

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT, THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN CỦA TINH DẦU GỪNG Ở THỪA THIÊN HUẾ

Lê Thị Bích Hiền, Lê Thị Minh Quý, Nguyễn Lê Lam Thủy, Nguyễn Thị Hoài
Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Tinh dầu Gừng từ lâu được sử dụng rộng rãi trong các ngành thực phẩm và dược phẩm nhờ tác dụng chống nôn, trị đau bụng, khó tiêu, tiêu chảy... Đề tài nhằm mục tiêu chiết xuất, xác định thành phần hóa học, hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đối tượng: Thân rễ cây Gừng. Phương pháp nghiên cứu: phương pháp cất kéo hơi nước, phương pháp sắc ký khí - khối phổ, phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch. **Kết quả:** Quy trình chiết xuất: nguyên liệu được xay thành bột nửa mịn, chiết xuất trong 3 giờ, tỷ lệ dung môi - nguyên liệu 3:1, với nguyên liệu trong vòng 10 ngày kể từ khi thu hoạch. Tinh dầu Gừng gồm 16 thành phần, trong đó thành phần chính là Alpha-zingerberene. Tinh dầu Gừng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên 2 chủng *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis* với giá trị MIC 43,8 mg/ml. **Kết luận:** Đề tài đã góp phần xác định quy trình chiết xuất, thành phần hóa học và tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế.

Từ khóa: Tinh dầu Gừng, kháng khuẩn, chiết xuất, Alpha-zingerberene, *Zingiber officinale*.

Abstract

STUDY ON EXTRACTION PROCESS, CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GINGER OIL IN THUA THIEN HUE

Le Thi Bich Hien, Le Thi Minh Quy, Nguyen Le Lam Thuy, Nguyen Thi Hoai
Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy

Background: Ginger oil has long been used in the food and pharmaceutical industries to cure vomiting, abdominal pain, dyspepsia, diarrhea... The subject aims to extract, determine chemical composition and antibacterial activity of ginger oil in Thua Thien Hue. **Materials and method:** Materials: Rhizomes of *Zingiber officinalis*. Method: hydrodistillation method, gas chromatography and mass spectrometry analysis, and diffusion method on agar-agar disk. **Results:** Extraction process: Materials was milled to semi-fine powder, extracted in 3 hours, solvent-materials ratio was 3:1, with material within 10 days of harvesting. GC-MS analysis revealed 16 constituents in the ginger oil, in which the main component was Alpha-zingerberene. Ginger oil possessed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* with the same MIC values of 43.8 mg/ml. **Conclusion:** The results were contributed to determine extraction process, chemical composition and antibacterial activity of ginger oil in Thua Thien Hue.

Key words: Ginger oil, antibacterial, extraction, Alpha-zingerberene, *Zingiber officinale*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ VÀ MỤC TIÊU

Cây Gừng có tên khoa học *Zingiber officinale* (Willd.) Roscoe, thuộc họ Gừng - Zingiberaceae. Loài cây thảo dược này được trồng từ rất lâu đời ở Việt Nam, khắp các địa phương từ vùng núi cao đến vùng đồng bằng. Gừng không chỉ được sử dụng như một loại gia vị thông dụng mà còn là một loại thuốc quý với nhiều công dụng khác nhau. Gừng đã được sử dụng trong nhiều thế kỷ để điều trị cảm lạnh, sốt, rối loạn tiêu hóa, đầy hơi khó

tiêu, có tác dụng giảm đau, chống nôn, chống tiêu chảy... Ngày nay, tinh dầu gừng được sử dụng rộng rãi trong chế biến thực phẩm và dược phẩm vì có tác dụng chống say tàu xe, chống nôn, trị đau bụng, khó tiêu, tiêu chảy... Một số nghiên cứu dược lý cho thấy tinh dầu gừng còn có khả năng chống oxy hóa, kháng viêm, ức chế tế bào ung thư [4], [8].

Cho đến nay, ở nước ta chưa có nghiên cứu hoàn chỉnh nào về quy trình chiết xuất, thành phần hóa học cũng như tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu

Gừng ở Thừa Thiên Huế. Chính vì vậy nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài **“Nghiên cứu quy trình chiết xuất, thành phần hóa học và tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế”** nhằm mục tiêu xác định các điều kiện tối ưu của quy trình chiết xuất, xác định thành phần hóa học và tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu Gừng.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là thân rễ cây Gừng được thu hái tại phường Thủy Xuân, thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế. Nguyên liệu sau khi thu hái về rửa sạch, loại bỏ phần hư hỏng để chiết xuất và nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất

Thân rễ cây Gừng sau khi thu hái, xử lý được tiến hành chiết xuất tinh dầu bằng phương pháp cất kéo hơi nước [1]. Tinh dầu sau khi cất kéo được làm khan nước bằng Na_2SO_4 khan.

2.2.2. Phương pháp khảo sát các yếu tố ảnh hưởng quy trình chiết xuất

Khối lượng nguyên liệu cho mỗi lần khảo sát là 1 kg, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Trong quá trình khảo sát 1 yếu tố bất kỳ, cố định các yếu tố còn lại để quá trình khảo sát có kết quả khách quan và chính xác. Căn cứ vào thể tích tinh dầu thu được để xác định các điều kiện chiết xuất tối ưu. Tiến hành khảo sát các yếu tố sau:

2.2.2.1. Ảnh hưởng của thời gian chiết: Tiến hành khảo sát các mốc thời gian: 90, 120, 150, 180, 210 và 240 phút.

2.2.2.2. Ảnh hưởng của độ mịn nguyên liệu: Khảo sát nguyên liệu ở các độ mịn khác nhau: mẫu bột thô (bột có không ít hơn 95% phần tử qua được rây số 1400 và không quá 40% qua được rây số 355), mẫu bột nửa mịn (bột có không ít hơn 95% phần tử qua được rây số 355 và không quá 40% qua được rây số 180).

2.2.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi - nguyên liệu: Khảo sát các tỷ lệ dung môi nguyên liệu 2:1, 3:1, 4:1, 5:1.

2.2.2.4. Ảnh hưởng của thời gian sau thu hoạch: Khảo sát các mốc thời gian như sau: ngày đầu tiên sau thu hoạch, ngày 4, ngày 7, ngày 10, ngày 13, ngày 16.

Phân tích thống kê số liệu: Các kết quả thực nghiệm được phân tích bằng phần mềm SPSS version 22. Mỗi thí nghiệm được thực hiện trong 3 lần. Phương pháp phân tích phương sai (ANNOVA) với kiểm định LSD được sử dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các giá trị trung bình.

2.2.3. Phương pháp xác định thành phần hóa học

Thành phần hóa học của tinh dầu Gừng được xác định dựa trên hệ thống sắc ký khí kết hợp khối phổ GC-MS Shimadzu GC2010 [2]. Điều kiện phân tích: cột sắc ký DB5ms 30 m x 0,25 mm, độ dày phim 0,25 μm . Nhiệt độ hóa hơi mẫu 250°C. Khí mang Heli, tốc độ dòng 118,6 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu 1 μl , độ chia dòng 50.0. Nhận dạng các cấu tử trong tinh dầu bằng cách so sánh các dữ liệu phổ MS với phổ chuẩn trong thư viện phổ WILEY7. Xác định tỉ lệ % (theo khối lượng) các chất theo diện tích pic trên sắc ký đồ.

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch [1], [10]. Các chủng vi khuẩn bao gồm: *S. aureus* ATCC 6538, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 8739 và *P. aeruginosa* ATCC 9027. Các chủng vi khuẩn là các chủng vi sinh làm việc của phòng Vi sinh, Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Thừa Thiên Huế.

Các chủng vi khuẩn được cấy vào môi trường thạch dinh dưỡng với nồng độ thích hợp trên các đĩa petri. Tinh dầu Gừng được hòa tan trong dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO) ở các nồng độ khác nhau, sau đó được cho vào các lỗ đục trên các môi trường thạch đã cấy vi khuẩn. Tương tự thực hiện với mẫu đối chứng dương là gentamycin hòa tan trong DMSO ở nồng độ 0,4 mg/ml. Các đĩa sau đó được ủ ở 37°C trong 16-18h. Đo đường kính các vòng vô khuẩn bằng thước Palmer có độ chính xác đến 0,1 mm. Mỗi thí nghiệm được độc lập lặp lại 3 lần. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được xác định là nồng độ thấp nhất làm xuất hiện vòng vô khuẩn.

3. KẾT QUẢ, BÀN LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu quy trình chiết xuất và thành phần hóa học

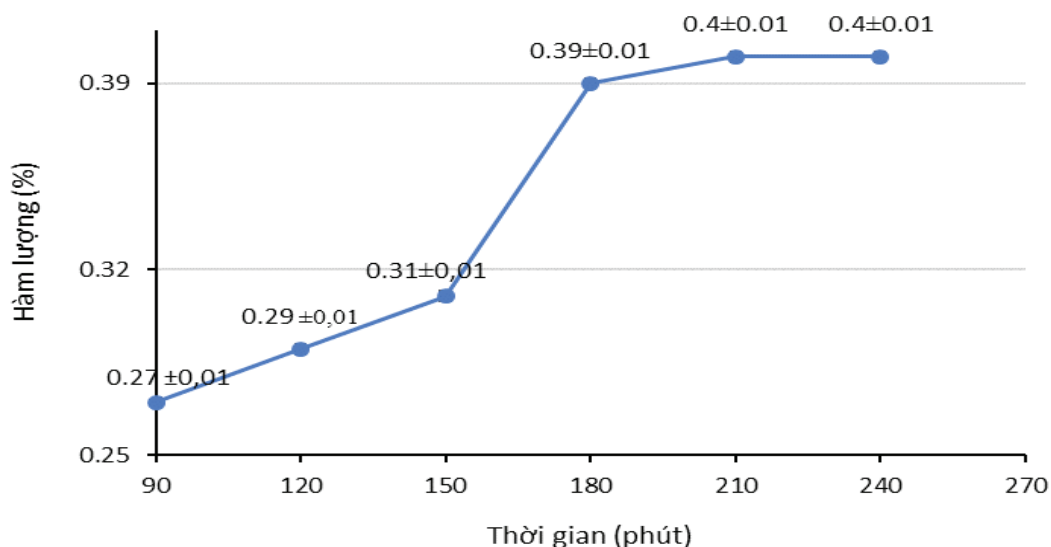
3.1.1. Xác định các chỉ số vật lý của tinh dầu Gừng

Tinh dầu Gừng thu được là chất lỏng, có màu vàng nhạt, trong suốt, có mùi thơm mạnh đặc trưng của gừng, vị cay. Kết quả xác định các chỉ số vật lý như sau:

- Tỷ trọng: $0,875 \pm 0,001$
- Năng suất quay cực: $-39,372 \pm 0,002$
- Chỉ số khúc xạ: $1,488 \pm 0,002$

3.1.2. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng quy trình chiết xuất tinh dầu Gừng

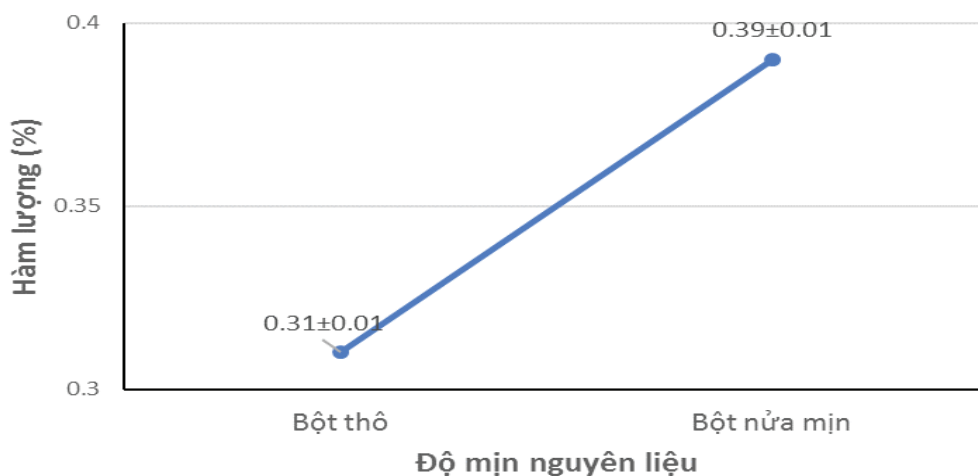
3.1.2.1. Ảnh hưởng của thời gian chiết



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng tinh dầu

Hàm lượng tinh dầu thu được khi chiết trong thời gian 180 phút nhiều hơn so với khi chiết trong các khoảng thời gian ngắn hơn. Khi tăng thời gian chiết lên 210 phút và 240 phút, hàm lượng tinh dầu thu được tăng lên nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Như vậy thời gian chiết xuất tinh dầu tối ưu là 180 phút.

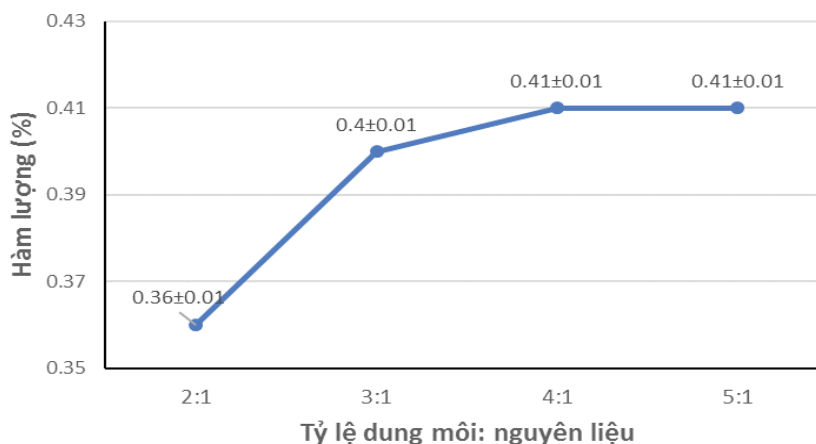
3.1.2.2. Ảnh hưởng của độ mịn nguyên liệu



Hình 2. Ảnh hưởng của độ mịn nguyên liệu đến hàm lượng tinh dầu

Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng tinh dầu thu được khi chiết với nguyên liệu bột thô là 0,31%, thấp hơn hẳn so với khi chiết với nguyên liệu bột nửa mịn (hàm lượng đạt 0,39%). Vì vậy muốn đạt hiệu suất cao ta nên dùng nguyên liệu bột nửa mịn để chiết xuất.

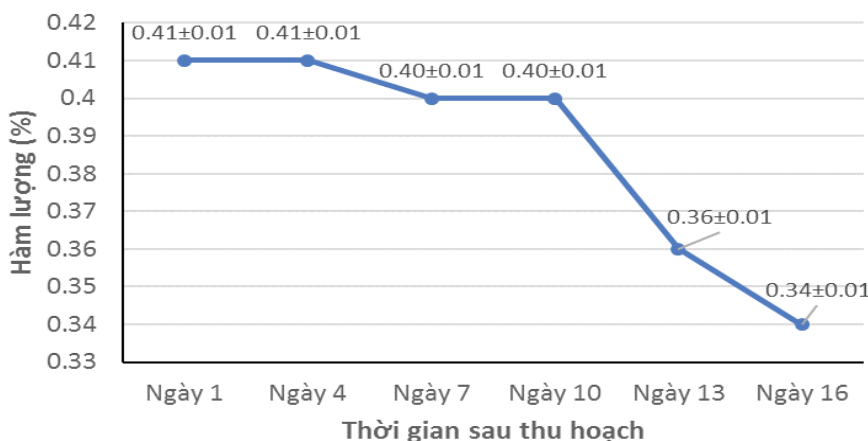
3.1.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi - nguyên liệu



Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi - nguyên liệu đến hàm lượng tinh dầu

Kết quả khảo sát cho thấy nên lựa chọn tỷ lệ dung môi - nguyên liệu tối ưu là 3:1, vì khi tăng tỷ lệ này lên 4:1 và 5:1 thì hàm lượng tinh dầu thu được tăng lên nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Theo đó, ta vừa thu được thể tích tinh dầu lớn nhất vừa tiết kiệm được nhiên liệu và dung môi dùng cho quá trình chiết xuất.

3.1.2.4. Ảnh hưởng của thời gian sau thu hoạch



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian sau thu hoạch đến lượng tinh dầu

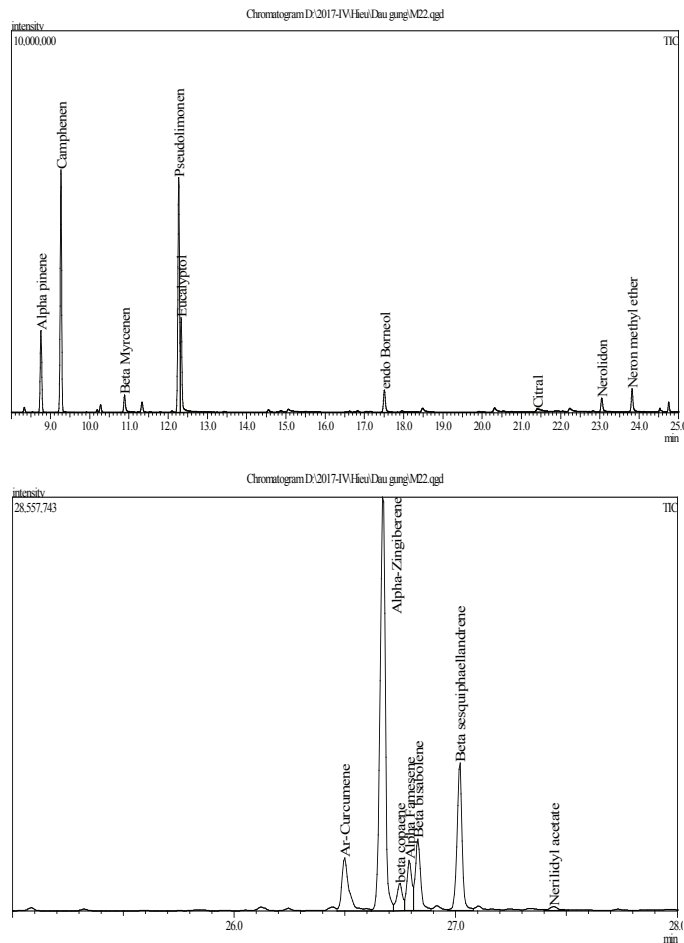
Hàm lượng tinh dầu thu được khi chiết với nguyên liệu sau 10 ngày kể từ khi thu hoạch cao hơn hẳn so với từ ngày thứ 13 trở đi. Trong 10 ngày đầu sau thu hoạch thì lượng tinh dầu thu được khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy muốn đạt hiệu suất cao ta nên chiết tinh dầu với nguyên liệu trong vòng 10 ngày kể từ khi thu hoạch về.

Nhận xét: Như vậy, đề tài đã xác định các điều kiện tối ưu để chiết xuất tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế (hàm lượng tinh dầu thu được khoảng 0,40–0,41%). Các điều kiện chiết được đề xuất là: nguyên liệu được xay thành bột nửa mịn, chiết xuất trong thời gian 3 giờ, tỷ lệ dung môi - nguyên liệu 3:1, với nguyên liệu trong vòng 10 ngày kể từ

khi thu hoạch về. Việc đề xuất độ mịn nguyên liệu, thời gian chiết và tỷ lệ dung môi - nguyên liệu thích hợp giúp giảm lượng nhiên liệu sử dụng, giảm chi phí sản xuất, tăng hiệu suất chiết. Thời gian sau thu hoạch hợp lý giúp tránh hao hụt lượng tinh dầu, đặc biệt nếu điều kiện bảo quản không tốt, ẩm mốc có thể làm giảm thể tích tinh dầu chiết xuất và đôi khi làm giảm chất lượng tinh dầu do ảnh hưởng đến hàm lượng các thành phần hóa học. Tóm lại, các điều kiện tối ưu được đề xuất đã góp phần vào việc ứng dụng chiết xuất tinh dầu ở quy mô lớn hơn để đạt được hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao đồng thời tiết kiệm nhiên liệu và thời gian chiết.

3.1.3. Kết quả xác định thành phần hóa học của tinh dầu Gừng

Kết quả thành phần hóa học của tinh dầu Gừng được thể hiện trong Hình 5 và Bảng 1.



Hình 5. Sắc ký đồ GC-MS của tinh dầu Gừng

Kết quả cho thấy tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế gồm 16 thành phần, trong đó thành phần chủ yếu là Alpha-zingerberene hàm lượng là 32,52%, tiếp đó là các thành phần Pseudolimonen (12,31%), Beta-sequi-phellandrene (11,37%) và Camphenen (11,52%). Kết quả này cũng gần như tương đồng với kết quả nghiên cứu của mẫu tinh dầu Gừng thu hái ở Ấn Độ trong nghiên cứu của Gurdip Singh và cộng sự [5]. Tuy nhiên, hàm lượng của Alpha-zingerberene trong tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế cao hơn so với hàm lượng tương ứng của hợp chất này trong mẫu tinh dầu gừng của một số nghiên cứu trước đây: Gurdip Singh và cộng sự [5]: 28,62%, mẫu tinh dầu thu hái tại vùng Trivandrum, Ấn Độ trong nghiên cứu của Indu Sasidharan và cộng sự [6]: 28,6%, %, mẫu tinh dầu thu hái tại bang Kerala, Ấn Độ theo nghiên cứu của Jeena Kottarapat và cộng sự [7]: 31,08%.

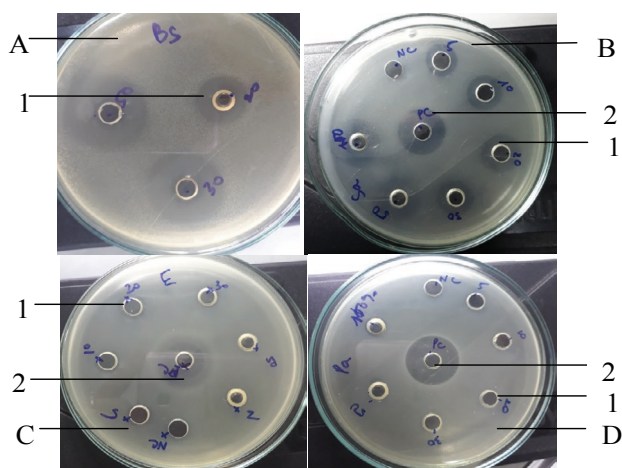
Bảng 1. Thành phần hóa học của tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế

STT	Tên thành phần	Hàm lượng (%)	Thời gian lưu (phút)
1	Alpha-pinen	3,81	8,76
2	Camphenen	11,52	9,27
3	Beta-myrcene	1,08	10,90
4	Pseudolimonen	12,31	12,27

5	Eucalyptol	4,94	12,33
6	Endo Borneol	1,52	17,51
7	Citral	0,61	21,41
8	Nerolidon	0,91	23,05
9	Nerol methyl ether	1,36	23,82
10	Ar-curcumenen	5,61	26,50
11	Alpha-zingerberene	32,52	26,67
12	Beta-copaene	2,10	26,75
13	Alpha-famesene	3,92	26,79
14	Beta-bisabolene	5,54	26,83
15	Beta-sequiphellandrene	11,37	27,02
16	Nerilidyl acetat	0,58	27,44

3.2. Kết quả nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Gừng được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 6.



Hình 6. Các vòng kháng khuẩn tạo ra bởi tinh dầu Gừng trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm: A. Chủng *B. subtilis*; B. Chủng *S. aureus*; C. Chủng *E. coli*; D. Chủng *P. aeruginosa*. Trên mỗi chủng: 1. Tinh dầu Gừng nồng độ 20%; 2. Gentamycin

Bảng 2. Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Gừng

			Đường kính vòng vô khuẩn (mm)			
Tên mẫu	Nồng độ % (ml/ml)	Nồng độ quy đổi (mg/ml)	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Tinh dầu Gừng (pha trong DMSO)	1%	8,8	-	-	-	-
	5%	43,8	13,1±0,0	12,8±0,2	-	-
	20%	175,2	18,6±0,1	15,2±0,0	7,5±0,2	-
	100%	876	cxđ	18,7±0,0	-	-
Chứng dương Gentamycin (0,4mg/ml)			19,3±0,2	19,0±0,1	19,0±0,1	18,8±0,1

cxđ: Vòng kháng khuẩn có đường kính lớn nên chưa xác định

Tinh dầu Gừng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên 2 chủng vi khuẩn *B. subtilis* và *S. aureus* ở các mức độ khác nhau và giá trị MIC được xác định là 43,8 mg/ml (tương ứng với nồng độ 5%) đối với cả 2 chủng vi khuẩn này. Trong đó, tinh dầu Gừng ở nồng độ 20% có tác dụng kháng khuẩn mạnh nhất trên *B. subtilis* (18,6 mm), tác dụng yếu hơn trên chủng *S. aureus* (15,2 mm). So sánh với chủng dương Gentamycin ở nồng độ 0,4 mg/ml, tinh dầu Gừng ở nồng độ 20% có tác dụng tương đương với Gentamycin trên chủng *B. subtilis*, tác dụng yếu hơn trên chủng *S. aureus*. Tinh dầu Gừng ở nồng độ 100% có tác dụng kháng khuẩn tương đương với Gentamycin trên chủng *S. aureus* (18,7 mm so với 19,0 mm). Tác dụng của tinh dầu Gừng trên *E. coli* rất yếu nên không được ghi nhận. Trên chủng *P. aeruginosa*, tinh dầu Gừng không có tác dụng kháng khuẩn.

So sánh với kết quả nghiên cứu của Krittika Norajit và cộng sự [9], mẫu tinh dầu Gừng được thu hái ở Thái Lan cũng có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn *B. subtilis* và *S. aureus*, đồng thời không có khả năng ức chế chủng *E. coli*. So sánh với kết quả nghiên cứu của Angel Konakchiev và cộng sự [3], *P. aeruginosa* cũng đề kháng với tinh dầu Gừng cũng được thu hái ở Việt Nam. Về giá trị MIC, so sánh với kết quả của Krittika Norajit và cộng sự [9] cho thấy trên chủng *B. subtilis* và *S. aureus* mẫu tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế có giá trị cao hơn (*B. subtilis*: 43,8 mg/ml so với 6,3 mg/ml; *S. aureus*: 43,8 mg/ml so với 12,5 mg/ml).

Như vậy, kết quả nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Gừng thu hái ở Thừa Thiên Huế

nhìn chung hoàn toàn phù hợp với kết quả của các công bố trước đó. Các kết quả nghiên cứu của đề tài đã góp phần xác định thành phần hóa học và tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế, đồng thời mở ra bước đầu cho các nghiên cứu sâu hơn để có thể ứng dụng loại tinh dầu này vào việc tạo ra các sản phẩm hoặc dược phẩm hỗ trợ điều trị bệnh cho con người.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã góp phần xác định một số điều kiện tối ưu của quy trình chiết xuất, thành phần hóa học và tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế. Kết quả của nghiên cứu là báo cáo đầu tiên về thành phần hóa học và hoạt tính kháng khuẩn của mẫu tinh dầu này ở Thừa Thiên Huế. Theo đó, nguyên liệu được xay thành dạng bột nửa mịn, chiết xuất trong thời gian 3 giờ, tỷ lệ dung môi - nguyên liệu 3:1, với nguyên liệu trong vòng 10 ngày kể từ khi thu hoạch về. Tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế gồm 16 thành phần hóa học đã được định danh, trong đó thành phần chính là Alpha-zingerberene. Hàm lượng của thành phần chính này trong mẫu tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế cao hơn so với báo cáo trong các nghiên cứu trước đây đối với mẫu tinh dầu Gừng tại Ấn Độ. Về hoạt tính kháng khuẩn, mẫu Tinh dầu Gừng ở Thừa Thiên Huế cho thấy sự tương đồng so với các nghiên cứu trước đây, cụ thể là đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên 2 chủng vi khuẩn *S. aureus* và *B. subtilis* với giá trị MIC 43,8 mg/ml, trong đó hoạt tính mạnh nhất được thể hiện trên chủng *B. subtilis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam, lần xuất bản thứ tư*, Phụ lục 12.7 (tr.PL-234 – PL.235) và Phụ lục 13.9 (tr. PL-271 – PL-282).
2. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB. ĐH Quốc gia TP.HCM, tr. 356-405.
3. Albena Stoyanova, Angel Konakchiev, Stanka Damyanova, Ivanka Stoilova & Phan Thi Suu (2006), "Composition and Antimicrobial Activity of Ginger Essential Oil from Vietnam", *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 9(1), pp. 93-98.
4. G. S. El-Baroty, H. H Abd El-Baky, R. S. Farag and M. A. Saleh (2010), "Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils", *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6), pp. 167-174.
5. Gurdip Singh, Sumitra Maurya, C. Catalan, M.P. de Lampasona (2004), "Studies on essential oils; Part 42: Chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin", *Flavour and Fragrance Journal*, 20, pp. 1-6.
6. Indu Sasidharan, A. Nirmala Menon (2010),

- "Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh and dry Ginger oils (*Zingiber officinale Roscoe*)", *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2(4), pp. 40-43.
7. Jeena Kottarapat, Ramadasan Kuttan, Vijayasteltar Bliju (2013), "Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of essential oil from ginger", *Indian J. Phyiol Pharmacol*, 57(1), pp. 51-62.
8. Kottarapat Jeena, Vijayasteltar B. Liju, Ramadasan Kuttan (2015), "Antitumor and cytotoxic activity of ginger essential oil (*Zingiber officinale roscoe*)", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(8), pp. 341-344.
9. Krittika Norajit, Natta Laohakunjit and Orapin Kerdchoechuen (2007), "Antibacterial Effect of Five Zingiberaceae Essential Oils", *Molecules*, 12, pp. 2047-2060.
10. Mounyr Balouiri, Moulay Sadiki, Saad Koraichi Ibensouda (2016), "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), pp. 71-79.