ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยทางการค้าต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ทิพยรัตน์ ชาหอมชื่น* และวิมลรัตน์ อินศวร

ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
*E-mail: cvttyr@ku.ac.th

รับบทความ: 5 เมษายน 2561 แก้ไขบทความ: 8 สิงหาคม 2561 ยอมรับตีพิมพ์: 24 ตุลาคม 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ตะไคร้บ้าน และอบเชยที่มีขายในเชิงพาณิชย์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis Escherichia coli Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี broth dilution method พบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดโดยมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, MIC) ต่อ *B. subtilis E. coli S. aureus* และ *P. aeruginosa* เท่ากับร้อยละ 0.125 0.25 0.25 และ 1.0 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุด (minimum bactericidal concentration, MBC) เท่ากับร้อยละ 0.5 1.0 0.5 และ 2.0 ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *B. subtilis S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยมีค่า MIC เท่ากับร้อยละ 0.062 0.125 0.125 และ 2.0 ตามลำดับ และมีค่า MBC ต่อ *B. subtilis, S. aureus* และ *E. coli* เท่ากันคือ ร้อยละ 0.25 น้ำมันหอมระเหยอบเชยมีค่า MIC ต่อ *B. subtilis* และ *S. aureus* เท่ากับร้อยละ 1.0 ต่อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เท่ากับร้อยละ 2.0 (โดยปริมาตร) มีค่า MBC ต่อ *B. subtilis S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับร้อยละ 2.0 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูอบเชยและตะไคร้บ้าน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชย ไม่พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน เมื่อหาองค์ประกอบโดยวิธี GC–MS องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยกานพลูคือ eugenol น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านคือ citral และในน้ำมันหอมระเหยอบเชยคือ eugenol และ cinnamondehyde

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย แบคทีเรียก่อโรค

Efficiency of Commercial Essential Oils on Growth Inhibition of Pathogenic Bacteria

Thippayarat Chahomchuen* **and Wimonrut Insuan**

Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology,
Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
*E-mail: cvttyr@ku.ac.th

Received: 5 April 2018 Revised: 8 August 2018 Accepted: 24 October 2018

Abstract

This research aimed to study on the efficacy of commercial essential oil including clove oil, lemongrass oil and cinnamon oil for inhibition the growth of four pathogenic bacteria as *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa.* The results from broth dilution method found that clove oil was the most effective in inhibiting the growth of *B. subtilis, E. coli, S. aureus* and *P. aeruginosa* with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.125, 0.25, 0.25 and 1.0%(v/v) respectively and the minimum bactericidal concentration (MBC) values of 0.5, 1.0, 0.5 and 2.0%(v/v), respectively. *E. coli* was the most sensitive bacteria against lemongrass oil, followed by *B. subtilis S. aureus* and *P. aeruginosa* with the MIC of 0.062, 0.125, 0.125 and 2.0%(v/v). The MBC of *B. subtilis, S. aureus* and *E. coli* was 0.25%(v/v). Cinnamon oil showed the MIC values at 1.0%(v/v) against *B. subtilis* and *S. aureus*, and 2.0%(v/v) against *E. coli* and *P. aeruginosa*. Cinnamon oil was able to kill *B. subtilis, S. aureus* and *E. coli* with the MBC of 2.0%(v/v). These results indicated that clove oil, lemongrass oil and cinnamon oil had the potential antibacterial activity against 4 pathogenic bacteria. Antioxidant activity by DPPH scavenging assay of clove oil exhibited higher activity than cinnamon oil. No antioxidant activity of lemongrass oil was detected. The components of essential oils were analyzed by GC-MS and the results showed eugenol was the major compound in clove oil, citral in lemongrass oil, eugenol and cinnamondehyde in cinnamon oil.

Keywords: Essential oil, Antibacterial activity, Pathogenic bacteria

บทนำ

งานวิจัยทั่วโลกมุ่งให้ความสำคัญกับการศึกษาและพัฒนาสารต้านแบคทีเรียเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบัน สารสกัดจาก

สมุนไพรธรรมชาติ รวมถึงน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส รวมถึงปรสิต มาเป็นเวลานาน (Hammer et al., 1999) งานวิจัยหลายเรื่องยืนยันว่าน้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ได้ดี มีกลไกในการต้านแบคทีเรียหลายรูปแบบ (Algburi et al., 2017) และมีผลข้างเคียงในการรักษาน้อยมากเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมี (Quave et al., 2008) นอกจากนี้ประเทศกลุ่มยุโรป (EU) อนุญาตให้ใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบในอาหาร น้ำหอมและเภสัชภัณฑ์ต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย (Burt, 2004) น้ำมันหอมระเหยกานพลู (clove oil) ตะไคร้บ้าน (lemongrass oil) และอบเชย (cinnamon oil) มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ eugenol cinnamondehyde และ citral ตามลำดับ (Ha et al., 2008; Inouye et al., 2001) น้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดนี้มีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายและมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นสารกันบูดจากธรรมชาติในอาหาร (Jongjeen, 2012; Sirvaityte et al., 2011) แนวโน้มการใช้ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหยส่งผลให้ปริมาณความต้องการใช้น้ำมันหอมระเหยเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับจำนวนบริษัทที่จำหน่ายน้ำมันหอมระเหยในท้องตลาดที่มีจำนวนมาก ผลการวิจัยของ Sirvaityte et al.(2011) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยทางการค้าจากแหล่งต่างๆ มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียใกล้เคียงกันและการทดลองอีกหลายเรื่องยืนยันว่าน้ำมันหอมระเหยทางการค้ามีศักยภาพในการใช้เป็นสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (Choi et al., 2016) ยังไม่มีรายงานผลการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยทางการค้าในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยทางการค้า 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยกานพลู ตะไคร้บ้าน และอบเชย โดยการหาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography–mass spectrometry, GC–MS) โดยเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของแต่ละองค์ประกอบกับแมสสเปกตรัมในฐานข้อมูล National Institute of Standards and Technology data base library (NIST) เพื่อบ่งบอกถึงคุณภาพเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้น ๆ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย 4 ชนิดที่ผู้วิจัยยกมาเป็นตัวแทนการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus subtilis* และ *S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) ด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหยที่มีขายในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการศึกษา

น้ำมันหอมระเหยกานพลู (clove essential oil extra) น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน (lemongrass essential oil) และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ (cinnamon essential oil) ได้จากแหล่งการค้าที่เชื่อถือได้ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C เจือจางน้ำมันหอมระเหยให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 4 ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

นำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดมาวิ-

เคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC–MS (QO2020plus, Shimadzu, Japan) คอลัมน์ BPX5 (ความหนาของฟิล์ม 0.25 µm คอลัมน์ยาว 30 m เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของคอลัมน์ 0.25 mm) ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา ด้วยอัตราการไหล 1 m/s ฉีดตัวอย่าง 1 µL ในโหมดสปริต (split) (100:1) และภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้น 50°C และเพิ่มในอัตรา 5°C ต่อนาที จนถึง 250°C คงที่ 5 นาที อุณหภูมิฉีดสาร 250°C และที่ transfer line 280°C ใช้ความต่างศักย์อิเล็กตรอน 70 อิเล็กตรอนโวลต์ ในโหมดสแกนมวลอะตอมช่วง 40–500 จำแนกชนิดองค์ประกอบด้วยการเทียบกับฐานข้อมูลของ NIST

การทดสอบฤทธิ์ต่อต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity assay

ดัดแปลงจากวิธีของ Cheel et al. (2005) สารละลายมาตรฐานคือวิตามินอี ผสมสารตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย [ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.5 5.0 10.0 20.0 และ 50.00 ppm] 0.5 มิลลิลิตร และสารร้อยละ 0.004 DPPH (2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl) 0.5 mL ในเอทานอล 3.5 mL ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ทำการทดสอบตัวอย่าง ๆ ละ 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระตามสมการ (1)

$$\%\text{DPPH inhibition} = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100 \quad \text{- - - (1)}$$

เมื่อ Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงควบคุมของสารละลายผสม DPPH กับเอทานอล

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

สร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%radical scavenging) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินอีซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกในการทดลอง

การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 4 ชนิด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *B. subtilis* TISTR 1248 และ *S. aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 เตรียมเชื้อในการทดสอบโดยนำแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งชนิด nutrient agar บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้มาปั่นล้างด้วย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 3 รอบ ที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.01 โดยใช้ Muller Hilton broth (MHB) ในการเจือจาง

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, MIC และ minimum Bactericidal Concentration, MBC)

วิธีการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) ในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม (adapted from Dussault et al., 2014) โดยเริ่มจากความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ร้อยละ 4 (โดยปริมาตร) และเจือจางด้วยวิธี two–fold dilution ชุดควบคุมบวกประกอบด้วยอาหาร MHB 98 µL และน้ำมันหอมระเหย 2 µL ชุดทดลองประกอบ

ด้วย สารละลายแบคทีเรีย 196 µL น้ำมันหอมระเหย 4 µL จากนั้นเจือจางแบบ two–fold dilution ด้วยสารละลายแบคทีเรีย 100 µL และกำหนดชุดควบคุมลบประกอบด้วยแบคทีเรียแขวนลอย 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพลทที่ผ่านการบ่มแล้ว นำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท ทำการทดลอง 5 ซ้ำต่อเพลท วิเคราะห์หาค่า MIC จากผลการอ่านค่าดูดกลืนคลื่นแสง โดยแถวที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียคือค่า MIC จากนั้นทำการทดลองเพื่อหาค่า MBC โดยนำสารละลายปริมาตร 2 µL จากหลุมที่มีความเข้มข้นที่เป็น MIC และอีก 2 ความเข้มข้นที่มากกว่า มาหยดลงบน LB Agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้คือค่า MBC

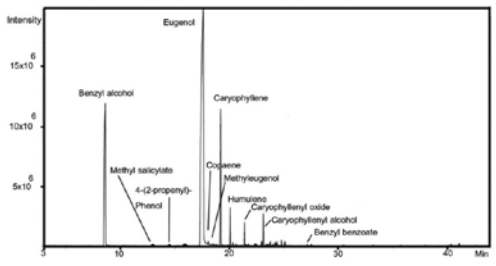
การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อแบคทีเรีย

การศึกษากลไกความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยหากน้ำมันหอมระเหยมีกลไกทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแตกหรือเสียหาย สามารถสังเกตจากส่วนประกอบในไซโทพลาซึมที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งตรวจสอบปริมาณการรั่วไหลของสารพันธุกรรมจากเซลล์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ตามวิธีของ Bajpai et al. (2014) นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้มาปั่นล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline จำนวน 3 รอบ ที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ปรับความขุ่นของเซลล์ให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.01 โดยใช้ peptone water เข้มข้นร้อยละ 0.1 จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (ตาราง 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตัวอย่างที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นชุดควบคุมลบ ทำการเก็บเซลล์ที่เวลา 0 30 และ 60 นาที ปั่นแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง UV–Vis spectrophotometer (NanoDrop 2000C, ThermoScientific, USA) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (p = 0.01)

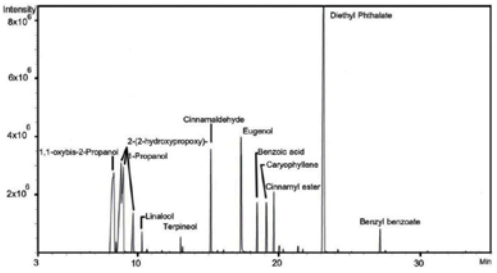
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยกานพลู ตะไคร้บ้านและอบเชย วิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญด้วยวิธี GC–MS ได้โครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (ภาพที่ 1ก) ตะไคร้บ้าน (ภาพที่ 1ข) และอบเชย (ภาพที่ 1ค) ซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดเมื่อเทียบแมสสเปกตรัมกับฐานข้อมูล NIST สามารถระบุชนิดที่เป็นไปได้ และร้อยละของปริมาณที่เป็นไปได้ขององค์ประกอบ (ตาราง 1)

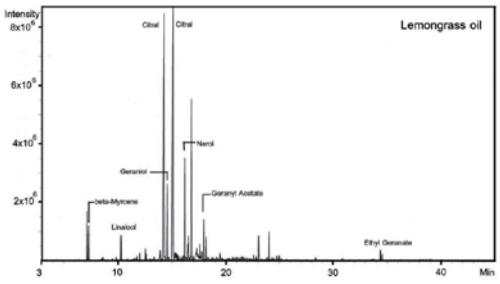
องค์ประกอบหลักที่พบสูงสุดในน้ำมันหอมระเหยกานพลูคือ eugenol (ร้อยละ 66.90) น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านพบองค์ประกอบหลักคือ citral (ร้อยละ 76.50) สำหรับน้ำมันหอมระเหยอบเชยพบองค์ประกอบหลักคือ cinnamondehyde (ร้อยละ 5.77) และ eugenol (ร้อยละ 6.64) แต่พบว่าไม่ใช่ปริมาณสูงสุดที่เป็นองค์ประกอบเนื่องจากเมื่อทดสอบน้ำมันหอมระเหยอบเชยทางการค้าด้วย GC–MS พบไดเอททิลพทาเลต (diethyl phthalate) ในปริมาณร้อยละ 31.36 และสารประกอบไดโพรไพลีนไกลคอล ซึ่งประ-



(ก)



(ค)



(ข)

ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC–MS ของ น้ำมันหอมระเหย (ก) กานพลู (ข) ตะไคร้บ้าน และ (ค) อบเชย

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ตะไคร้บ้าน และอบเชย จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GC–MS

น้ำมันหอมระเหยกานพลู		น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน		น้ำมันหอมระเหยอบเชย	
Compound*	Relative area (%)	Compound*	Relative area (%)	Compound*	Relative area (%)
Benzyl alcohol	19.71	Beta–myrcene	1.89	1,1–oxybis–2–propanol	18.27
Methyl salicylate	0.05	Linalool	1.64	2–(2–hydroxypropoxy) – 1–propanol	28.54
4–(2–propenyl)–phenol	0.09	Citronellol	0.76	Linalool	0.76
Eugenol	66.90	Citral	76.50	Cinnamaldehyde	5.77
Copaene	0.13	Geraniol	7.85	Eugenol	6.64
Methyleugenol	0.05	Nerol	7.48	Terpineol	0.62
Caryophyllene	9.59	Geranylacetate	2.65	Benzoic acid	2.17
Humulene	1.18	Ethyl geranate	1.24	Caryophyllene	2.17
Caryophyllenyl alcohol	0.24			Cinnamyl ester	2.64
Caryophyllenyl oxide	1.97			Diethyl phthalate	31.36

*เทียบกับฐานข้อมูล GC-MS library

กอบด้วย 1,1–oxybis–2–propanol ปริมาณร้อยละ 18.27 และ 2–(2-hydroxypropoxy)–1–propanol ปริมาณร้อยละ 28.54 โดยทั่วไปสารทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นสารกลุ่มพลาสติกไซเซอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในเครื่องสำอาง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ที่มีการใช้สารเหล่านี้ในการละลายน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสารสำคัญที่ตรวจพบในน้ำมันหอมระเหยทางการค้าทั้ง 3 ชนิดสอดคล้องกับการรายงานของ

Ha et al. (2008) และ Inouye et al. (2001) พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลู (clove oil) ตะไคร้บ้าน (lemongrass oil) และอบเชย (cinnamon oil) มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ eugenol citral และ cinnamondehyde ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ดังแสดงในตาราง 2 เปรียบเทียบกับวิตามินอี พบว่า ค่า IC_{50} ของการยับยั้งสาร DPPH ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและอบเชยมีค่าเท่ากับ 5.84 และ 50.3 ppm ตามลำดับ ไม่พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน

ตาราง 2 ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด ทดสอบด้วยวิธี DPPH

น้ำมันหอมระเหย	IC_{50} of DPPH (ppm)
น้ำมันหอมระเหยกานพลู	5.84
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน	N/A
น้ำมันหอมระเหยอบเชย	50.3
วิตามิน อี	2.18

N/A = ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ตะไคร้บ้าน และอบเชย ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลวในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม (ตาราง 3) พบว่า น้ำมันหอมระเหยทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ น้ำมันหอมระเหยอบเชยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* เท่ากับร้อยละ 1 *E. coli* และ *P. aeruginosa* เท่ากับร้อยละ 2 โดยน้ำมันหอมระเหยอบเชยสามารถฆ่าเชื้อ *B. Subtilis S. aureus* และ *E. coli* ได้ที่ค่า MBC เท่ากับร้อยละ 2 จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูและน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีใกล้เคียงกัน แต่น้ำมันหอมระเหยกานพลูมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียทดสอบได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน โดยน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบยกเว้น *P. aeruginosa* ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นสูงในการยับยั้งและไม่สามารถฆ่าเชื้อชนิดนี้ได้ที่ความเข้มข้นทดสอบทั้งนี้อาจเกิดจาก *P. aeruginosa* มีการสร้างเยื่อหุ้มไบโอฟิล์มเพื่อการป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อม (Kavanaugh and Ribbeck, 2012) และจากโครงสร้างของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบที่มี outer membrane (Inouye et al., 2001) ทำให้ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยลดลง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Andrade et al. (2014) ที่รายงานว่า *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

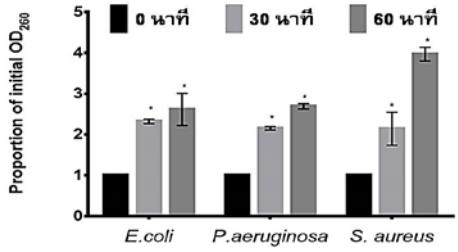
เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยจะออกฤทธิ์โดยการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ รบกวนโครงสร้างของแบคทีเรีย และทำให้เกิดการรั่วไหลของสารในไซโทพลาซึมของเซลล์ ทำให้แบคทีเรียถูกทำลาย การรั่วของผนังเซลล์สามารถวัดปริมาณกรดนิวคลีอิคจากแบคทีเรียที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ทดสอบโดยใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC หลังจากบ่มเชื้อแบคทีเรียร่วมกับน้ำมันหอมระเหยเป็นเวลา 30 และ 60 นาที พบว่า ค่า OD_{260} ในชุดทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับที่เวลา 0 นาที (ภาพที่ 2)

ตาราง 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MICs, MBCs)

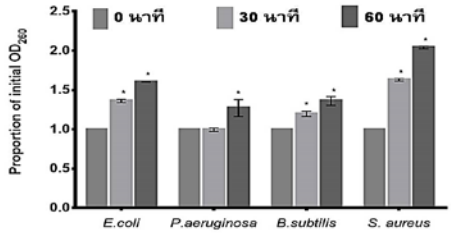
ชนิดของแบคทีเรีย	น้ำมันหอมระเหย					
	กานพลู		ตะไคร้บ้าน		อบเชย	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	% (v/v)	% (v/v)	% (v/v)	% (v/v)	% (v/v)	% (v/v)
B. subtilis	0.125	0.50	0.125	0.25	1.0	2.0
S. aureus	0.25	1.0	0.125	0.25	1.0	2.0
E. coli	0.25	0.5	0.062	0.25	2.0	2.0
P. aeruginosa	1.0	2.0	2.0	N/A	2.0	N/A

N/A = ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

โดยน้ำมันหอมระเหยกานพลูและอบเชยสามารถออกฤทธิ์ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดความเสียหายได้ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยอบเชยออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบทั้ง 4 ชนิด ส่วนน้ำมันหอมระเหยกานพลูออกฤทธิ์ต่อ *E. coli P. aerugi-nosa* และ *S. aureus* แต่ไม่มีผลต่อ *B.subtilis* ในระยะเวลาทดสอบ และการทดลองนี้ไม่สามารถตรวจพบปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นของแบคทีเรียทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านในระยะเวลา 60 นาทีที่ใช้ทดสอบ ผลการ ศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นในการยืนยันศักยภาพของน้ำมันหอมระเหยทางการค้าที่มีขายในท้องตลาดทั่วไป เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมีและลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะต่อไปได้ โดยอาจนำมาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดที่ผลิตเองในครัวเรือน เช่น สเปรย์ฆ่าเชื้อในอากาศ น้ำยาล้างพื้น แชมพู รวมถึงแชมพูอาบน้ำสุนัข



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2 ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย (ก) กานพลู และ (ข) อบเชย ที่ความเข้มข้นของค่า MIC ต่อ *E. coli P. aeruginosa* และ *S. aureus* โดยวัดการรั่วไหลของสารพันธุกรรมจากเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm เครื่องหมาย (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.01$

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ตะไคร้บ้าน และอบเชยที่มีขายในเชิงพาณิชย์ พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลูและอบเชยมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *B .sub-*

tilis S .aureus E .coli และ *P .aeruginosa* พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลูและตะไคร้บ้านมีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ น้ำมันหอมระเหยอบเชยมีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบในระดับปานกลาง โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อการรั่วไหลของสารพันธุกรรมในแบคทีเรีย พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลูและอบเชยสามารถออกฤทธิ์ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดความเสียหายได้ แต่ไม่สามารถตรวจพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารพันธุกรรมในแบคทีเรียทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านได้

เอกสารอ้างอิง

Algburi, A., Comito, N.,Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., and Chikindas,M. L. (2017). Control of biofilm formation: antibiotic and boyond. **Applied and Environmental Microbiology** 83(6): e00165–e00117.

Bajpai, V. K., Sharma, A., and Baek, K. H. (2014). Antibacterial mode of action of the essential oil obtained from *Chamaecyparis obtuse*sawdust on the membrane integrity of selected foodborne pathogens. **Food technology and Biotechnology** 52(1): 109–118.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology** 94(3): 223–253.

Cheel, J., Theoduloz, Rodriguez, C. J., and Schmeda–Hirschmann, G.(2005). Free radical scavengers andantioxidants from lemongrass [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53(7):2511–2517.

Choi, O., Cho, S. K., Kim, J. Park, C. G., and Kim, J. (2016). *In vitro* antibacterial activity and major bioactive components of *Cinnamomum verum* essential oils against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sorbrinus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 6(4): 308–314.

de Almeida Silva, K. C. F., Calomino, M. A., Devtsch, G.,de Castilho, S. R.,de Paula, G. R., Esper, L. M. R.,and Teixeira,L. A. (2017). Molecular characterization of multi drug–resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. **BURNS** 43(1): 137–143.

Dussault, D., Vu, K. D., and Lacroix, M. (2014). *In vitro* evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds aganist food pathogens and application in ham. **Meat Science** 96(1): 514–520.

Ha, H. K. P., Maridable, J., Gaspillo, P., Hasika, M., Malaluan, R. and Kawasaki, J. (2008). Essential oil from lemongrass extracted by supercritical carbon dioxide. **The Philippine Agricultural Scientist** 91(1): 36–41.

Hammer, K.A, Carson, C. F., and Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential

oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology** 86(6): 985–990.

Inouye, S., Takizawa, T., and Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 47(5): 565-573.

Jongjeen, J. 2012. Efficiency of essential oils from medicinal plants for inhibition of fungal causing spoilage in bread. **Agricultural Science Journal** 43(2)(Supplement): 145–148. (in Thai)

Kavanaugh, N. L., and Ribbeck, K.(2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology** 78(11): 4057–4061.

Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T. and Bennett, B. C.(2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology** 118(3): 418–428.

Sirvaityte, J., Siugzdaite, J., and Valeika, V. (2011). Application of commercial essential oils of eucalyptus and lavender as natural preservative for leather tanning industry. **Revista de Chimie (Bucharest)** 62(9): 8848–893.

Woodford, N., and Livermore,D. M. (2009). Infections caused by gram–positive bacteria: A review of the global challenge. **Journal of Infection** 59 (Supplement 1): S4–S16.