

Thành phần hóa học và khả năng kháng nấm *Malassezia* gây bệnh trên da người của tinh dầu Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) trồng tại Hà Nội

Trần Bảo Trâm¹, Đào Ngọc Ánh^{1,2}, Trần Bình Minh¹, Đỗ Thị Kim Trang¹,
Trần Văn Tuấn², Vũ Xuân Tạo^{1*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 22/2/2022; ngày chuyển phân biện 25/2/2022; ngày nhận phân biện 7/3/2022; ngày chấp nhận đăng 11/3/2022

Tóm tắt:

Các loài nấm *Malassezia* có thể gây ra một số bệnh ngoài da nghiêm trọng trên người. Các thuốc kháng nấm được sử dụng phổ biến hiện nay trong điều trị các bệnh liên quan đến nấm *Malassezia* thuộc nhóm azole. Tuy nhiên, tình trạng mẫn cảm, kháng thuốc do sử dụng không đúng cách khiến người dùng lo ngại. Gần đây, việc nghiên cứu sử dụng các loại tinh dầu thảo dược trong kiểm soát nấm *Malassezia* đang được quan tâm. Nghiên cứu này đã phân tích và nhận diện được 19 chất trong thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.), trong đó, eugenol là hợp chất chính chiếm tới 42,4%. Tinh dầu Hương nhu tía thể hiện hoạt tính kháng mạnh 3 chủng nấm gây bệnh trên da người (*M. furfur* VNF01, *M. furfur* ATCC14521 và *M. globosa* VNG02) với nồng độ tối thiểu ức chế sinh trưởng các chủng nấm là 2,5 µl/ml. Với nồng độ này, số lượng tế bào của các chủng nấm men được thử nghiệm đã bị loại bỏ 74,66-80,66% sau 20 phút xử lý. Kết quả thu được cho thấy, tinh dầu Hương nhu tía là loại thảo dược tiềm năng để phát triển các dạng sản phẩm như dầu gội, kem bôi sử dụng cho việc phòng và trị bệnh liên quan đến nấm *Malassezia*.

Từ khóa: Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.), kháng nấm, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, tinh dầu.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Malassezia là nấm men ưa lipid ký sinh trên da người và động vật máu nóng. Trên da khỏe mạnh, nấm *Malassezia* sống ký sinh, sử dụng chất dinh dưỡng cần thiết cho quá trình sinh trưởng mà không gây bệnh. Khi gặp các điều kiện thuận lợi, chúng trở thành tác nhân gây bệnh cơ hội. Trong số 16 loài nấm *Malassezia* đã được ghi nhận, *M. furfur* và *M. globosa* là 2 loài phổ biến nhất gây bệnh trên da người, chúng đều không có khả năng sinh tổng hợp axit béo mà phải sử dụng lượng dầu tiết ra từ những vùng da có hệ thống tiết dầu mạnh (da mặt, da đầu...). Một số bệnh lý do nấm *M. furfur* và *M. globosa* gây ra như là gàu da đầu, viêm da đầu, lang ben, viêm da dị ứng, viêm nang lông [1-3].

Hiện nay, các phương pháp điều trị bệnh nấm da do *Malassezia* chủ yếu sử dụng các loại thuốc kháng nấm, phổ biến là nhóm azole gồm 3 loại: itraconazole, ketoconazole và fluconazole. Nhìn chung, các loại thuốc đều có tác dụng kìm hãm sự phát triển của nấm *Malassezia*. Ketoconazole là thế hệ đầu tiên của nhóm azole (ra đời năm 1980). Gần đây, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã công bố ketoconazole có nguy cơ gây độc tính suy gan thận khi sử dụng bằng đường uống. Từ năm 2013, Hoa Kỳ đã cấm lưu hành loại thuốc này và chỉ chấp nhận sử dụng dưới dạng chế phẩm tại chỗ là ketoconazole 2% dạng gel hoặc dầu gội [4]. Fluconazole và itraconazole đều có những tác động tích cực trong kiểm soát nấm *Malassezia* [5-7]. Tuy nhiên, theo khuyến cáo của nhà sản xuất, tác dụng phụ của cả 2 loại thuốc itraconazole

và fluconazole có thể gây ra hiện tượng đau đầu, chóng mặt, buồn nôn, đau bụng, đi ngoài, tăng men gan, nổi ban ngứa và tróc vảy ở da. Hơn thế nữa, việc sử dụng phổ biến các loại thuốc kháng nấm này có thể gây ra tình trạng kháng thuốc điều trị, đồng nghĩa với việc phát sinh các chủng nấm *Malassezia* kháng thuốc/đa kháng thuốc.

Những nghiên cứu về các hoạt tính của tinh dầu dược liệu và việc khai thác, ứng dụng nguồn dược chất tự nhiên này phục vụ bảo vệ sức khỏe con người đang ngày càng được quan tâm. Việt Nam là một trong những nước có nguồn tài nguyên thực vật phong phú và đa dạng, đặc biệt là các loài thực vật có tinh dầu. Hương nhu tía là một loại dược liệu thường được sử dụng trong nhiều bài thuốc dân gian dùng cho chữa trị các bệnh ngoài da. Tuy nhiên, hoạt tính kháng nấm *Malassezia* của tinh dầu Hương nhu tía còn ít nghiên cứu đề cập. Nghiên cứu này sẽ đưa ra những căn cứ khoa học cho việc ứng dụng tinh dầu Hương nhu tía trong việc phát triển các sản phẩm từ thảo dược kiểm soát nấm *Malassezia*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm *M. furfur* VNF01 và *M. globosa* VNG02 được phân lập trên da người Việt Nam (người bị lang ben và gàu da đầu), chủng nấm *M. furfur* ATCC14521 được cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ, các chủng nấm đang được lưu giữ tại Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Chemical components of *Ocimum sanctum* L. essential oil grown in Hanoi, Vietnam and its antifungal properties against dermatologic pathogen - *Malassezia*

Bao Tram Tran¹, Ngoc Anh Dao^{1,2}, Binh Minh Tran¹, Thi Kim Trang Do¹, Van Tuan Tran², Xuan Tao Vu^{1*}

¹Center of Experimental Biology,
National Center for Technological Progress

²Faculty of Biology, University of Science,
Vietnam National University, Hanoi

Received 22 February 2022; accepted 11 March 2022

Abstract:

Malassezia species can cause serious dermatologic diseases in humans. Synthetic antifungal drugs, which have been usually utilised as a treatment for *Malassezia*-associated diseases, are belonged to the azole group. However, the hypersensitivity and resistance to synthetic drugs due to improper use are raising public concerns. Recently, the study of using herbal essential oils in the control of *Malassezia* fungus has attracted great attention from researchers. This study analysed and identified 19 compounds of *Ocimum sanctum* L. essential oil, where eugenol is the main composition in *O. sanctum* L. essential oil, accounting for 42.4%. *O. sanctum* L. essential oil showed strong activity against 3 strains of human skin fungi *M. furfur* VNF01, *M. furfur* ATCC14521, and *M. globosa* VNG02 with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.5 µl/ml. Using this concentration, 74.66-80.66% of tested yeast strains' cell numbers were eliminated after a 20-minute treatment. The results suggested that the herbal *O. sanctum* L. essential oil could be a potential agent to develop cosmetic products including shampoo and cream for the prevention and treatment of *Malassezia*-associated diseases.

Keywords: antifungal, essential oils, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Ocimum sanctum* L.

Classification number: 3.4

Toàn bộ phần trên mặt đất của cây Hương nhu tía sau 6 tháng trồng (đang ở giai đoạn ra hoa 70%) được thu tại Hà Nội. Mẫu sau khi thu hái được đưa ngay về phòng thí nghiệm để sử dụng cho việc tách chiết tinh dầu.

Phương pháp tách chiết tinh dầu

Tinh dầu được tách chiết từ các mẫu thảo dược tươi bằng hệ thống Clevenger theo phương pháp chưng cất lôi kéo hơi nước. Tiến hành tách loại nước tinh dầu thu được bằng Na₂SO₄ khan. Tinh dầu được lưu giữ trong lọ tối màu và bảo quản ở 4°C [8].

Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía

Thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí GC/MS [9]. Hệ thống GC/MS-QP2020 của Hãng Shimadzu (Nhật Bản), cột mao quản SH-Rxi-5Sil MS có kích thước 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Chương trình nhiệt độ với điều kiện 60°C (giữ 2 phút), tăng lên nhiệt độ 120°C với tốc độ 10°C/phút, sau đó tăng lên 240°C với tốc độ 5°C/phút, tiếp đến giữ ở 240°C trong 5 phút. Khí heli được sử dụng làm khí mang với tốc độ dòng chảy 1,0 ml/phút. Detector khối phổ được cài đặt trong khoảng tín hiệu 50-900 m/z. Thể tích mẫu tiêm vào cột là 1 µl với dung dịch mẫu tinh dầu có nồng độ 1% (w/v) trong hexan. Tỷ lệ chia dòng là 1:20. Kết quả phân tích các thành phần trong mẫu tinh dầu được xử lý bằng cách so sánh về phổ khối của các chất với thư viện NIST.

Xác định hoạt tính kháng nấm của tinh dầu bằng phương pháp khuếch tán qua thạch

Trải 50 µl dịch nuôi nấm *Malassezia* (10⁶ tế bào/ml) lên đĩa chứa môi trường mDixon (malt extract 36 g/l, desiccated oxbile 20 g/l, tween40 10 ml/l, peptone 6 g/l, glycerol 2 ml/l, oleic acid 2 ml/l, pH 6). Tiến hành pha loãng tinh dầu bằng DMSO và bổ sung 50 µl tinh dầu ở các nồng độ khác nhau (1, 2,5, 5, 10 và 20%) vào các giếng đã được khoan lỗ trên đĩa thạch đã cấy nấm *Malassezia*, đặt các đĩa này vào tủ lạnh trong 4 giờ để dịch khuếch tán đều vào môi trường, sau đó chuyển sang tủ nuôi cấy ổn nhiệt 30°C để nấm phát triển và tiến hành quan sát, đánh giá kết quả sau 3 ngày nuôi. Thí nghiệm đối chứng là bổ sung riêng DMSO vào lỗ thạch thay vì tinh dầu. Hoạt tính kháng nấm được xác định theo công thức: D - d (mm), trong đó: D là đường kính vòng trong không có nấm; d là đường kính giếng thạch. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần thực hiện trên 3 đĩa khác nhau cho mỗi công thức xác định hoạt tính kháng [10].

Xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) sinh trưởng nấm *Malassezia* của tinh dầu

Khử trùng dịch môi trường mDixon ở 120°C/20 phút, để nguội xuống dưới 50°C và trộn đều tinh dầu vào môi trường với các tỷ lệ khác nhau, tiến hành đổ môi trường ra các đĩa petri (16 ml/đĩa). Từ ống dịch giống *Malassezia* (10⁶ tế bào/ml) pha loãng thành các nồng độ 10⁴ và 10⁵. Tại mỗi đĩa môi trường, chia đĩa thành 3 hàng, 3 cột (tức lặp lại thí nghiệm 3 lần/đĩa),

nhỏ 5 µl mỗi nồng độ của mỗi loại dịch nấm vào một cột từ 10⁶, 10⁵, 10⁴ tương đương với số tế bào nấm *Malassezia* lần lượt là 5000, 500 và 50. Sau đó, đĩa được chuyển vào tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C. Quan sát và đánh giá kết quả sau 48-72 giờ nuôi. Giá trị MIC là nồng độ tinh dầu mà tại đó 5000 tế bào nấm bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn [11].

Xác định thời gian diệt nấm *Malassezia* của tinh dầu Hương nhu tía

Phương pháp xác định thời gian diệt nấm *Malassezia* được tiến hành theo Joray và cs (2011) [12]. Môi trường nuôi cấy lỏng chứa 10⁶ tế bào nấm men/ml được bổ sung tinh dầu ở giá trị MIC và được lắc 150 vòng/phút ở 5, 10, 20 và 30 phút. Tại các khoảng thời gian đã chọn, tiến hành lấy mẫu từ môi trường nuôi cấy và xác định mật độ tế bào nấm men bằng cách cấy trải trên môi trường thạch.

$$\% \text{tế bào chết} = 100 - \% \text{số tế bào sống.}$$

trong đó, %tế bào sống = (nồng độ tế bào tại thời điểm 5, 10, 20 và 30 phút)/nồng độ tế bào ban đầu × 100

Kết quả và bàn luận

Thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía

Tinh dầu Hương nhu tía thu được có màu vàng nhạt, mùi thơm đặc trưng. Thành phần hóa học của tinh dầu là một trong những căn cứ quan trọng nhất để đánh giá chất lượng tinh dầu, vì vậy, các tác giả đã tiến hành phân tích thành phần hóa học của mẫu tinh dầu Hương nhu tía, kết quả thu được thể hiện ở bảng 1.

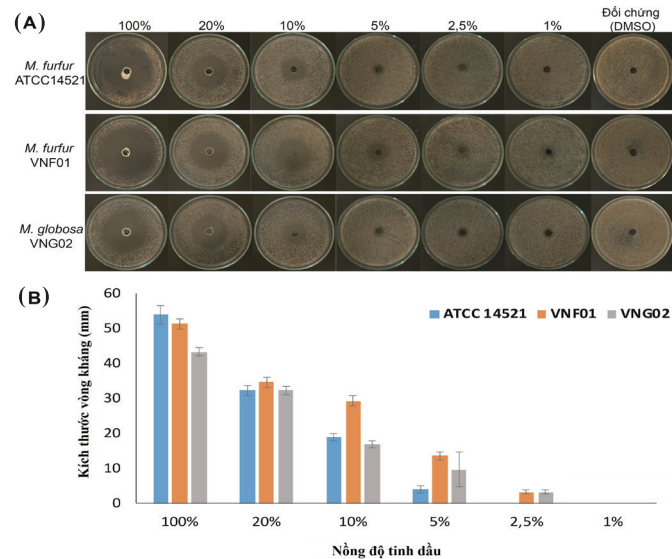
Bảng 1. Thành phần hóa học chính trong tinh dầu Hương nhu tía.

STT	Thành phần hóa học	Thời gian lưu (phút)	Tỷ lệ (%)
1	o-Cymene	6,075	1,40
2	Linalool	6,827	2,87
3	Eugenol	12,433	42,40
4	α-Copaene	12,900	9,59
5	β-Bourbonene	13,042	4,10
6	Methyleugenol	13,201	4,00
7	Caryophyllene	13,605	1,19
8	β-copaene	13,744	0,90
9	γ-Murolene	14,855	1,66
10	Alloaromadendrene oxide-(1)	15,276	1,38
11	Caryophyllene oxide	15,603	12,53
12	Salvial-4(14)-en-1-one	15,702	2,35
13	(-)-Spathulenol	15,907	3,74
14	Alloaromadendrene oxide-(2)	16,194	1,80
15	γ-himachalene	16,284	2,39
16	α-Bisabolene epoxide	16,425	1,99
17	Longiverbenone	16,467	1,00
18	α-Isonootkatol	16,616	3,59
19	Phytol	19,625	1,00
Tổng số			99,88

Kết quả bảng 1 cho thấy, tinh dầu Hương nhu tía gồm 19 chất chính, chiếm 99,88% tổng số chất trong mẫu tinh dầu. Trong đó, eugenol là thành phần chủ yếu chiếm tới 42,4%. Nghiên cứu của Võ Thị Thanh Tuyền và Nguyễn Thị Mỹ Biên (2019) [13] cho thấy, tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Bình Định chứa 71,21% eugenol. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Saharkhiz và cs (2015) [14], tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Borazjan, Iran ở các giai đoạn thu hoạch khác nhau chứa 15 chất chính, trong đó eugenol là thành phần chính chiếm 15,7-37,5%. Trong khi đó, hàm lượng eugenol trong tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Pakistan chỉ đạt 22% [15]. Điều này có thể do khí hậu và thổ nhưỡng tại các vùng khác nhau ảnh hưởng tới hàm lượng các hợp chất trong tinh dầu. Như vậy, có thể thấy tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Việt Nam có chất lượng cao, đây là nguồn hoạt chất rất tiềm năng cho phát triển các sản phẩm thảo dược chăm sóc sức khỏe.

Đánh giá khả năng kháng nấm *M. furfur* và *M. globosa* của tinh dầu Hương nhu tía bằng phương pháp khuếch tán qua thạch

Nhằm định hướng ứng dụng tinh dầu Hương nhu tía vào việc phát triển sản phẩm phòng và điều trị các bệnh trên da do nấm *Malassezia* gây ra, nghiên cứu này sẽ tiến hành đánh giá khả năng của tinh dầu Hương nhu tía kháng 2 loài nấm *Malassezia* gây bệnh phổ biến là *M. furfur* và *M. globosa*. Kết quả cho thấy, tinh dầu Hương nhu tía thể hiện tính kháng mạnh trên cả 3 chủng nấm *M. furfur* VNF01, ATCC14521 và *M. globosa* VNG02, khả năng kháng nấm giảm đi khi tinh dầu được pha loãng. Tại các nồng độ pha loãng tới 5%, tinh dầu Hương nhu tía vẫn thể hiện khả năng kháng lại cả 3 chủng nấm. Khi nồng độ tinh dầu giảm xuống 2,5%, chỉ còn biểu hiện hoạt tính kháng 2 chủng nấm VNF01 và VNG02. Tinh dầu Hương nhu tía không thể hiện khả năng kháng nấm khi bị pha loãng đến nồng độ 1% theo phương pháp khuếch tán qua thạch (hình 1).

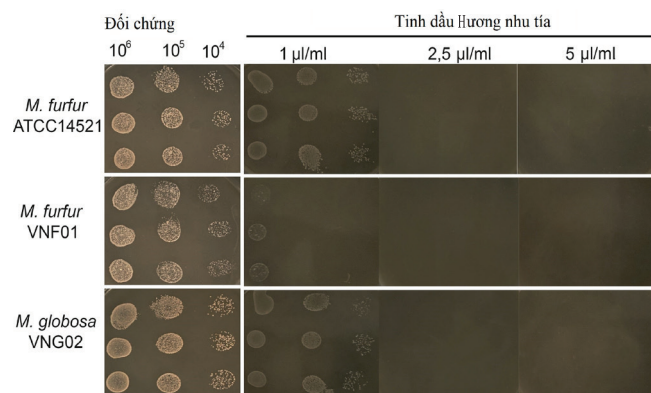


Hình 1. Khả năng kháng nấm *M. furfur* và *M. globosa* của tinh dầu Hương nhu tía ở các nồng độ pha loãng khác nhau. (A) Vòng kháng nấm *M. furfur* và *M. globosa* trên đĩa môi trường; (B) Kích thước vòng kháng.

Tinh dầu Hương nhu tía với thành phần hóa học chính là eugenol đã được khẳng định có khả năng kháng lại nhiều loài nấm trong chi *Candida* [16], ức chế sự sinh trưởng và sinh độc tố của nấm *Aspergillus flavus* [17]. Ngoài ra, một số nghiên cứu trước đây cho thấy rằng tinh dầu của các loài Hương nhu *O. canum*, *O. gratissimum*, *O. trichodon* và *O. urticifolium* cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt [18]. Tuy nhiên, đến nay chưa có nhiều các nghiên cứu đề cập tới khả năng kháng nấm *M. furfur* và *M. globosa* gây bệnh trên da người của tinh dầu Hương nhu tía. Như vậy, có thể coi đây là nghiên cứu bước đầu bổ sung thêm dữ liệu mới về hoạt tính kháng nấm *Malassezia* của tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Việt Nam.

Xác định MIC sinh trưởng nấm *M. furfur* và *M. globosa* của tinh dầu Hương nhu tía

Để có thể ứng dụng tinh dầu trong việc sản xuất các sản phẩm dược liệu thì việc xác định được giá trị MIC của tinh dầu ức chế được hoàn toàn sinh trưởng của nấm *Malassezia* là yêu cầu đầu tiên. Kết quả thử nghiệm đã xác định được giá trị MIC của tinh dầu Hương nhu tía đối với các chủng nấm *M. furfur* ATCC14521, *M. furfur* VNF01 và *M. globosa* VNG02 là 2,5 µl/ml (hình 2).



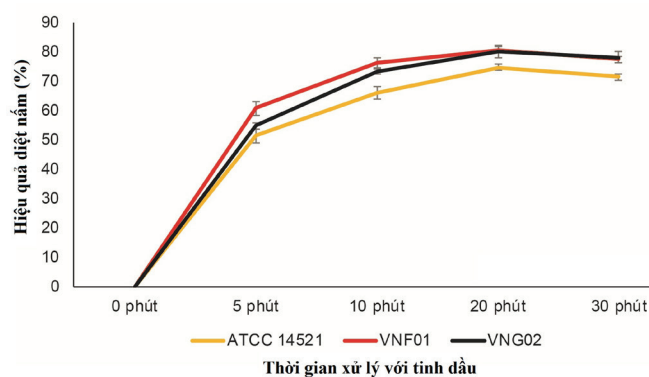
Hình 2. Nồng độ tối thiểu ức chế sinh trưởng nấm *M. furfur* và *M. globosa* của tinh dầu Hương nhu tía.

Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định được giá trị MIC của tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Việt Nam đối với các chủng nấm *Malassezia* gây bệnh trên da người. Cùng nghiên cứu trên 3 chủng nấm *M. furfur* ATCC14521, *M. furfur* VNF01 và *M. globosa* VNG02, Vu và cs (2021) [19] đã xác định được nồng độ tối thiểu ức chế hoàn toàn 3 chủng nấm trên của tinh dầu Bạc hà là 2,5 µl/ml và tinh dầu Trà không là 1 µl/ml. Như vậy có thể thấy, tinh dầu Hương nhu tía là loại tinh dầu có tiềm năng cao trong phát triển các sản phẩm kháng nấm *Malassezia*.

Xác định thời gian diệt nấm *Malassezia* của tinh dầu Hương nhu tía

Để có thể ứng dụng các sản phẩm thảo dược dùng cho các bệnh lý ngoài da như gàu da đầu, viêm da dầu, lang ben, viêm da dị ứng, viêm nang lông... do nấm *M. furfur* và *M.*

globosa gây ra, cần xác định thời gian thích hợp lưu lại trên da đủ để kiểm soát nấm *Malassezia* một cách hiệu quả nhất. Để có căn cứ khoa học khi sử dụng các sản phẩm chứa tinh dầu Hương nhu tía kiểm soát nấm *Malassezia*, các tác giả đã tiến hành xác định hiệu quả diệt nấm *Malassezia* theo thời gian tiếp xúc với tinh dầu Hương nhu tía ở giá trị MIC. Kết quả cho thấy, ở nồng độ tinh dầu 2,5 µl/ml, sau 5 phút ủ, tỷ lệ tế bào nấm *Malassezia* chết đạt trên 50%. Khi tăng dần thời gian ủ, tỷ lệ tế bào nấm chết tăng dần và đạt cao nhất sau 20 phút ủ. Sau 20 phút tiếp xúc với tinh dầu Hương nhu tía, các chủng *M. furfur* VNF01 và *M. globosa* VNG02 có tỷ lệ tế bào chết khá cao (80-80,66%), trong khi chủng *M. furfur* ATCC14521 đạt mức 74,66% (hình 3).



Hình 3. Khả năng diệt nấm *M. furfur* và *M. globosa* theo thời gian của tinh dầu Hương nhu tía.

Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, tinh dầu có khả năng kháng nhiều loài nấm bệnh thông qua việc phá vỡ các cấu trúc của thành tế bào, ức chế khả năng tổng hợp độc tố nấm [20]. Vì vậy, một số loại tinh dầu Sả như *Cymbopogon citratus* và *C. flexuosus* đã được sử dụng trong sản xuất dầu gội, kem bôi để điều trị thành công gàu và bệnh lang ben do nấm *Malassezia* gây ra [21]. Ngoài ra, dịch lên men cây Hương nhu tía cũng được chứng minh có khả năng kháng mạnh nấm *M. furfur* và được ứng dụng trong sản xuất dầu gội [22]. Với các kết quả đạt được, tinh dầu Hương nhu tía có tiềm năng sử dụng để phát triển các sản phẩm mới trong việc kiểm soát nấm *Malassezia*.

Kết luận

Nghiên cứu này đã đánh giá được thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Hà Nội gồm 19 chất chính, trong đó eugenol là thành phần chính với hàm lượng chiếm tới 42,4%. Tinh dầu Hương nhu tía thể hiện hoạt tính kháng mạnh 3 chủng nấm gây bệnh trên da người là *M. furfur* VNF01, *M. furfur* ATCC14521 và *M. globosa* VNG02 với giá trị MIC là 2,5 µl/ml. Ở nồng độ tinh dầu sử dụng 2,5 µl/ml, tỷ lệ tế bào nấm *Malassezia* chết đã đạt trên 50% sau 5 phút ủ và đạt cao nhất sau 20 phút ủ. Sau 20 phút tiếp xúc với tinh dầu ở nồng độ 2,5 µl/ml, tỷ lệ nấm *Malassezia* chết đạt từ 74,66 đến 80,66%. Như vậy có thể

thấy, tinh dầu Hương nhu tía rất có tiềm năng ứng dụng trong các sản phẩm kiểm soát nấm *Malassezia*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ khoa học và công nghệ “Nghiên cứu phát triển một số sản phẩm kháng nấm *Malassezia* spp. gây bệnh phổ biến trên da người từ nguồn thảo dược Việt Nam” do Bộ Khoa học và Công nghệ quản lý. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C.W. Saunders, A. Scheynius, J. Heitman (2012), “*Malassezia* fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases”, *PLOS Pathogens*, **8(6)**, pp.1-4.

[2] V.C. Erchiga, V.D. Florencio (2002), “*Malassezia* species in skin diseases”, *Current Opinion in Infectious Diseases*, **15(2)**, pp.133-142.

[3] A.K. Gupta, R. Batra, R. Bluhm, T. Boekhout, T.L. Dawson (2004), “Skin diseases associated with *Malassezia* species”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, **51(5)**, pp.785-798.

[4] United States Food and Drug Administration (2013), *FDA Drug Safety Communication: FDA Warns That Prescribing of Nizoral (ketoconazole) Oral Tablets for Unapproved Uses Including Skin and Nail Infections Continues; Linked to Patient Death*.

[5] C.S. Bhogal, A. Singal, M.C. Baruah (2001), “Comparative efficacy of ketoconazole and fluconazole in the treatment of pityriasis versicolor: a one-year follow-up study”, *The Journal of Dermatology*, **28(10)**, pp.535-539.

[6] A. Kokturk, T. Kaya, G. Ikizoglu, R. Bugdayci, A. Koca (2002), “Efficacy of three short-term regimens of itraconazole in the treatment of pityriasis versicolor”, *Journal of Dermatological Treatment*, **13(4)**, pp.185-187.

[7] O. Köse, H.B. Taştan, A.R. Gür, Z. Kurumlu (2002), “Comparison of a single 400 mg dose versus a 7-day 200 mg daily dose of itraconazole in the treatment of tinea versicolor”, *Journal of Dermatological Treatment*, **13(2)**, pp.77-79.

[8] Tống Thị Ánh Ngọc, Nguyễn Văn Kiên (2011), “Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chưng cất tinh dầu gừng”, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **19B**, tr.62-69.

[9] R.P. Adams (2001), *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corp., 456pp.

[10] F. Hadacek, H. Greger (2000), “Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice”, *Phytochemical Analysis*, **11(3)**, pp.137-147.

[11] R. Lambert, J. Pearson (2000), “Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values”, *Journal of Applied Microbiology*, **88(5)**, pp.784-790.

[12] M.B. Joray, M.R.D. Rollán, G.M. Ruiz, S.M. Palacios, M.C. Carpinella (2011), “Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina - isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*”, *Planta Medica*, **77(1)**, pp.95-100.

[13] Võ Thị Thanh Tuyền, Nguyễn Thị Mỹ Biên (2019), “Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh của tinh dầu Hương nhu tía (*Ocimum Sanctum* L.) ở Bình Định”, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Quy Nhơn*, **13(3)**, tr.83-90.

[14] M.J. Saharkhiz, et al. (2015), “Chemical compositions and antimicrobial activities of *Ocimum sanctum* L. essential oils at different harvest stages”, *Jundishapur Journal of Microbiology*, **8(1)**, pp.1-7.

[15] A.I. Hussain, et al. (2017), “Chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Ocimum sanctum*”, *International Journal of Food Properties*, **20(7)**, pp.1569-1581.

[16] A. Janssen, J. Scheffer, L. Ntezurubanza, A.B. Svendsen (1989), “Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda”, *Journal of Ethnopharmacology*, **26(1)**, pp.57-63.

[17] A. Khan, A. Ahmad, N. Manzoor, L.A. Khan (2010), “Antifungal activities of *Ocimum sanctum* essential oil and its lead molecules”, *Natural Product Communications*, **5(2)**, pp.1345-1349.

[18] A. Kumar, R. Shukla, P. Singh, N.K. Dubey (2010), “Chemical composition, antifungal and antiaflatoxinigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial”, *Food and Chemical Toxicology*, **48(2)**, pp.539-543.

[19] T.X. Vu, et al. (2021), “Chemical compositions and anti-malassezia properties of Vietnamese *Mentha arvensis* and *Piper betle* essential oils”, *International Journal of Agricultural Technology*, **17(4)**, pp.1619-1630.

[20] F. Nazzaro, F. Fratianni, R. Coppola, V.D. Feo (2017), “Essential oils and antifungal activity”, *Pharmaceuticals*, **10(4)**, pp.1-20.

[21] R. Donato, C. Sacco, G. Pini, A.R. Bilia (2020), “Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species”, *Journal of Ethnopharmacology*, **249**, DOI: 10.1016/j.jep.2019.112376.

[22] C. Punyoyai, S. Sirilun, P. Chantawannakul, W. Chaiyana (2018), “Development of antidandruff shampoo from the fermented product of *Ocimum sanctum* Linn”, *Cosmetics*, **5(3)**, pp.43-54.