ผลของน้ำมันหอมระเหยกะเพราต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *Candida albicans* และผลการเสริมฤทธิ์เมื่อใช้ร่วมกับยาไนสแตติน

ไกรินทร์ ไกรศรีวรรธนะ* จุฬาลักษณ์ นุชนนท์ วันวิสาข์ แสนคมคาย*****
วงศ์วรุฒม์ บุญญานุโกมล****

บทคัดย่อ

การรักษาโรคติดเชื้อราแคนดิดาในช่องปากโดยทั่วไปคือการใช้ยาต้านเชื้อราแผนปัจจุบัน ซึ่งอาจก่อให้เกิดภาวะเชื้อดื้อต่อยาหรืออาการข้างเคียงจากยาที่รักษา การเลือกใช้สมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่อาจช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยกะเพราในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *Candida albicans* รวมทั้งผลการเสริมฤทธิ์เมื่อใช้ร่วมกับยาไนสแตติน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: ทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพราโดยวิธีดิสค์ดิฟฟิวชั่นและไมโครบรอทไดลูชั่น ศึกษาการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาไนสแตตินโดยการวิเคราะห์ค่า FICI วิธีไทม์คิลถูกใช้ในการศึกษาระยะเวลาในการทำลายเชื้อ ขณะที่การศึกษารูปร่างของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด และสุดท้ายการศึกษาฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มที่ถูกสร้างขึ้นมาโดยใช้วิธีย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเล็ต

ผลการทดลอง: น้ำมันหอมระเหยกะเพรามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* โดยมีค่า MIC และ MFC เฉลี่ยเท่ากับ 1.25 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกับยาไนสแตตินโดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.71 โดยน้ำมันหอมระเหยกะเพราสามารถทำลายเชื้อได้ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์ที่ถูกทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยมีรูปร่างเหี่ยวและหดตัวเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนั้นน้ำมันหอมระเหยกะเพรายังมีความสามารถในการทำลายไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้นมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุป: น้ำมันหอมระเหยกะเพรามีศักยภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* และสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกับยาไนสแตติน ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาต่อยอดต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: *Candida albicans,* น้ำมันหอมระเหยกะเพรา ยาไนสแตติน ไบโอฟิล์ม การเสริมฤทธิ์

**เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไปประจำห้องปฏิบัติการ สังกัดกลุ่มงานบริการเครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 259 หมู่ที่ 13 ตำบลโนนหนามแท่ง อำเภอเมืองอำนาจเจริญ จังหวัดอำนาจเจริญ 37000*

***นักวิทยาศาสตร์ สังกัดกลุ่มงานบริการเครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 259 หมู่ที่ 13 ตำบลโนนหนามแท่ง อำเภอเมืองอำนาจเจริญ จังหวัดอำนาจเจริญ 37000*

****ผู้ช่วยวิจัย สังกัดหน่วยวิจัย โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 259 หมู่ที่ 13 ตำบลโนนหนามแท่ง อำเภอเมืองอำนาจเจริญ จังหวัดอำนาจเจริญ 37000*

*****อาจารย์กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์และอักษรศาสตร์ และหัวหน้ากลุ่มงานบริการเครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 259 หมู่ที่ 13 ตำบลโนนหนามแท่ง อำเภอเมืองอำนาจเจริญ จังหวัดอำนาจเจริญ 37000*

Effects of *Ocimum sanctum* essential oil on anti-proliferation and biofilm destruction in *Candida albicans* and its synergy with Nystatin

Kairin Kraisriwattana* Julalak Nutchanon Wanwisa Sankomkai*****
Wongwarut Boonyanugomol****

Abstract

Current anti-fungal drugs were widely used for oral candidiasis therapy, but drug resistant and side effects were also found. Investigation of natural compounds is an alternative choice for these issues.

Objective: To investigate the anti-proliferation and biofilm destruction in *Candida albicans* by the essential oil from *Ocimum sanctum* and determination of synergistic activity of the essential oil combined with Nystatin.

Methods: Anti-proliferation in *C. albicans* was determined by disc diffusion assay and microbroth dilution method. Synergistic activity between the essential oil and Nystatin was analyzed by Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). The Time-kill assay was used to determine the reduction of *C. albicans*-treated with the essential oil at various times. The *C. albicans* morphology exposed to the essential oil was observed by scanning electron microscope. The destruction of *C. albicans* biofilms were examined by crystal violet staining assay.

Results: *O. sanctum* essential oil had an anti-proliferative activity against *C. albicans* with MIC and MFC of 1.25 and 1.75 mg/ml, respectively. Additionally, this essential oil combined with Nystatin showed the synergism on *C. albicans* inhibition (FICI = 0.71). The essential oil from *O. sanctum* could inhibit *C. albicans* growth within 2 h and cells with shrinkage morphology were observed in *C. albicans*-treated cells compared to control. Interestingly, the levels of *C. albicans* biofilm mass were significantly decreased after exposure to *O. sanctum* essential oil compared to the control.

Conclusions: The essential oil from *O. sanctum* showed the potent anti-proliferation and biofilm destruction in *C. albicans* and synergism with Nystatin. This is the basic data for further therapeutic drug development of oral candidiasis.

Keywords: *Candida albicans, Ocimum sanctum,* essential oil, Nystatin, Biofilm, Synergism

**General Administration Officer of Laboratory, Unit of Scientific Instruments and Equipments Services, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, 259, Non Nam Tang sub-district, Mueang district, Amnat Charoen, 37000, Thailand.*

***Scientist, Unit of Scientific Instruments and Equipments Services, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, 259, Non Nam Tang sub-district, Mueang district, Amnat Charoen, 37000, Thailand.*

****Researcher Assistant, Unit of Research, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, 259, Non Nam Tang sub-district, Mueang district, Amnat Charoen, 37000, Thailand.*

*****Lecturer, Department of Sciences and Liberal Arts, Head of Unit of Scientific Instruments and Equipments Services, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, 259, Non Nam Tang sub-district, Mueang district, Amnat Charoen, 37000, Thailand.*

บทนำ (Introduction)

โรคติดเชื้อแคนดิดา (Candidiasis) มีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งเป็นรากลุ่มยีสต์ที่มีรูปร่างกลมรี มักตรวจพบการสร้างสายราเทียม (pseudohyphae) และสายราแท้ (true hyphae) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะเป็นกรดอ่อน ๆ และมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อีกทั้งเชื้อยังมีความสามารถในการสร้าง germ tube ได้ในสภาวะที่มีซีรั่มหรืออัลบูมิน (1) โดยส่วนใหญ่ยีสต์กลุ่มนี้พบว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นในร่างกายของมนุษย์ เช่น ช่องปาก ช่องคลอด ผิวหนัง และทางเดินอาหาร เป็นต้น (2) อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี (HIV) จัดเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงที่มักพบการติดเชื้อ *C. albicans* เช่น โรคฝ้าขาวในช่องปาก (oral candidiasis) เป็นต้น (3) โดยอาการฝ้าขาวในช่องปากจากการติดเชื้อ *C. albicans* จัดเป็นตัวบ่งชี้ว่าผู้ป่วยเข้าสู่การเป็นโรคเอดส์แบบแสดงอาการ (4) โดยรอยโรคพบเป็นฝ้าขาวคล้ายคราบนมบริเวณกระพุ้งแก้มและบริเวณอื่น ๆ ในช่องปาก เช่น ลิ้น และเพดานปาก รวมทั้งผู้ป่วยอาจมีอาการอักเสบที่ริมฝีปากและมุมขอบปากร่วมด้วย (angular cheilitis) ยาไนสแตติน (Nystatin) พบว่าเป็นยาทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการฝ้าขาวในช่องปากจากการติดเชื้อ *C. albicans* ซึ่งจัดเป็นยาในกลุ่มโพลิอีนแมคโครลิด (polyene macrolide) ซึ่งมีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่าน (permeability) ของเซลล์เมมเบรนของยีสต์ และทำให้ยีสต์ถูกทำลายไปในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามยาไนสแตตินยังพบว่ามีผลข้างเคียงบางอย่างในผู้ป่วยบางราย เช่น คลื่นไส้ อาเจียน และผลต่อระบบทางเดินอาหารเป็นต้น (5) ดังนั้นการศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* รวมทั้งความสามารถในการเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกับยาไนสแตตินจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจเพื่อใช้ในการพัฒนาต่อยอดเป็นสารสกัดทางเลือกที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก ลดผลข้างเคียงจากยาต้านเชื้อราในปัจจุบัน

กะเพรา *(Ocimum sanctum)* เป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็ก พบได้ทั่วไปในพื้นที่เขตร้อน และในประเทศไทยสามารถพบพืชชนิดนี้ได้ทั่วไปโดยถูกนำมาใช้ในการประกอบอาหารแต่ช้านาน จากการศึกษาเบื้องต้นก่อนหน้านี้โดย Hakkim และคณะ 2007 พบว่าสารสกัดจากกะเพรามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลายชนิด เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเปอร์ออกไซด์ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน เป็นต้น โดยพบว่าในส่วนของใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าส่วนของกิ่งและดอก (6) นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพรายังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (7)

ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่ากะเพรามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้านรวมทั้งมีความปลอดภัยในระดับหนึ่งเนื่องจากเป็นพืชที่คนไทยนำมาประกอบอาหารอยู่เป็นประจำ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพราร่วมกับการศึกษาการเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกับยาต้านเชื้อรา ดังนั้นงานวิจัยเรื่องนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกะเพราในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* รวมถึงการศึกษาการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาต้านเชื้อราไนสแตติน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์หรือยาสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปากต่อไปในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนชุดกลาง มหาวิทยาลัยมหิดล โดยได้รับการพิจารณาเป็นโครงการที่ได้รับการยกเว้นการรับรองจริยธรรมการวิจัยในคน (Research with exemption from IRB review)

การเตรียมน้ำมันหอมระเหย

นำส่วนใบของกะเพรามาทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ (hydrodistillation) ซึ่งเติมสารโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (Na_2SO_4) เพื่อช่วยดูดซับน้ำให้ง่ายต่อการแยกน้ำมันหอมระเหย โดยส่วนน้ำมันที่สกัดได้จะถูกเก็บรักษาไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *C. albicans* จำนวน 1 สายพันธุ์ ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการกลาง งานบริการเครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. albicans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Sabouraud Dexdrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเชื้อในลักษณะแขวนลอย เมื่อครบกำหนดเวลาทำการปรับปริมาณเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 Mc Farland (ประมาณ $1x10^6$ CFU/ml) เพื่อเตรียมใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธีดิสค์ดิฟฟิวชั่น (Disc diffusion)

การศึกษาโดยวิธี disc diffusion ส่วนหนึ่งอ้างอิงตามวิธีการศึกษาของ Gavanji และคณะ 2015 (8) เริ่มจากนำสำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อ *C. albicans* ที่ปรับระดับปริมาณเซลล์ที่ระดับ 0.5 Mc Farland โดยนำสำลีพันปลายไม้ดังกล่าวป้ายระบายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA จากนั้นทำการหยดน้ำมันหอมระเหยกะเพราปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นดิสค์ยาเปล่า (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้น้ำมันหอมระเหยซึมทั่วแผ่นดิสค์ยา ต่อมาทำการคีบแผ่นดิสค์ยาดังกล่าววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA (ที่ทำการป้ายเชื้อไว้เรียบร้อยแล้ว) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดำเนินการอ่านผลการทดลองโดยวัดค่าพื้นที่การยับยั้ง (inhibition zone) โดยวัดผ่านจุดศูนย์กลางของแผ่นดิสค์ยาในหน่วยมิลลิเมตร โดยทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง หากพื้นที่การยับยั้งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 8 มิลลิเมตร ถือว่าเชื้อไม่มีความไวต่อสาร (not sensitive) เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 8-14 มิลลิเมตร ถือว่าเชื้อมีความไวต่อสาร (sensitive) เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 15-19 มิลลิเมตร ถือว่าเชื้อมีความไวมากต่อสาร (very sensitive) และหากเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 20 มิลลิเมตร ถือว่าเชื้อมีความไวมากที่สุดต่อสาร (extremely sensitive) ซึ่งอ้างอิงตามวิธีการของ Ponce และคณะ 2003 (9)

การศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกะเพราในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *C. albicans*

ทำการศึกษาโดยวิธีไมโครบรอทไดลูชั่น (Microbroth dilution) เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกะเพราในการยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และทำลายเชื้อ (Minimum Fungicidal Concentration, MFC) อ้างอิงตามวิธีการศึกษาของ Gavanji และคณะ 2015 (8) เริ่มด้วยการเตรียมน้ำมันหอมระเหยกะเพราเป็นสารละลายตั้งต้นที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB + 50% เอทธานอล) จากนั้นเจือจางน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวในระดับความเข้มข้นต่างๆ แบบ 2-fold serial dilution โดยแต่ละความเข้มข้นจะถูกเติมลงในหลุมของไมโครเพลทหลุมละ 50 ไมโครลิตร (คำนวนให้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมอยู่ในช่วงตั้งแต่ 10 – 0.0001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อมาจึงเติมสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ (0.5 Mc Farland) ลงในหลุมไมโครเพลทหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไมโครเพลทเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายเรซาซูริน (Resazurin) ความเข้มข้น 0.1% ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลทหลุมละ 10 ไมโครลิตร นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ

กำหนดเวลาการอ่านผล MIC ให้บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารละลายในหลุมเป็นสีน้ำเงิน ในขณะที่การอ่านผล MFC ทำโดยการหยดสารละลายเชื้อจากหลุมที่ไม่พบการเจริญ (สีน้ำเงิน) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหาร SDA การทดลองนี้ตัวควบคุมด้านลบ (Negative control) คือ เอทานอล ความเข้มข้น 5%

การทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของยาต้านเชื้อราไนสแตติน ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกันกับน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบระยะเวลาในการทำลายเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพรา

การทดสอบหาระยะเวลาในการทำลายเชื้อ *C. albicans* จากฤทธิ์น้ำมันหอมระเหยกะเพรา ดำเนินการทดสอบโดยวิธีไทม์คิล (Time-kill assay) เริ่มจากการเตรียมสารละลายเชื้อที่ปรับความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 Mc Farland นำมาทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยกะเพราที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับค่า MFC ในหลอดทดลองแก้ว จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 ชั่วโมง โดยในแต่ละเวลาให้นำเซลล์ที่ผ่านการทดสอบมาทำการเจืองจางแบบ 10-fold serial dilution และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิต โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การศึกษาลักษณะรูปร่างเชื้อ *C. albicans* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

นำสารละลายเชื้อ *C. albicans* (0.5 Mc Farland) ทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยกะเพราที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับค่า MFC ในหลอดทดลอง เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายเชื้อดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer Saline) จำนวน 2 ครั้ง ต่อมาตะกอนเซลล์ดังกล่าวถูกนำไปแช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) ความเข้มข้น 2.5% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 2 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์หยดบนกระจกปิดสไลด์ (cover slip) และทำให้แห้งในเครื่องทำแห้งตัวอย่างแบบวิกฤต (critical point dryer) และเคลือบด้วยทองบริสุทธิ์ สุดท้ายนำตัวอย่างที่เตรียมได้มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope) (JSM 5410 LV; JEOL, Tokyo, Japan)

การทดสอบการเสริมฤทธิ์ระหว่างน้ำมันหอมระเหยกะเพราร่วมกับยาไนสแตตินในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans*

เตรียมสารละลายผสมระหว่างน้ำมันหอมระเหยกะเพราและยาไนสแตตินในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการหาค่า MIC แล้วคำนวณหาค่าการเสริมฤทธิ์แบบ Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) โดยอ้างอิงตามวิธีของ Fratini และคณะ 2017 (10) ดังสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\Sigma FICI = \frac{\text{ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยร่วมกับยาต้านเชื้อรา}}{\text{ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหย}} + \frac{\text{ค่า MIC ของยาต้านเชื้อราร่วมกับน้ำมันหอมระเหย}}{\text{ค่า MIC ของยาต้านเชื้อรา}}$$

การแปลผล คือ

ถ้าค่า $\Sigma FICI < 1$ การแปลผลคือเสริมฤทธิ์กัน (Synergism)

ถ้าค่า $\Sigma FICI$ มีค่าเท่ากับ 1 การแปลผลคือ มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กัน (Additive)

ถ้าค่า $\Sigma FICI$ มีค่าระหว่าง 1.1-2 การแปลผลคือไม่พบความแตกต่าง (Indifferent)

ถ้าค่า $\Sigma FICI > 2$ ขึ้นไป การแปลผลคือต้านฤทธิ์กัน (Antagonism)

การศึกษาฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มจากน้ำมันหอมระเหยกะเพรา

การตรวจวัดระดับไบโอฟิล์มอ้างอิงตามวิธีของ Melo และคณะ 2011 (11) โดยทำการปรับปริมาณเชื้อ *C. albicans* เทียบเท่าระดับ 0.5 Mc Farland (ในอาหารเหลว RPMI 1640) จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับปริมาณแล้วลงในหลุมของไมโครเพลทในปริมาณหลุมละ 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อส่วนหนึ่งมีการสร้างมวลไบโอฟิล์มกับพื้นผิวไมโครเพลท เมื่อครบกำหนดเวลาทำการดูดอาหารเหลวเดิมซึ่งมีเชื้อส่วนที่ไม่ได้เกาะติดกับพื้นผิวของไมโครเพลทออกมา โดยส่วนที่มีการเกาะติดกับพื้นผิวไมโครเพลทคือไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้น ต่อมาทำการล้างไมโครเพลทด้วยอาหารเหลว RPMI 1640 จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที (พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที) เพื่อกำจัดเชื้อส่วนที่ไม่ได้เกาะติดให้มากที่สุด จากนั้นจึงเติมสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกะเพราหรือยาไนสแตตินที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับค่า MFC ลงในหลุมของไมโครเพลท (250 ไมโครลิตร/หลุม) เพื่อทดสอบฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้นมา โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแต่ละเวลา ทำการดูดส่วนของเหลวออกและล้างไมโครเพลทด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนจำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที (พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที) จากนั้นทิ้งไมโครเพลทให้แห้งสนิทประมาณ 30 นาที ทำการย้อมไบโอฟิล์มโดยใช้สารละลายสีคริสตัลไวโอเล็ต (ความเข้มข้น 0.4%) ปริมาณ 250 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเทสีออกให้หมดและล้างหลุมไมโครเพลทด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที (พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที) สุดท้ายทิ้งไมโครเพลทให้แห้งสนิท และทำการละลายสีด้วยเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ระดับปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อที่ถูกทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยหรือยาไนสแตตินจะถูกเปรียบเทียบกับระดับไบโอฟิล์มกลุ่มควบคุม

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงค่าออกมาในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ความแตกต่างกันใช้สถิติ student t-test โดยหากค่า p-value มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง (Results)

1. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพรา

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 ยาไนสแตตินแสดงความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธีดิสค์ดิฟฟิวชั่น ซึ่งตรวจพบวงใสแสดงการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 20.33 มิลลิเมตร (ที่ระดับความเข้มข้นของยาไนสแตติน 0.1 มิลลิกรัมต่อดิสค์) โดยพบว่ายาไนสแตตินมีค่า MIC และ MFC ต่อเชื้อ *C. albicans* เฉลี่ยเท่ากับ 0.0052 และ 0.0130 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยกะเพราสามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* ได้เช่นเดียวกัน โดยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสยับยั้งเชื้อมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 18.17 มิลลิเมตร (ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 10 มิลลิกรัมต่อดิสค์) โดยน้ำมันหอมระเหยกะเพรามีค่า MIC และ MFC ต่อเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 1.25 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์การทำงานระหว่างน้ำมันหอมระเหยกะเพราร่วมกับยาไนสแตติน โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยการเสริมฤทธิ์แบบ Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) เท่ากับ 0.71 ซึ่งบ่งชี้ว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพราและยาไนสแตตินมีการทำงานแบบเสริมฤทธิ์กัน (Synergism FICI < 1)

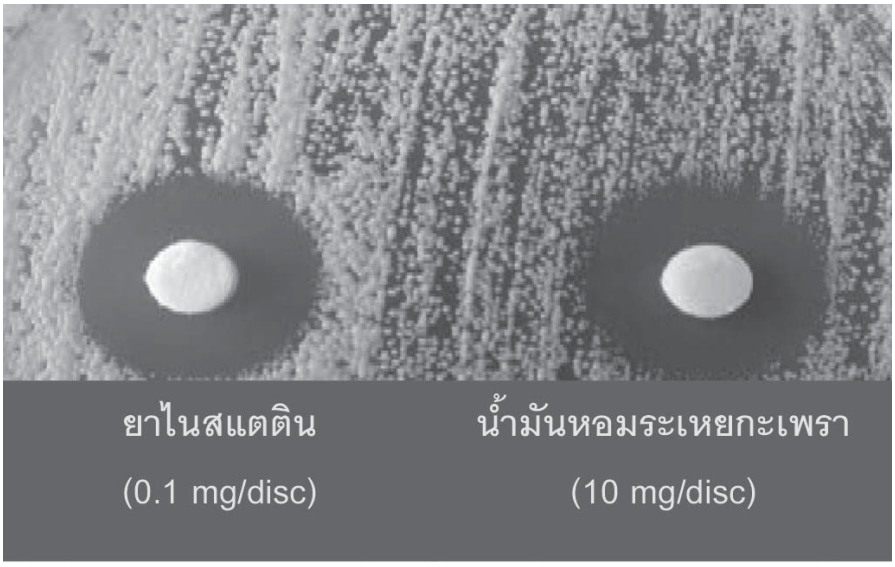
ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพรา ยาไนสแตติน และการเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกัน

Table 1. Anti-*C. albicans* proliferation from *O. sanctum* essential oil or Nystatin and synergistic activity examination.

เชื้อจุลินทรีย์	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพรา			การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* จากยาไนสแตติน			Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI)
	Inhibition zone (mm) (10 mg/disc)	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)	Inhibition zone (mm) (0.1 mg/disc)	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)	
C. albicans	18.17 ± 1.94	1.25 ± 1.06	1.75 ± 1.77	20.33 ± 3.06	0.0052 ± 0.002	0.0130 ± 0.005	0.71±0.11(S)

การแสดงผลในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ครั้ง

S = Synergism แสดงค่าการเสริมฤทธิ์กัน

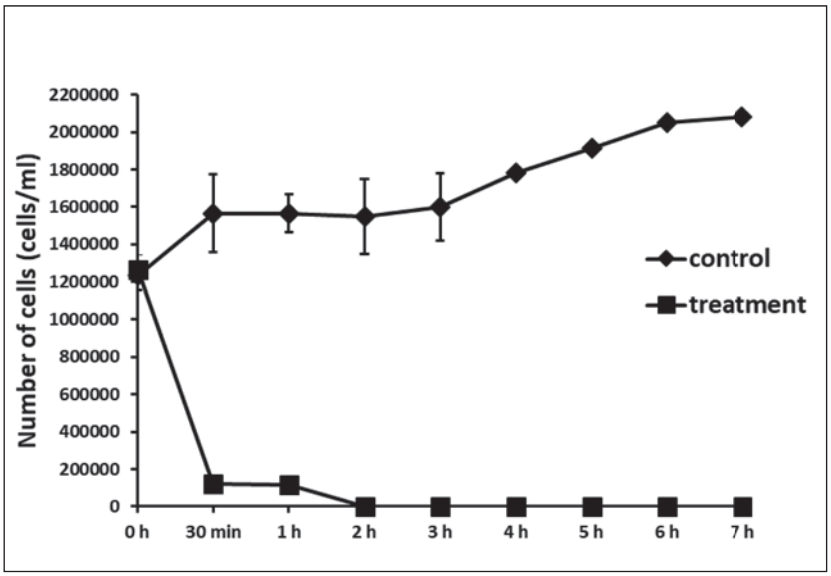


รูปที่ 1 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* จาก (ด้านซ้าย) ยาไนสแตติน (0.1 mg/disc) และ (ด้านขวา) น้ำมันหอมระเหยกะเพรา (10 mg/disc) โดยวิธีดิสค์ดิฟฟิวชั่น

Fig 1. Anti-*C. albicans* proliferation from (left disc) Nystatin (0.1 mg/disc) and (right disc) *O.sanctum* essential oil (10 mg/disc) by using disc diffusion assay.

2. การศึกษาระยะเวลาในการทำลายเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพรา

เมื่อทำการศึกษาระยะเวลาในการทำลายเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพราโดยวิธีไทม์คิล (Time-killed assay) โดยใช้ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหยกะเพราเทียบเท่ากับระดับค่า MFC พบว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพราสามารถทำลายเชื้อ *C. albicans* ได้ในอัตราร้อยละ 90 ตั้งแต่เวลา 30 นาที และสามารถทำลายเชื้อได้สมบูรณ์ภายในเวลา 2 ชั่วโมง (อัตราการทำลายเชื้อร้อยละ 100) ดังแสดงในรูปที่ 2

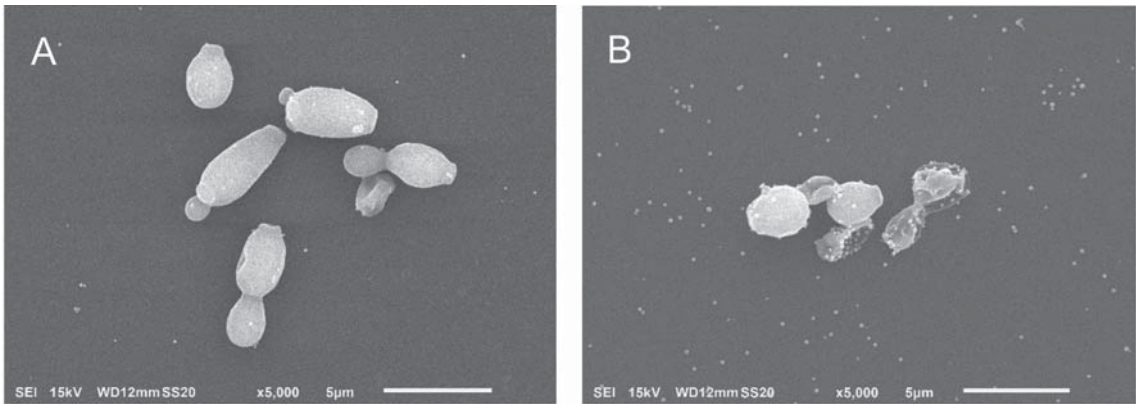


รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบระยะเวลาในการทำลายเชื้อ *C. albicans* จากฤทธิ์น้ำมันหอมระเหยกะเพรา (1.75 mg/ml) ซึ่งผลที่แสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ครั้ง

Fig 2. Time-kill assay of *C. albicans* exposed to *O. sanctum* essential oil (1.75 mg/ml) (data were demonstrated as mean ± SD of triplicate independent experiments).

3. การศึกษารูปร่างลักษณะเชื้อ *C. albicans* เมื่อทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยกะเพรา

เมื่อศึกษารูปร่างลักษณะเซลล์ของเชื้อ *C. albicans* ที่ทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยกะเพราโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 5,000 เท่า) พบว่าเซลล์มีลักษณะเหี่ยวและหดตัวเล็กลง ผิวเซลล์ย่น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ *C. albicans* กลุ่มควบคุมซึ่งเซลล์แสดงลักษณะรูปร่างรียาว ผิวเซลล์เรียบซึ่งเป็นลักษณะปกติ ดังแสดงในรูปที่ 3

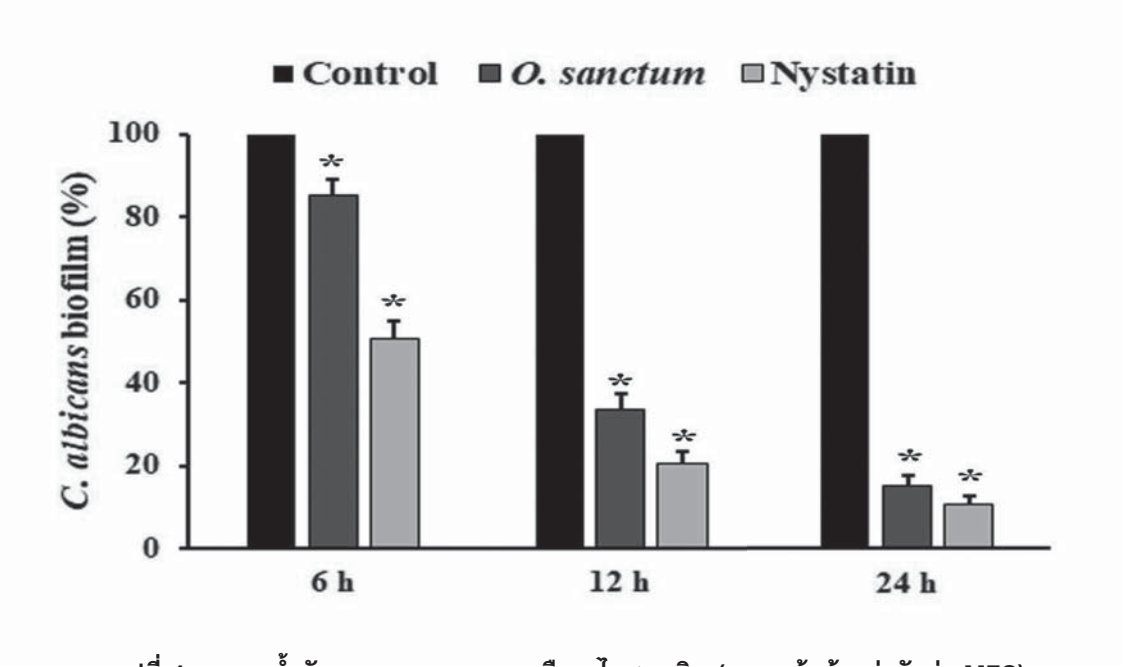


รูปที่ 3 การศึกษารูปร่างเซลล์ *C. albicans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (กำลังขยาย 5,000 เท่า) (A) รูปร่างเซลล์ *C. albicans* กลุ่มควบคุม และ (B) รูปร่างเซลล์ *C. albicans* ที่ถูกทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยกะเพรา (1.75 mg/ml)

Fig 3. Examination *C. albicans* morphology by using electron microscope (5,000X). (A) *C. albicans* control, (B) *C. albicans* treated with *O. sanctum* essential oil (1.75 mg/ml).

4. การศึกษาฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพรา

นอกจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* น้ำมันหอมระเหยกะเพราได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4 โดยเมื่อชักนำให้เชื้อ *C. albicans* สร้างมวลไบโอฟิล์มขึ้นมา ได้ถูกนำมาทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยกะเพราที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับค่า MFC ในการทำลายไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพราสามารถลดระดับไบโอฟิล์มเหลือร้อยละ 85 ($p < 0.05$) ในเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ระดับไบโอฟิล์มลดลงเหลือร้อยละ 33 ($p < 0.05$) และในเวลา 24 ชั่วโมง ระดับของไบโอฟิล์มลดลงเหลือเพียงร้อยละ 15 ($p < 0.05$) ในขณะที่ยาไนสแตตินสามารถลดระดับไบโอฟิล์มเหลือร้อยละ 50, 20 และ 10 ในเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4 ผลของน้ำมันหอมระเหยกะเพราหรือยาไนสแตติน (ความเข้มข้นเท่ากับค่า MFC) ต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ที่ระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง
***คือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กราฟสีดำ)**
Fig 4. The effects of *O. sanctum* essential oil or Nystatin (MFC concentration) on biofilm destruction in *C. albicans* at 6, 12 and 24 h.
***$p < 0.05$, statistical significant compared with the control (black bar).**

บทวิจารณ์ (Discussion)

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์จากน้ำมันหอมระเหยกะเพราจากส่วนของใบในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุในการก่อโรคเชื้อราในช่องปาก (oral candidiasis) โดยกะเพราเป็นพืชที่คนไทยนำมาเป็นส่วนประกอบในอาหารมาแต่ช้านานจึงถือว่ามีความปลอดภัยในระดับหนึ่งต่อมนุษย์ การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพราในส่วนของใบที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม มีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสยับยั้งเชื้อประมาณ 18 มิลลิเมตร ซึ่งถือว่าเชื้อมีระดับความไวมากต่อสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกะเพรา และมีค่าเฉลี่ย MIC และ MFC ต่อเชื้อ *C. albicans* ประมาณ 1.25 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศไทยของ Sodajan และคณะ 2015 (12) ได้ศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพราจากส่วนของใบมีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* โดยก่อให้เกิดวงใสยับยั้งเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 มิลลิเมตร ซึ่งมีค่า MIC และ MFC ประมาณ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะเดียวกันยังมีการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยเรื่องนี้ได้รายงานว่าสารสกัดจากกะเพราในส่วนของรากไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* แต่อย่างใด (13) ผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมุติฐานว่าสารสกัดจากกะเพราในส่วนของรากอาจมีองค์ประกอบทางเคมีที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ซึ่งอาจแตกต่างจากส่วนของใบกะเพรา ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพราจากส่วนของใบอาจมีศักยภาพต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ โดยระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยกะเพรา

จากส่วนของใบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *C. albicans* ถูกจัดอยู่ในเกณฑ์ระดับดีมาก (ความเข้มข้นต้องน้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Francisco 1998 (14)

น้ำมันหอมระเหยกะเพรานอกจากมีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans* แล้ว ยังสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกับยาต้านเชื้อราไนสแตติน โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.71 ซึ่งแสดงค่าการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) แม้ว่ายังไม่เคยมีรายงานการศึกษาการเสริมฤทธิ์การทำงานระหว่างน้ำมันหอมระเหยกะเพราร่วมกับยาไนสแตติน แต่พบว่ามีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่อาจช่วยสนับสนุนผลการศึกษาครั้งนี้ โดย Ahmad และคณะ 2010 ได้ศึกษาพบว่าสารกลุ่มยูจินอล (Eugenol) และเมททิลยูจินอล (Methyleugenol) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยกะเพรา สามารถเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกับยาต้านเชื้อราฟลูโคนาโซล (Fluconazole) ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. albicans, C. tropicalis และ C. glabrata* (15) โดยสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์สารโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโทรมิเตอร์ (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, GC-MS) พบว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพรามีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ ทราน-แคริโอฟิลีน (Trans-Caryophyllene) เมททิลยูจินอล (Methyleugenol) และยูจินอล (Eugenol) (Data not shown) แต่อย่างไรก็ตามในน้ำมันหอมระเหยกะเพรายังมีสารกลุ่มอื่นๆเป็นส่วนประกอบร่วมด้วย ดังนั้นหากทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยกะเพราให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยยังคงรักษาสารกลุ่มหลักที่มีความสำคัญไว้ อาจช่วยให้น้ำมันหอมระเหยกะเพรามีศักยภาพในการเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกับยาต้านเชื้อราได้ดียิ่งขึ้น

น้ำมันหอมระเหยกะเพราที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับระดับค่า MFC สามารถทำลายเชื้อ *C. albicans* ได้ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าแสดงการออกฤทธิ์ที่ค่อนข้างรวดเร็ว ในขณะที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. albicans* ที่ผ่านการทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยกะเพราแสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่แตกต่างจากเซลล์กลุ่มควบคุม เช่น เซลล์มีลักษณะเหี่ยว หดสั้นและมีขนาดเล็กลง ผิวเซลล์มีลักษณะย่นและขรุขระ เป็นต้น จากลักษณะดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยกะเพราที่อาจส่งผลให้เกิดสภาวะกดดันต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยรูปร่างลักษณะเช่นนี้มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ที่ตายในรูปแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Khan และคณะ 2014 ที่แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพรา (ระดับความเข้มข้น MIC ปกติ) สามารถชักนำให้เชื้อ *C. albicans* เกิดการตายในรูปแบบอะพอพโทซิสที่เกี่ยวข้องกับวิถีไมโตคอนเดรีย (Mitochondria pathway) โดยเซลล์มีลักษณะเหี่ยว หดตัวเล็กลง (Cell shrinkage) ผิวเซลล์ปูดพองเป็นถุงเล็ก ๆ (Membrane blebbing) และพบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) (16) จากความสามารถของน้ำมันหอมระเหยกะเพราในการชักนำให้เชื้อ *C. albicans* เกิดการตายโดยกระบวนการอะพอพโทซิส ซึ่งการตายลักษณะดังกล่าวจะง่ายต่อการกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์โดยจะไม่ส่งผลอันตรายหรือก่อให้เกิดการอักเสบในร่างกาย

เชื้อ *C. albicans* มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ปกคลุมกลุ่มเซลล์ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม (17) โครงสร้างของไบโอฟิล์มมีหน้าที่ที่สำคัญหลายประการ ได้แก่ การเข้ายึดเกาะกับพื้นผิวต่าง ๆ หรือการปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก (18) โดยการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ถือว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการก่อโรคต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อในช่องคลอด รวมถึงการติดเชื้อในช่องปาก (oral candidiasis) (19) จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยกะเพรามีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้นมาได้เช่นเดียวกับยาไนสแตติน โดยสามารถลดระดับไบโอฟิล์มเหลือประมาณร้อยละ 15 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง แม้ว่ายังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* จากน้ำมันหอมระเหยกะเพรา แต่พบว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งมีความใกล้เคียงกันได้แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มยูจินอล (Eugenol) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหยกะเพราสามารถทำลาย

ไบโอฟิล์มที่เกิดจากเชื้อ *Cryptococcus neoformans* และ *C. laurentii* โดยสามารถลดระดับไบโอฟิล์มให้เหลือประมาณร้อยละ 10 ที่ระดับความเข้มข้น 1.024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (20) ในขณะเดียวกันยังมีงานวิจัยอื่นที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกะเพรามีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เช่นงานวิจัยของ Loahaprapanon และคณะ 2018 ได้ศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากกะเพรา มีฤทธิ์ในการทำลายไบโอฟิล์มที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลิน (Methicillin resistant) (21) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับผลการศึกษาในครั้งนี้เช่นกัน

บทสรุป (Conclusion)

กะเพราเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีการบริโภคมาแต่อดีต จึงถือว่ามีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง โดยน้ำมันหอมระเหยกะเพราแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* รวมทั้งสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานร่วมกับยาไนสแตตินดังนั้นงานวิจัยเรื่องนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาต่อยอดในอนาคตเพื่อพัฒนาสารสกัดกลุ่มนี้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆสำหรับรักษาโรคติดเชื้อราแคนดิดาในช่องปาก เช่น การพัฒนาเป็นลูกอมฆ่าเชื้อราในช่องปาก หรือผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปาก เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาระดับความเป็นพิษ (Toxicity) และผลข้างเคียงอื่น ๆ ของน้ำมันหอมระเหยกะเพรายังคงต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมและปลอดภัยต่อผู้ใช้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข และกลุ่มงานบริการเครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการสนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Shepherd MG, Poulter RT, Sullivan PA. *Candida albicans:* biology, genetics, and pathogenicity. Annu Rev Microbiol. 1985;39:579-614.

2. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-28.

3. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr., Calandra TF, Edwards JE, Jr., et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(5):503-35.

4. Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med. 1984;311(6):354-8.

5. Garcia-Cuesta C, Sarrion-Perez MG, Bagan JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. J Clin Exp Dent. 2014;6(5): e576-82.

6. Hakkim FL, Shankar CG, Girija S. Chemical composition and antioxidant property of holy basil *(Ocimum sanctum L.)* leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. J Agric Food Chem. 2007;55(22):9109-17.

7. Pramod K. Raghav MS. Antimicrobial Properties of Tulsi *(Ocimum sanctum)* in Relation to Shelf Life Enhancement of Fruits & Vegetables. International Journal of Green and Herbal Chemistry. 2018;7(1):20-32.

8. Gavanji S, Zaker SR, Nejad ZG, Bakhtari A, Bidabadi ES, Larki B. Comparative efficacy of herbal essences with amphotricin B and ketoconazole on *Candida albicans* in the in vitro condition. Integr Med Res. 2015;4(2):112-8.

9. Ponce A.G. FR, C. del Valle, Roura S. I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Food Sci Technol. 2003;36(7):679-84.

10. Fratini F, Mancini S, Turchi B, Friscia E, Pistelli L, Giusti G, et al. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare L.* and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. Microbiol Res. 2017;195:11-7.

11. Melo AS, Bizerra FC, Freymuller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the Candida parapsilosis complex. Med Mycol. 2011;49(3):253-62.

12. Sodachan J, Sungthong B, Rattanakiat S. Chemical Profiling and Antimicrobial Activities against Oral Pathogens of *Ocimum* spp. Essentail Oils. IJPS. 2015;11(Suppl):304-10.

13. Kawsud P, Puripattanavong J, Teanpaisan R. Screening for Anticandidal and Antibiofilm Activity of Some Herbs in Thailand. Trop J Pharm Res. 2014;13(9):1495-501.

14. Sáez F. Variability in Essential Oils from Populations of Thymus hyemalis Lange in Southeastern Spain. J Herbs, Spices & Med Plants. 1998;5(4):65-76.

15. Ahmad A, Khan A, Khan LA, Manzoor N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical Candida isolates. J Med Microbiol. 2010;59(Pt 10):1178-84.

16. Khan A, Ahmad A, Khan LA, Manzoor N. *Ocimum sanctum* (L.) essential oil and its lead molecules induce apoptosis in *Candida albicans.* Res Microbiol. 2014;165(6):411-9.

17. Cavalheiro M, Teixeira MC. Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. Front Med (Lausanne). 2018;5:28.

18. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. Adv Exp Med Biol. 2016;931:21-35.

19. Nett JE. The Host's Reply to Candida Biofilm. Pathogens. 2016;5(1).

20. Kumari P, Mishra R, Arora N, Chatrath A, Gangwar R, Roy P, et al. Antifungal and Anti-Biofilm Activity of Essential Oil Active Components against Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus laurentii.* Front Microbiol. 2017;8:2161.

21. Loahaprapanon S YK, Nukong J, Chanwun T. An Investigation on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of a Traditional Thai Herbal Recipe (THR 01) against Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Staphylococcus epidermidis.* International Journal of Agricultural Technology. 2018;14(3):325-32.

ติดต่อบทความ
อ.ดร.วงศ์วรุตม์ บุญญานุโกมล
กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์และอักษรศาสตร์ และกลุ่มงานบริการเครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์
โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล
เลขที่ 259 หมู่ที่ 13 ตำบลโนนหนามแท่ง
อำเภอเมืองอำนาจเจริญ จังหวัดอำนาจเจริญ 37000
โทรศัพท์ 045-523211
จดหมายอิเล็กทรอนิกส์: Wongwarut.boo@mahidol.edu

Corresponding author
Dr. Wongwarut Boonyanugomol
Department of Sciences and Liberal Arts and Unit of Scientific Instruments and Equipments Services, Mahidol University, Amnat Charoen Campus, 259, No. 13, Non Nam Tang sub-district, Mueang district, Amnat Charoen, 37000, Thailand.
Tel: +66-45-523211
E-mail: Wongwarut.boo@mahidol.edu

Received Date: May 14, 2019
Revised Date: May 24, 2019
Accepted Date: Jun 19, 2019