

Khảo sát hoạt tính kháng *Candida albicans* của phối hợp cao Trầu không (*Piper betle* L. Piperaceae) và tinh dầu Bách lí hương (*Thymus vulgaris* L. Lamiaceae)

Phạm Bền Chí¹, Nguyễn Thị Bạch Tuyết², Phạm Thúy Hương², Phan Kim Thái², Ngô Yến Nhi²

¹Khoa Kỹ thuật Xét nghiệm Y học, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

pbchi@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Cao Trầu không chứa hoạt chất hydroxychavicol có khả năng ức chế sự phát triển của *Candida albicans* thông qua quá trình ức chế quá trình nhân đôi DNA. Tinh dầu Bách lí hương đã được báo cáo kháng *Candida* spp. Cơ chế tác động của nó là ức chế quá trình sinh tổng hợp ergosterol trên màng tế bào. Dựa trên nguyên tắc phối hợp 2 chất có cơ chế tác động khác nhau trong điều trị bệnh nhiễm trùng, nhóm tác giả tiến hành khảo sát hiệu quả kháng *C. albicans* ATCC 10231 của phối hợp cao Trầu không và tinh dầu Bách lí hương. Kết quả cho thấy phối hợp cao Trầu không – tinh dầu Bách lí hương (1 mg : 4 μ L) có hiệu quả cộng lực kháng *C. albicans* trên mô hình *in vitro* và mô hình tính thấm qua móng *ex vivo*. Đồng thời, bằng mô hình gây nhiễm móng *ex vivo*, nghiên cứu cũng đã xác định được phối hợp cao Trầu không 0,156 % (w/v) và tinh dầu Bách lí hương 0,625 % (v/v) có khả năng diệt nấm *C. albicans* ATCC 10231. Các kết quả này tạo tiền đề để phát triển công thức các dạng bào chế (kem, gel,...) hỗ trợ điều trị bệnh nấm móng *Candida* chứa cao Trầu không và tinh dầu Bách lí hương.

Nhận 19.12.2021
Được duyệt 28.02.2022
Công bố 06.04.2022

Từ khóa
C. albicans,
cao Trầu không,
tinh dầu Bách lí hương,
cộng lực, nấm móng

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Mở đầu

Nấm móng là tình trạng móng tay, chân bị phá hủy bởi các vi nấm, trong đó phổ biến là *Candida albicans*. Hiện nay, các bác sĩ thường chỉ định thuốc kháng nấm như terbinafin, nhóm azol dùng tại chỗ hoặc toàn thân. Tuy nhiên, liệu pháp này sử dụng lâu dài sẽ gây nhiều tác dụng phụ và gia tăng tình trạng đề kháng thuốc. Xu thế hiện nay là sử dụng thuốc có nguồn gốc từ dược liệu để thay thế. Năm 2020, nhóm tác giả Lê Văn Kim Anh và Phạm Bền Chí đã chứng minh cao Trầu không (TrK) (chiết xuất từ lá TrK bằng các dung môi cồn 96 %, nước) cho hiệu quả kháng trung bình các chủng *Candida* spp. với giá trị MIC (2-4) mg/mL [1]. Hoạt tính kháng vi sinh vật của cao TrK chủ yếu do hoạt chất hydroxychavicol gây ra. Cơ

chế tác động của nó là ức chế quá trình nhân đôi DNA của vi sinh vật [2]. Bên cạnh đó, tinh dầu Bách lí hương cũng đã được báo cáo có khả năng kháng *Candida* spp. thông qua quá trình ức chế tổng hợp ergosterol – thành phần chính của màng tế bào vi nấm [3,4]. Để điều trị các bệnh lý nhiễm trùng, hai chất có cơ chế tác động khác nhau thường được kết hợp để gia tăng tác dụng [5]. Dựa trên nguyên tắc này, cao TrK và tinh dầu Bách lí hương được phối hợp với nhau để đánh giá hiệu quả kháng *C. albicans* gây bệnh nấm móng thông qua mô hình *in vitro* và *ex vivo*.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Cao TrK thu được từ đề tài mã số 2020.01.092 [1]



Tinh dầu Bách lí hương (BLH) được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Hương liệu và Du lịch Mỹ Linh.

Vi nấm thử nghiệm: *C. albicans* ATCC 10231

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát hiệu quả phối hợp cao Tr.K với tinh dầu BLH *in vitro*

Hiệu quả phối hợp của cao Tr.K và tinh dầu BLH được đánh giá bằng phương pháp vi pha loãng trong môi trường thạch theo hình bàn cờ [6,7]. Môi trường thử nghiệm là MHA (Mueller Hinton Agar) bổ sung 2 % glucose.

Cao Tr.K và tinh dầu BLH được pha loãng liên tục ½ trong môi trường thử nghiệm thành hai dãy có nồng độ giảm dần trong bảng nhựa 96 giếng theo Bảng 1. Mỗi giếng chứa 100 µL chất thử (cao Tr.K hoặc tinh dầu BLH hoặc phối hợp cao Tr.K và tinh dầu BLH) được pha trong môi trường thử nghiệm. Cụ thể:

+ Dãy nồng độ thử nghiệm để xác định MIC riêng rẽ của tinh dầu BLH (A2 – A6): chứa tinh dầu BLH nồng độ từ 4 µL/mL đến 0,25 µL/mL

+ Dãy nồng độ thử nghiệm để xác định MIC riêng rẽ của cao Tr.K (B1 – G1): chứa cao Tr.K nồng độ (8 000-250) µg/mL

+ Các dãy nồng độ thử nghiệm để xác định MIC phối hợp cao Tr.K và tinh dầu BLH (B2 – B6, C2 – C6, D2 – D6, E2 – E6, F2 – F6, G2 – G6): chứa phối hợp tinh dầu BLH và cao Tr.K ở các nồng độ và tỉ lệ khác nhau.

Chuẩn bị huyền濁 vi nấm: vi nấm *C. albicans* ATCC 10231 được hoạt hóa và phân lập trên môi trường SDA (Sabouraud Dextrose Agar) ở 37 °C trong 48 giờ. Sau đó, chuẩn bị huyền濁 vi nấm bằng cách lấy khoảng (3-5) khóm nấm có đường kính khoảng 1 mm phân tán vào ống nghiệm chứa 5 mL nước muối sinh lí có 0,05 % tween 80. Lắc xoáy dịch nấm trong khoảng (20-30) giây. Xác định độ hấp thu của huyền濁 vi nấm bằng máy quang phổ UV-Vis tại bước sóng 530 nm (OD_{530nm}). Điều chỉnh huyền濁 vi nấm bằng nước muối sinh lí sao cho OD_{530nm} đạt xấp xỉ 0,1 (0,08-0,12), tương đương mật độ vi nấm là $(1-5) \times 10^6$ CFU/mL.

Hút 10 µL huyền濁 vi nấm lên trên bề mặt mỗi giếng để đạt được số lượng 10⁴ CFU (Colony Forming Unit). Sau 48 giờ ủ ở 37 °C, xác định MIC riêng rẽ, MIC phối hợp để tính hệ số FIC:

$$FIC = \frac{\text{MIC cao Tr.K trong phối hợp}}{\text{MIC cao Tr.K riêng rẽ}} + \frac{\text{MIC tinh dầu BLH trong phối hợp}}{\text{MIC tinh dầu BLH riêng rẽ}}$$

FIC ≤ 0,5 : cộng lực bội tăng

0,5 < FIC ≤ 1 : cộng lực

1 < FIC ≤ 4 : tác dụng riêng rẽ

4 < FIC : đối kháng

Bảng 1 Bảng nhựa 96 giếng trong phương pháp vi pha loãng theo hình bàn cờ

		Tinh dầu BLH					
		1	2	3	4	5	6
Cao Tr.K	A	Chứng	A2	A3	A4	A5	A6
	B	B1	B2	B3	B4	B5	B6
	C	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	D	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	E	E1	E2	E3	E4	E5	E6
	F	F1	F2	F3	F4	F5	F6
	G	G1	G2	G3	G4	G5	G6

2.2.2 Khảo sát tính thấm qua móng *ex vivo*

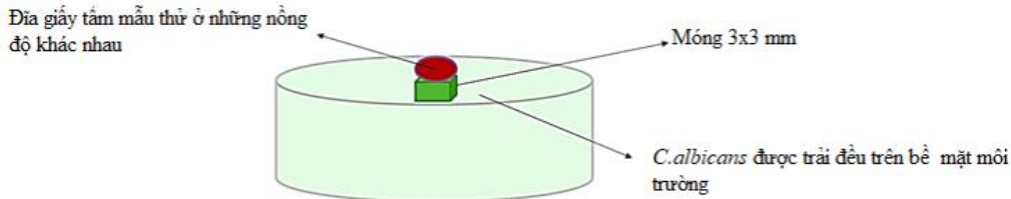
Chuẩn bị mẫu móng: móng tay được cắt từ người tình nguyện không sử dụng sơn móng tay hay các chất đánh bóng khác trong vòng 6 tháng. Móng tay được trữ trong lọ, dán nhãn và để trong tủ lạnh đến khi sử dụng. Khi sử dụng, cắt móng tay thành từng mảnh (3 x 3) mm, rửa sạch 3 lần bằng EtOH 70 % và nước

muối sinh lí vô trùng. Sau khi rửa sạch, móng được để khô trong laminar ở nhiệt độ phòng.

Môi trường thử nghiệm: MHA bổ sung 2 % D – glucose, 25 mg Chloramphenicol và 250 mg Cycloheximid trong 1 lít môi trường.

C. albicans ATCC 10231 (mật độ 10⁶ CFU/mL) được chuẩn bị tương tự như ở Mục 2.2.1. Trải huyền濁

nấm có nồng độ 10^6 CFU/mL lên bề mặt môi trường. Đặt mảnh móng tay đã qua xử lý lên mặt thạch (sao cho phần nền móng tay tiếp xúc với bề mặt thạch), rồi đặt lên trên móng tay một đĩa giấy vô trùng có kích thước nhỏ hơn hoặc tương đương với mảnh móng tay. Tẩm 2,5 μ L dung dịch thử với những nồng độ khác nhau vào đĩa giấy.



Hình 1 Mô hình xác định khả năng thâm của chất thử qua móng.

Sau đó đem đi ủ ở 37°C trong 48 giờ và đo đường kính vòng kháng nấm để đánh giá [8-10].

2.2.3 Khảo sát hoạt tính kháng C.albicans trên mô hình móng nhiễm ex vivo

Chuẩn bị mẫu móng: như Mục 2.2.2.

Gây nhiễm móng: C. albicans ATCC 10231 được hoạt hóa trong thạch YPG (Yeast extract – Peptone – Glucose), ủ ở 37°C trong 48 giờ, sau đó tiếp tục hoạt hóa trong môi trường YPG lỏng. Sau 48 giờ, đem li tâm, thu lấy phần cặn tế bào. Phân tán phần cặn này trong nước muối sinh lí có 0,05 % tween 80 để đạt 10^7 CFU/mL. Số lượng tế bào nấm men được xác định bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer. Pha loãng dịch treo nấm trong môi trường thạch nước sao cho nồng độ nấm men là 10^6 CFU/mL. Cho môi trường thạch nước vào đĩa petri tiệt trùng. Đặt móng tay đã được xử lý vào môi trường sao cho phần nền móng tiếp xúc trực tiếp với thạch nấm, như vậy nấm chỉ sử dụng móng là nguồn dinh dưỡng duy nhất. Sau 7 ngày ủ ở

Chất thử được chuẩn bị như sau:

- Cao Tr.K: cân chính xác khoảng một lượng cao Tr.K, hòa tan trong DMSO 10 % để đạt được nồng độ thử nghiệm.
- Tinh dầu BLH: hút chính xác một thể tích tinh dầu, hoà tan trong PEG 400 để đạt được nồng độ thử nghiệm.

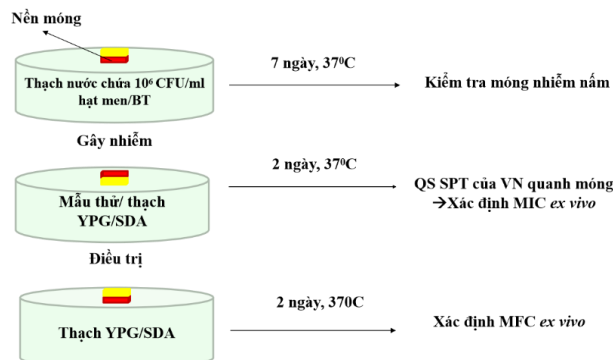
37°C , quan sát sự phát triển của nấm trên nền móng bằng kính hiển vi quang học [9-11].

Khảo sát tác động kháng C. albicans ATCC 10231 của chất thử trên móng nhiễm

Cao Tr.K và tinh dầu BLH được hòa tan trong môi trường thạch YPG có bổ sung 0,1 % tween 80 thành nồng độ thử nghiệm.

Móng sau khi gây nhiễm nấm được chuyển sang đĩa petri môi trường chứa chất thử, đặt lưng móng tiếp xúc với môi trường, nền móng hướng lên trên. Sau (2-3) ngày, quan sát sự phát triển trở lại của nấm bằng mắt thường để xác định khả năng kháng nấm của chất thử (MIC ex vivo) [11]

Sau đó, chuyển móng sang môi trường thạch YPG sao cho nền móng tiếp xúc với môi trường, ủ ở 37°C trong 48 giờ, quan sát sự phát triển trở lại của vi nấm. Giai đoạn này giúp xác định nồng độ tối thiểu diệt nấm trên mô móng (MFC ex vivo) [11].



Hình 2 Mô hình xác định tác động kháng nấm ex vivo

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Hiệu quả phối hợp cao TrK và tinh dầu BLH *in vitro*

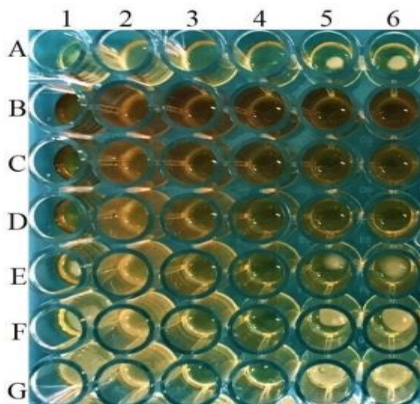
Hiệu quả phối hợp cao Tr.K và tinh dầu BLH được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2 Kết quả khảo sát hiệu quả của phối hợp cao Tr.K và tinh dầu BLH trên *C. albicans* ATCC 10231

Mẫu thử	MIC	FIC	Tương tác	Tỉ lệ phối hợp Cao Tr.K - TDBLH (mg/ μ L)
Cao Tr.K	2 mg/mL			
Tinh dầu BLH	2 μ L/mL			
Phối hợp Cao Tr.K – TD BLH (mg/ μ L)	1:1	1	Cộng lực	1:1
	0,5:1	0,75		1:2
	0,25:1	0,625		1:4

Nhận xét: phối hợp cao Tr.K và tinh dầu BLH cho hiệu quả cộng lực trên chủng *C. albicans* ATCC 10231 ở các tỉ lệ nồng độ 1:1, 1:2 và 1:4 (mg cao Tr.K/ μ L tinh dầu BLH). Như vậy khi phối hợp chúng với nhau, hoạt tính kháng *C. albicans* ATCC 10231

của tinh dầu BLH tăng lên 2 lần, của cao Tr.K tăng lên (2-8) lần so với dạng riêng rẽ. Hơn nữa, tỉ lệ của chúng trong phối hợp có tác động cộng lực không chênh nhau quá nhiều (1:1, 1:2 và 1:4) nên có tiềm năng xác lập công thức bào chế sau này.



Bảng 3 Bảng biện giải kết quả cho Hình 3

	1	2	3	4	5	6
A	+	-	-	+	+	+
B	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-
E	+	-	-	-	+	+
F	+	-	-	-	+	+
G	+	-	-	-	+	+

Hình 3 Hình chụp đại diện kết quả khảo sát hiệu quả phối hợp cao Tr.K với tinh dầu BLH kháng *C. albicans* ATCC 10231

Chú thích (-): vi nấm bị ức chế (+): vi nấm phát triển

3.2 Tính thấm qua móng *ex vivo*

Kết quả tính thấm qua móng của cao Tr.K và tinh dầu BLH ở dạng riêng rẽ và phối hợp được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4 Kết quả tính thấm qua móng của cao Tr.K và tinh dầu BLH riêng rẽ và phối hợp

Chất thử	Đường kính vòng kháng nấm <i>C. albicans</i> ATCC 10231 (mm)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
PEG 400	0	0	0	0
DMSO 10 %	0	0	0	0
Cao Tr.K (5, 10, 20, 100) %	0	0	0	0
TD BLH 40 %	25	27	27	26,33
TD BLH 20 %	12	11	12	11,67
TD BLH 10 %	0	0	0	0
Cao Tr.K 20 % + TD BLH 20 %	11,5	11	10,5	11,00
Cao Tr.K 10 % + TD BLH 20 %	10	10,5	12	10,83
Cao Tr.K 5 % + TD BLH 20 %	15	16	16,5	15,83

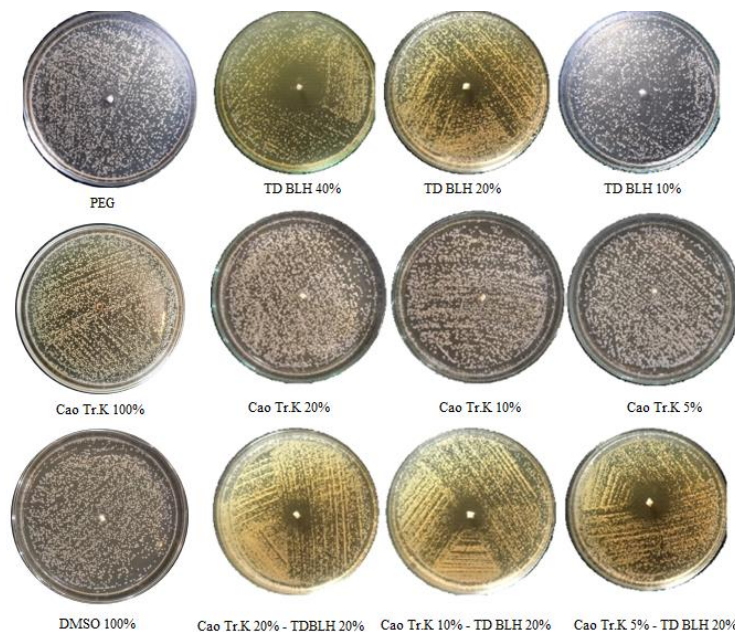
Chú thích: TD: tinh dầu; Cao Tr.K 1 % :10 mg/mL, TD BLH 1 % : 10 µL/mL

Nhận xét:

- PEG 400, DMSO 10 % lần lượt là dung môi hòa tan tinh dầu BLH và cao Tr.K trong thử nghiệm, không cho vùng ức chế *C. albicans* ATCC 10231, chứng tỏ kết quả thử nghiệm không bị ảnh hưởng bởi các dung môi này.
- Cao Tr.K không có khả năng thấm qua móng người lành ở nồng độ 100 %.
- Tinh dầu BLH có khả năng thấm qua móng người lành từ nồng độ 20 %. Khi tăng nồng độ của các tinh

dầu này, đường kính vùng ức chế *C. albicans* ATCC 10231 càng tăng, chứng tỏ lượng tinh dầu thấm qua móng càng nhiều.

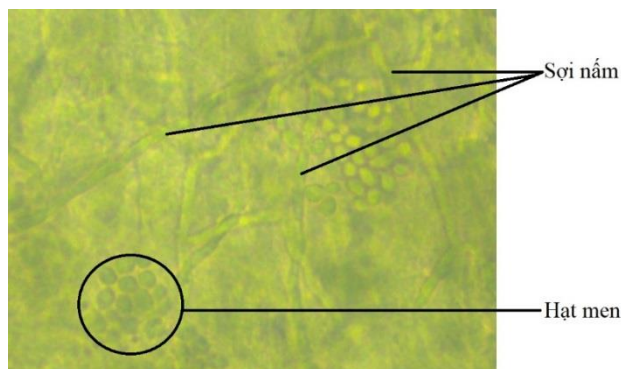
- Ở nồng độ phối hợp của cao Tr.K và tinh dầu BLH (20 : 20) % và (10 : 20) %, đường kính vùng ức chế không tăng lên so với tinh dầu BLH dạng riêng rẽ. Tuy nhiên ở tỉ lệ (5 : 20) %, đường kính vùng ức chế cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tinh dầu BLH ở dạng riêng rẽ ($p < 0,05$). Điều này chứng tỏ hiệu quả cộng lực của chúng trên mô hình *ex vivo*.



Hình 4 Hình chụp đại diện kết quả khảo sát tính thấm qua móng của cao Tr.K và tinh dầu BLH riêng rẽ và phối hợp

3.3 Khả năng kháng *C.albicans ex vivo*

Sau khi gây nhiễm móng người lành bằng *C. albicans* ATCC 10231, kết quả soi tươi mẫu móng ở độ phóng đại 400x, xuất hiện đám hạt men và sợi nấm giả [12] (Hình 5). Do đó, mẫu móng đã được gây nhiễm thành công.



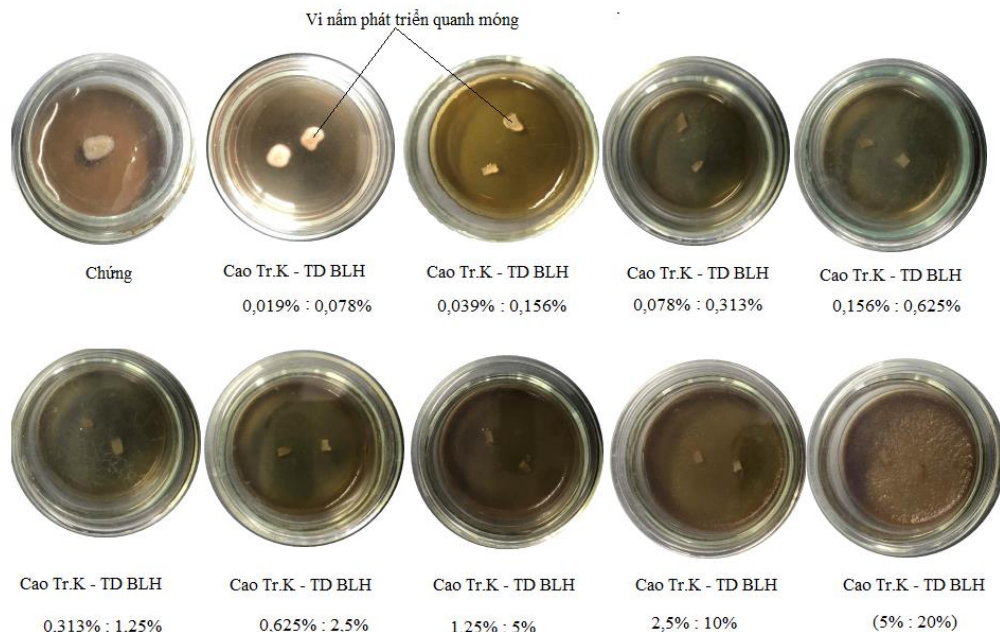
Hình 5 Hình chụp đại diện mẫu móng sau khi gây nhiễm *C. albicans* ATCC 10231 (400x)

Vì phối hợp cao Tr.K 5 % - tinh dầu BLH 20 % có hiệu quả cộng lực kháng *C. albicans* ATCC 10231 trên mô hình thấm qua móng người lành *ex vivo* nên

được tiếp tục nghiên cứu để xác định MIC *ex vivo* và MFC *ex vivo*. Kết quả xác định MIC *ex vivo* được thể hiện ở Hình 6. Khi móng nhiễm được điều trị với phối

hợp nồng độ cao Tr.K 0,039 %, tinh dầu BLH 0,156 %, có sự phát triển của vi nấm quanh móng. Trong khi đó ở phối hợp nồng độ cao Tr. K 0,078 %, tinh dầu

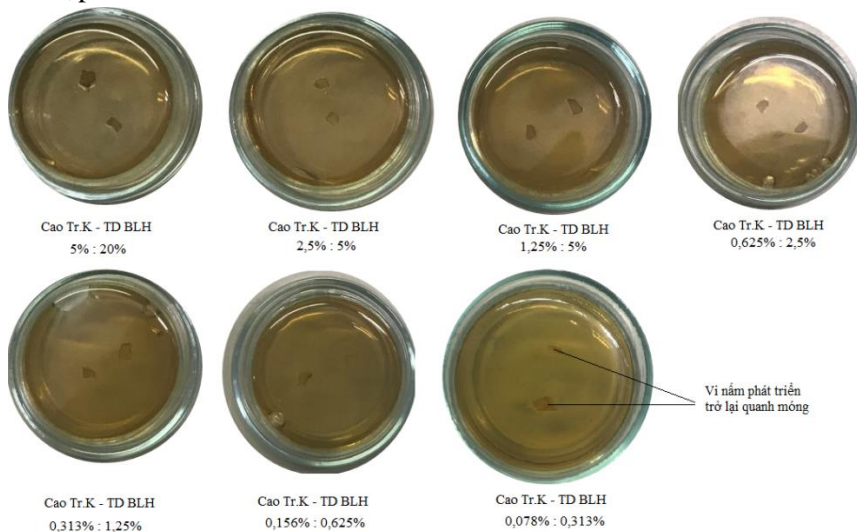
BLH 0,313 %, vi nấm bị ức chế nên đây cũng chính là giá trị MIC *ex vivo* của chúng trên *C. albicans* ATCC 10231.



Hình 6 Hình chụp đại diện kết quả xác định MIC *ex vivo* của phối hợp cao Tr.K – TD BLH (1 mg:4 µL)

Với các mẫu móng sau khi điều trị với chất thử có nồng độ lớn hơn MIC *ex vivo*, sẽ được đặt lại trên môi trường YPG, để xác định MFC *ex vivo*. Kết quả được thể hiện ở Hình 7. Trên môi trường YPG, có sự phát triển trở lại của vi nấm xung quanh móng (đã được điều trị với phối hợp cao Tr.K 0,078 % – tinh dầu

BLH 0,313 %). Ngược lại, với mẫu móng được điều trị bằng phối hợp cao Tr.K 0,156 % - tinh dầu BLH 0,625 %, không có sự phát triển trở lại của vi nấm. Do đó, giá trị MFC *ex vivo* của cao Tr.K và tinh dầu BLH lần lượt là 0,156 % và 0,625 %.



Hình 7 Hình chụp đại diện kết quả xác định MFC *ex vivo* của phối hợp cao Tr.K – TD BLH (1 mg:4 µL)

4 Kết luận

Tóm lại, với mô hình *in vitro* và mô hình tính thấm qua móng *ex vivo*, nghiên cứu này đã chỉ ra phối hợp cao Tr.K – tinh dầu BLH (1 mg:4 µL) có hiệu quả

cộng lực kháng *C. albicans* ATCC 10231. Trong phối hợp, giá trị MIC *ex vivo* kháng *C. albicans* ATCC 10231 đã gây nhiễm vào móng của cao Tr.K, tinh dầu BLH lần lượt là 0,078% (w/v) và 0,313 % (v/v). Đồng thời, nghiên cứu cũng đã xác định được phối hợp cao Tr.K 0,156 % (w/v) và tinh dầu BLH 0,625 % (v/v) có khả năng diệt nấm *C. albicans* ATCC 10231. Các kết quả này tạo tiền đề để phát triển công thức các dạng

bào chế (kem, gel,...) hỗ trợ điều trị bệnh nấm móng *Candida* chứa cao Tr.K và tinh dầu BLH.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.46/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo:

1. Lê Văn Kim Anh, Phạm Bền Chí (2020), "Khảo sát hoạt tính kháng *Candida* spp. của cao Trầu không riêng rẽ và phối hợp với miconazole". Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành. 12, tr.58 -63.
2. Singh D., Narayanamoorthy S., Gamre S. et al. (2018), "Hydroxychavicol, a key ingredient of Piper betle induces bacterial cell death by DNA damage and inhibition of cell division". *Free Radical Biology and Medicine*. 120, pp.62-71.
3. Fani M., Kohanteb J. (2017), "In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens". *Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine*. 22 (4), pp.660-666.
4. Saad N. Y., Muller C. D., Lobstein A. (2013), "Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components". *Flavour and Fragrance Journal*. 28 (5), pp.269-279.
5. Bộ Y tế (2015), Hướng dẫn sử dụng kháng sinh, tr. 29 - 31
6. Ernst E. J., Rogers P. D. (2005), *Antifungal agents: methods and protocols*. Vol. 118, Springer Science & Business Media.
7. Golus J. et al. (2016), "The agar microdilution method—a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts". *Journal of Applied Microbiology*. 121 (5), pp. 1291-1299.
8. Naumann S., Meyer J.-P., Kiesow A. et al. (2014), "Controlled nail delivery of a novel lipophilic antifungal agent using various modern drug carrier systems as well as in vitro and ex vivo model systems". *Journal of Controlled Release*. 180, pp. 60-70.
9. Thatai P., Tiwary A., Sapra B. (2016), "Progressive development in experimental models of transungual drug delivery of anti-fungal agents". *International Journal of Cosmetic Science*. 38 (1), pp. 1-12.
10. Traynor M., Turner R., Evans C. et al. (2010), "Effect of a novel penetration enhancer on the unguinal permeation of two antifungal agents". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62 (6), pp. 730-737.
11. Nguyễn Vũ Giang Bắc, Nguyễn Đình Nga (2012), "Ứng dụng một số mô hình khảo sát tác dụng của chất kháng nấm *ex vivo* trên *Candida albicans*". *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 16(1), tr. 86 - 89.
12. Bộ Y tế (2013), Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học, tr. 736 - 638

Study on anti – *Candida albicans* activities of the combination of Betel extract (*Piper betle* L. Piperaceae) and Thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L. Lamiaceae)

Pham Ben Chi¹, Nguyen Thi Bach Tuyet², Pham Thuy Huong², Phan Kim Thai², Ngo Yen Nhi²

¹Faculty of Medical Laboratory Techniques, Nguyen Tat Thanh University

²Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

pbchi@ntt.edu.vn

Abstract Betel extract contains Hydroxychavicol which inhibits the growth of *Candida albicans* through inhibition of DNA replication. Thyme essential oil was reported about anti – Candidal activity. Its mechanism of action involves the inhibition of ergosterol biosynthesis in the cell membrane. Based on the principle of the combination of two agents that have different mechanisms of action in the treatment of infection, the study was conducted to evaluate the efficacy against *C. albicans* of the combination of betel-extract and thyme essential oil. The results indicated that the combination of betel extract and thyme essential oil (ratio of 1 mg : 4 µL) synergistically interacted on inhibiting *C. albicans* ATCC 10231 *in vitro* and *ex vivo* models of permeability through nail. Besides, *by ex vivo* infected nail model, the research showed that the combination of betel extract 0.156 % (w/v) and thyme essential oil 0.625 % (v/v) killed the fungi. The results could provide basic information to develop some preparations (cream, gel, etc) that contain betel extract and thyme essential oil for the treatment of onychomycosis.

Keywords *Candida* spp., *Piper betle*, Thyme essential oil, onychomycosis.