15,46 g/kg thể trọng chuột còn gọi là D_{max} . Theo dõi chuột thử nghiệm trong vòng 72 giờ sau khi cho uống, nhận thấy chuột không có biểu hiện hành vi bất thường và sinh hoạt bình thường. Theo dõi tiếp tục trong 14 ngày, các chuột đều sinh hoạt bình thường. Như vậy, mẫu chế phẩm thảo dược không có độc tính cấp trên đường uống. Từ $D_{max} = 15,46$ g/kg suy ra được liều tương đối an toàn D_s trong các thực nghiệm được lý có thể bằng $1/5 D_{max} = 3,092$ g/kg. Do đó chọn tỷ lệ phối trộn tối đa 3,092g chế phẩm/1kg thức ăn hỗn hợp để tiến hành thử nghiệm hiệu quả của chế phẩm thảo dược trên lợn và gà.

Bảng 5. Tỷ lệ phối trộn giữa các cao chiết

Tỷ lệ phối trộn giữa các cao chiết	Trung bình MIC (mg/ml)
CT1 (ĐH:CTB:XTL 1:1:1)	2,083
CT2 (ĐH:CTB:XTL 5:1:1)	2,083
CT3 (ĐH:CTB:XTL 1:5:1)	5,208
CT4 (ĐH:CTB:XTL :1:1:5)	8,333
CT5 (ĐH:CTB:XTL :1:2:2)	2,604
CT6 (ĐH:CTB:XTL :1:1:2)	2,604
CT7 (ĐH:CTB:XTL :1:2:1)	2,604

Bảng 6. Kết quả khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột của mẫu chế phẩm thảo dược

Lần thử nghiệm	I	II
Tổng thể tích cho uống (ml)	6,46	6,48
Liều cho uống (g/kg)	15,48	15,43
Số chuột thử nghiệm (con)	5	5
Số chuột tử vong sau 72 giờ	0	0
Số chuột tử vong sau 14 ngày	0	0
D_{max} (g/kg)	15,46	

Bảng 7. Kết quả các chỉ tiêu theo dõi sau khi thử nghiệm trên lợn

Chỉ tiêu	n	NT1	NT2	NT3
		Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Tổng số vật nuôi (con)	10	10	10	10
Khối lượng ban đầu (kg)	10	25,20 \pm 1,03	25,03 \pm 1,34	24,98 \pm 1,43
Khối lượng khi kết thúc (kg)	10	58,25 ^a \pm 3,33	54,35 ^b \pm 2,38	55,4 ^b \pm 2,41
Tăng khối lượng bình quân ADG (kg/ngày)	10	0,944 \pm 0,089	0,838 \pm 0,084	0,871 \pm 0,121
Lượng thức ăn thu nhận (LTATN) (kg/con/ngày)	1	1,729	1,786	1,829
Hệ số chuyển hóa thức ăn FCR	1	1,621	1,836	1,878

Ghi chú: Trong cùng một hàng, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Bảng 8. Kết quả các chỉ tiêu theo dõi sau khi thử nghiệm trên gà

Chỉ tiêu	n	NT1	NT2	NT3
		Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Tổng số vật nuôi (con)	20	33	33	33
Khối lượng ban đầu (g)	20	166,63 ± 21,09	168,06 ± 23,11	162,72 ± 18,64
Khối lượng khi kết thúc (g)	20	692,35 ^a ± 128,39	689,40 ^a ± 111,90	577,46 ^b ± 115,24
Tăng khối lượng bình quân ADG (g/ngày)	20	15,021 ± 1,931	14,895 ± 2,878	11,85 ± 1,906
Lượng thức ăn thu nhận (LTATN) (g/ngày/con)	1	99,08	99,05	91,84
Hệ số chuyển hóa thức ăn FCR	1	4,16	4,37	4,5

Ghi chú: Trong cùng một hàng, Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

3.5. Đánh giá hiệu quả của chế phẩm trên lợn

Theo bảng 7, khối lượng cuối kỳ của NT1, NT2 và NT3 khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) cho thấy nghiệm thức lợn ăn thức ăn hỗn hợp có bổ sung chế phẩm thảo dược giúp lợn tăng khối lượng cao hơn so với nghiệm thức bổ sung chế phẩm thương mại và không sử dụng chế phẩm.

Các giá trị của tăng khối lượng bình quân ADG và hệ số chuyển hóa thức ăn sau 5 tuần theo kết quả bảng 7 đều cho thấy nghiệm thức lợn sử dụng chế phẩm thảo dược tốt hơn so với hai nghiệm thức còn lại. Tuy vậy, lượng thức ăn thu nhận (LTATN) trung bình mỗi ngày ở tuần 6 không khác nhau đáng kể ($P \geq 0,05$). Điều này cho thấy mùi vị và màu sắc của chế phẩm khi trộn vào thức ăn không làm ảnh hưởng đến sức ăn và tính ngon miệng của lợn ở các nghiệm thức. Kết quả này cũng cho thấy hệ số chuyển hóa thức ăn thấp hơn và tăng khối lượng ADG cao hơn so với nghiên cứu của Phạm Sỹ Tiếp & cs. (2008). Nghiên cứu của họ có hệ số FCR đạt 2,43-2,63 và tăng khối lượng là từ 648,8-650,6 g/ngày với các công thức phối trộn thảo dược từ mạch nha, sơn tra, thân khúc. Điều này cho thấy khi lợn ăn có bổ sung chế phẩm thảo dược ở NT1 không những giúp tăng khối lượng tốt mà còn tiết kiệm hơn lượng thức ăn.

Đồng thời, trong quá trình thử nghiệm, lợn ở cả ba nghiệm thức đều có tỷ lệ sống đạt 100%. Bên cạnh đó, ở nghiệm thức bổ sung chế phẩm thảo dược vào thức ăn thì đàn lợn có lông bóng mượt và vận động tốt hơn so với hai nghiệm thức còn lại.

3.6. Đánh giá hiệu quả của chế phẩm trên gà

Kết quả bảng 8 cho thấy khối lượng cuối kỳ trung bình ở gà của NT1 tương đương NT2 và cao hơn NT3 có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) chứng tỏ nghiệm thức sử dụng thức ăn hỗn hợp có bổ sung chế phẩm thảo dược giúp gà tăng khối lượng cao hơn ở nghiệm thức không sử dụng chế phẩm và tương đương với nghiệm thức sử dụng chế phẩm thương mại. Với chỉ số tăng khối lượng bình quân ADG của NT1 sử dụng chế phẩm thảo dược đạt 15,021 cao hơn NT2 là nghiệm thức đối chứng là 11,85 g/ngày cho thấy chế phẩm thảo dược góp phần hỗ trợ tăng trưởng trên gà, giúp gà lớn nhanh hơn. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Đặng Hồng Quyên & cs. (2022) khi bổ sung chế phẩm nano từ thảo dược vào thức ăn thì khối lượng gà lai F1 (Mía × Lương Phượng) đạt 848,01g ở tuần thứ 6 cao hơn so với đối chứng không bổ sung chế phẩm đạt 795,66g. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hải & cs. (2018) cũng cho thấy khi sử dụng chế phẩm dược liệu Jikangning cũng giúp gà tăng khối lượng hiệu quả hơn.

Trong quá trình thử nghiệm, tỉ lệ nuôi sống sau 5 tuần ở NT1, NT2 và NT3 lần lượt đạt 98,44%; 95,31% và 89,06%. Điều này chỉ ra rằng việc sử dụng chế phẩm thảo dược bổ sung vào thức ăn có thể giúp cải thiện sức khỏe, tăng cường sức đề kháng cho gà, và tăng khả năng nuôi sống. Tương đồng với nghiên cứu của Đặng Hồng Quyên & cs. (2022) khi bổ sung chế phẩm nano thảo dược cho tỉ lệ nuôi sống ở gà là 97,67% cao hơn so với đối chứng là 93,33%. Ngoài ra, để có thể đạt tỉ lệ nuôi sống cao như

Nghiên cứu sàng lọc các loại thảo dược và khảo sát tỉ lệ phối trộn tạo chế phẩm giúp phòng ngừa tiêu chảy và tăng khối lượng cho lợn, gà

vậy cần phải chăm sóc nuôi dưỡng, vệ sinh và giữ cho chuồng trại luôn sạch sẽ, khô ráo thì việc phòng trị bệnh mới đạt được hiệu quả cao.

4. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu cho thấy rằng sự kết hợp của ba cao chiết là đinh hương, cam thảo bắc và xuyên tâm liên theo tỉ lệ 1:1:1 có tiềm năng tạo thành chế phẩm thảo dược cho hiệu quả tốt trong việc tăng khối lượng và hỗ trợ phòng ngừa bệnh trên lợn, gà. Tuy vậy, nghiên cứu chỉ mới thử nghiệm ở quy mô nhỏ chuồng trại nhỏ, cần thử nghiệm trên các mô hình trại chăn nuôi lớn hơn để đánh giá thêm về tính hiệu quả. Bên cạnh đó cần tối ưu hóa thêm các điều kiện tách chiết thu cao nhằm tiết kiệm tối đa chi phí và tăng thêm tính cạnh tranh cho chế phẩm khi thương mại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adedapo A.A., Adeoye B.O., Sofidiya M.O. & Oyagbemi A.A. (2015). Antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory properties of the aqueous and ethanolic leaf extracts of *Andrographis paniculata* in some laboratory animals. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 26(4): 327-334.
- Alçiçek A., Bozkurt M. & Çabuk M. (2004). The Effect of a Mixture of Herbal Essential Oils, an Organic Acid, or a Probiotic on Broiler Performance. *South African Journal of Animal Science*. 34: 217-222.
- Botsoglou N.A., Florou-Paneri P., Christaki E., Fletouris D.J. & Spais A.B. (2002). Effect of Dietary Oregano Essential Oil on Performance of Chickens and on Iron-Induced Lipid Oxidation of Breast, Thigh, and Abdominal Fat Tissues. *British Poultry Science*. 43: 223-230.
- Đặng Hồng Quyên, Tô Hữu Dưỡng & Nguyễn Thị Thanh Hải (2022). Hiệu quả của việc bổ sung chế phẩm nano thảo dược đến khả năng sinh trưởng và hiệu quả kinh tế của gà lai F1 (Mía × Lương Phượng). *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Chăn nuôi*. 283: 49-55.
- Đỗ Trung Đàm (2014). Phương pháp xác định độc tính của thuốc. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội. tr. 40-59.
- Dorman H.J.D. & Deans S.G. (2000). Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308-316.
- Elshikh M., Ahmed S., Funston S., Dunlop P., McGaw M., Marchant R. & Banat I.M. (2016) Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*. 38(6): 1015-9.
- Kamaruddin H.S., Angriani A., & Sabandar C.W. (2021). Determination of Polyphenol Content in Sawo Fruit (*Manilkara zapota*) Based on Geographical Location. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. 5(3): 239-244.
- Lê Thị Bích Hiền, Lê Thị Minh Quý, Nguyễn Lê Lam Thủy & Nguyễn Thị Hoà. (2018). Nghiên cứu quy trình chiết xuất, thành phần hóa học và tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu gừng ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Y Dược Huế - Trường Đại học Y dược Huế*. 8(3): 24-30.
- Namkung H., Li M., Gong J., Yu H., Cottrill M. & de Lange C.F.M. (2004). Impact of Feeding Blends of Organic Acids and Herbal Extracts on Growth Performance, Gut Microbiota, and Digestive Function in Newly Weaned Pigs. *Canadian Journal of Animal Science*. 84: 697-704.
- Nguyễn Thị Dung, Phạm Hải Sơn, Lê Thị Huyền, Đoàn Thị Tám, Lưu Thị Phương Thảo, Nguyễn Văn Toàn & Nguyễn Đăng Quân (2019). So sánh hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ một số cây thảo dược. *Tuyển tập báo cáo toàn văn - Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. HS-021: 134-138.
- Nguyễn Thị Kim Loan. (2010). Hiệu quả sử dụng tỏi, nghệ trong khẩu phần thức ăn lợn nuôi thịt. *Tạp chí Khoa Học Kỹ thuật Chăn nuôi*. 3(132): 2-12.
- Nguyễn Thị Thanh Hải, Đoàn Văn Soạn, Phạm Thanh Hà & Đỗ Thị Thu Hương. (2018). Hiệu quả sử dụng chế phẩm dược liệu jì kang ning đến tốc độ sinh trưởng và sức kháng bệnh của gà thịt. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, XXV(6): 83-88.
- Oetting L., Utiyama C., Gianì P., R U., & Miyada, V. (2006). Effects of Antimicrobials and Herbal Extracts on Intestinal Microbiology and Diarrhea Incidence in Weanling Pigs. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35: 2013-2017.
- Pękal A., & Pyrzyńska K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods*. 7: 1776-1782.
- Terletskaia N.V., Seitimova G.A., Kudrina N.O., Meduntseva N.D., & Ashimuly K. (2022). The Reactions of Photosynthetic Capacity and Plant Metabolites of *Sedum hybridum* L. in Response to Mild and Moderate Abiotic Stresses. *Plants*. 11(6): 828.
- World Health Organization (2021). *Antimicrobial Resistance*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> on June 28, 2023.
- Zhang L., Ravipati A.S., Koyyalamudi S.R., Jeong S.C., Reddy N., Bartlett J., Smith P.T., Mercedes C., Maria C.M., Angeles M., Ester J. & Vicente F. (2013). Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6(9): 673-681.