การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืช เพื่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มในช่องปาก

STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANT ESSENTIAL OILS AGAINST THE GROWTH OF ORAL BIOFILM FORMING BACTERIA

จุฑาทิพย์ อ่อนนอก

ยลรวี รัตนวิชัย

สุจิตตรา เกิดแสง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANT ESSENTIAL OILS AGAINST THE GROWTH OF ORAL BIOFILM FORMING BACTERIA

JUTATIP ONNOK

YOLLAWEE RATTANAWICHAI

SUCHITTA KEADSANG

A SEMINAR SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชเพื่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มในช่องปาก
STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANT ESSENTIAL OILS AGAINST THE GROWTH OF ORAL BIOFILM FORMING BACTERIA

ชื่อนักศึกษา นางสาวจุฑาทิพย์ อ่อนนอก รหัสนักศึกษา 56050814
นางสาวยลรวี รัตนวิชัย รหัสนักศึกษา 56050891
นางสาวสุจิตตรา เกิดแสง รหัสนักศึกษา 56050933

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา วิชาชีววิทยา

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	
ดร. วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชเพื่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มในช่องปาก
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจุฑาทิพย์ อ่อนนอก รหัสนักศึกษา 56050814
	นางสาวยลรวี รัตนวิชัย รหัสนักศึกษา 56050891
	นางสาวสุจิตตรา เกิดแสง รหัสนักศึกษา 56050933
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	วิชาชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

ฟันผุเป็นโรคในช่องปากที่พบได้บ่อยทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ โดยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดฟันผุ คือ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci โดยเฉพาะเชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ดังนั้นปัจจุบันการผลิตผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากจึงให้ความสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มดังกล่าว โดยสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะ เมื่อใช้เป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดการดื้อยา ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความปลอดภัย ไม่มีผลข้างเคียง มีประสิทธิภาพดี และราคาถูก เพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมี ผลจากการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าน้ำมันตะไคร้ น้ำมันชาออสเตรเลีย และน้ำมันโป๊ยกั๊ก มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และยีสต์ ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันตะไคร้ น้ำมันชาออสเตรเลีย และน้ำมันโป๊ยกั๊กเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ด้วยวิธี broth dilution และศึกษาระยะเวลาที่น้ำหอมระเหยสามารถฆ่าเชื้อได้ด้วยวิธี time-kill assay ผลจากการทดลองพบว่าน้ำมันตะไคร้มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. sobrinus* และ *S. mutans* ด้วยค่า MICs เท่ากับ 0.4688 µg/ml และ 0.9375 µg/ml ตามลำดับ สำหรับการศึกษาระยะเวลาที่น้ำมันหอมระเหยสามารถฆ่าเชื้อได้ด้วยวิธี time-kill assay พบว่าจำนวนของเชื้อ *S. sobrinus* ลดลงคิดเป็น 11.69% หลังจากทดสอบด้วยน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.9375 µg/ml เป็นเวลา 10 นาที ในขณะที่จำนวนของเชื้อ *S. mutans* ลดลงคิดเป็น 12.08% หลังจากทดสอบด้วยน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 3.75 µg/ml เป็นเวลา 10 นาที จึงสามารถสรุปได้ว่าน้ำมันตะไคร้มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ และเหมาะสำหรับการศึกษาต่อยอดเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการดูแลช่องปากต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANT ESSENTIAL OILS AGAINST THE GROWTH OF ORAL BIOFILM FORMING BACTERIA
Student	Miss. Jutatip Onnok ID 56050814
	Miss. Yollawee Rattanawichai ID 56050891
	Miss. Suchitta Keadsang ID 56050933
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Factory	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr.Karn Wongsariya

Abstract

Dental caries are the oral diseases that are usually found both in kid and adult. The most incidence of tooth decay is normally associated with the group of streptococci bacteria, especially *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Therefore, the production of oral care products has focused on antibacterial activity against the growth of the both strains. Antibacterial agents in oral care products normally are antiseptic or antibiotics, however long term use of antibiotics may promote the resistant property of oral bacteria. For the reason, it is ;necessary for searching the bio-active compounds that are safe, no side effect and cost effective in order to reduce chemical use. According to results of the previous studies demonstrated that essential oils of lemongrass, tea tree oil, and star anise oil can inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast, and mold. The aim of this study is to study the efficacy of lemongrass oil, tea tree oil, and star anise oil for inhibiting the growth of oral-biofilm producing bacteria by broth dilution method and time-kill assay. From the results found that the best antibacterial activity was obtained from lemongrass oil with MICs at concentrations of 0.4688 µg/ml and 0.9375 µg/ml after tested with *S. sobrinus* and *S. mutans*, respectively. For time-kill assay, the number of *S. sobrinus* was reduced by 11.69% after treated with essential oils of lemongrass at concentration of 0.9375 µg/ml for 10 min. While the number of *S. mutans* was reduced by 12.08% after treated with lemongrass oil at concentration of 3.75 µg/ml for 10 min. It can be concluded that lemongrass oil has the strongest antibacterial activity and suitable for further study in order to develop as the oral care product.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขจนรูปเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จไปด้วยดี ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล และ ดร. วิภาวี เดชติศักดิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นกรรมการสอบการโครงงานพิเศษ รวมถึงตรวจแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์และบุคลากรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ได้ให้คำแนะนำ และสั่งสอนให้ความรู้ในด้านต่างๆ ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์ต่างๆ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ จนสำเร็จลุล่วงและเพื่อนๆ ที่คอยสนับสนุน แนะนำ และเป็นกำลังใจจนทำให้สำเร็จการศึกษาไปด้วยดี

จุฑาทิพย์ อ่อนนอก
ยลรวี รัตนวิชัย
สุจิตตรา เกิดแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ 3
2.2 กลไลการเกิดฟันผุ 4
2.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพร 6
2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 9
2.5 การทดสอบระยะเวลาในการฆ่าเชื้อแบบ Time killing assay 10
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 13
3.2 การหาสัดส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสม 14
3.3 การศึกษากราฟการเจริญของเชื้อ (Growth curve) 15
3.4 การทดสอบความไวของนามันหอมระเหยต่อเชื้อ 16
3.5 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของนามันหอมระเหย 17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ 18
4.2 ผลการหาสัดส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสม 19
4.3 ผลการศึกษากราฟการเจริญของเชื้อ 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

4.4 การทดสอบความไวของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ 23
4.5 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของน้ำมันหอมระเหย 26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการวิจัย 29
5.2 ข้อเสนอแนะ 29
เอกสารอ้างอิง 30
ภาคผนวก 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 4.1 การหาสัดส่วนของตัวทำละลาย (Tween20) ในการละลายน้ำมันหอมระเหย 19
ตารางที่ 4.2 การหาสัดส่วนของตัวทำละลาย (Tween80) ในการละลายน้ำมันหอมระเหย 20
ตารางที่ 4.3 การเพิ่มจานวนของเชื้อ *S. mutans* 21
ตารางที่ 4.4 การเพิ่มจานวนของเชื้อ *S. sobrinus* 22
ตารางที่ 4.5 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหย 23
ต่อเชื้อ *S. mutans*
ตารางที่ 4.6 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ามันหอมระเหย 23
ต่อเชื้อ *S. sobrinus*
ตารางที่ 4.7 Minimal bactericidal Concentration (MBC) ของน้ามันหอมระเหย 25
ต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 2.1 *Streptococcus mutans* 3
รูปที่ 2.2 *Streptococcus sobrinus* 4
รูปที่ 2.3 ตะไคร้ *(Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) 6
รูปที่ 2.4 โป๊ยกั๊ก (*Illicium verum* Hook. f.) 7
รูปที่ 2.5 ชาออสเตรเลีย *(Melaleuca Alternifolia)* 8
รูปที่ 3.1 แสดงตัวอย่างการเจือจางเชื้อ 15
รูปที่ 3.2 แสดงตัวอย่างการหยดเชื้อลงบนเพลตที่มีอาหาร BHI agar 16
รูปที่ 4.1 ลักษณะของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ที่เจริญบนอาหาร BHI 18
รูปที่ 4.2 ลักษณะของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 18
รูปที่ 4.3 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* 21
รูปที่ 4.4 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. sobrinus* 22
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ของน้ำมันตะไคร้ 26
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. sobrinus* ของน้ำมันตะไคร้ 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
BHI	Brain heart infusion
S. mutans	*Streptococcus mutans*
S. sobrinus	*Streptococcus sobrinus*
µg	ไมโครกรัม
µm	ไมโครเมตร
µl	ไมโครลิตร
mL	มิลลิลิตร
mg	มิลลิกรัม
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MBC	Minimal Bactericidal Concentration

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฟันผุ มีสาเหตุมาจากกรดที่ผลิตจากการหมักน้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส ของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ซึ่งกรดดังกล่าวจะทำลายผิวฟัน ปัจจุบันมีแบคทีเรียกว่า 700 สายพันธุ์ในช่องปาก และพบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดฟันผุคือเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci ได้แก่ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ด้วยเหตุนี้จึงต้องหาวิธีการในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อลดการเกิดกลิ่นปาก ฟันผุ และโรคปริทันต์ ซึ่งในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการดูแลรักษาสุขภาพของช่องปาก โดยส่วนมากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการผสมสารเคมี และยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในช่องปาก เมื่อใช้เป็นเวลานาน อาจก่อเกิดการดื้อยา ส่งผลข้างเคียงต่างๆ เช่น อาเจียน ท้องเสีย และรวมถึงส่งผลทำลายสภาวะสมดุลของจุลินทรีย์ในช่องปาก เนื่องจากสารเคมี และยาปฏิชีวนะที่ผสมในผลิตภัณฑ์จะทำลายจุลินทรีย์ที่ดีในช่องปากไปด้วย เช่น ฟลูออไรด์ ซึ่งเป็นที่นิยมและนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย มีการวิจัยพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียในช่องปากได้อย่างดี แต่มีข้อเสียคือฟลูออไรด์จะออกฤทธิ์อย่างช้าๆ ทำให้แร่ธาตุในฟันลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุให้แคลเซียมและฟอสเฟตสูญเสียไปจากชั้นอีนาเมลของฟัน และสารที่นิยมใช้อีกชนิดหนึ่งคือ คลอเฮกซิดีน ที่นิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาบ้วนปาก เป็นสารที่ออกฤทธิ์เร็ว และกว้าง แต่พบว่าสามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียง คือ ทำให้ลิ้น และฟันมีสีผิดปกติ ลิ้นไหม้ และปากลอกได้ จึงมีความจำเป็นต้องหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความปลอดภัย ไร้ผลข้างเคียง มีประสิทธิภาพดี และราคาถูก เพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมีสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปาก (ศิริลักษณ์, 2557, Choi, et al.,2015)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง และสารนั้นจะต้องไม่ส่งผลเสียต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก ซึ่งน้ำมันหอมระเหยเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารจากธรรมชาติที่แยกได้จากพืชในการป้องกันโรคฟันผุ เป็นทางเลือกที่ดีแทนการใช้ยาหรือใช้สารสังเคราะห์จากกระบวนการผลิตทางเคมี (ปัทมา, 2008, Prabu, et al., 2006)

ด้วยเหตุนี้การศึกษานี้จึงให้ความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญ และระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* จากน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* จากน้ำมันหอมระเหย

1.2.2 เพื่อศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* จากน้ำมันหอมระเหย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ด้วยวิธี broth dilution method และศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* จากน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี time kill assay

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงชนิดของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

1.4.2 ทราบถึงระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* จากน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

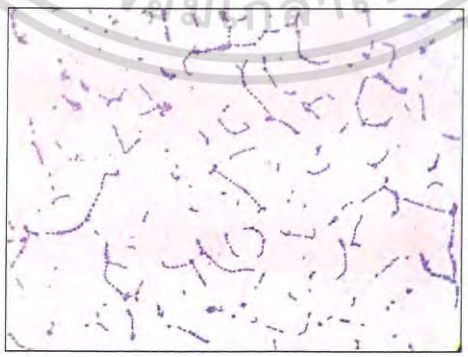
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ

ปัจจุบันพบว่ามีแบคทีเรียกว่า 700 สายพันธุ์ในช่องปากของมนุษย์ โรคฟันผุเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* เนื่องจากเชื้อดังกล่าวสามารถสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) ได้จากการใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของไบโอฟิล์มที่เกาะอยู่บริเวณผิวฟัน และเชื้อดังกล่าวยังสามารถสร้างกรดจากการใช้น้ำตาล โดยกรดที่เชื้อสร้างขึ้นจะไปสลายผิวฟันทำให้เกิดฟันผุต่อมา (ศิริลักษณ์, 2557)

Streptococcus mutans เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมมีขนาดประมาณ 0.5-0.75 μm ต่อเป็นเส้นสาย สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ หรือมีก๊าซไนโตรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นหลัก แต่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส และต่ำสุด 10 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีคือ 37 องศาเซลเซียส (Sneath, et al., 1986)

เนื่องจาก *S. mutans* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนกรดและผลิตกรดได้ โดยเมื่อมนุษย์รับประทานน้ำตาลเข้าไป โดยเฉพาะน้ำตาลทราย หรือน้ำตาลซูโครส เชื้อจะนำน้ำตาลที่ได้ไปหมัก กลายเป็นกรดแลคติก และทำให้สภาวะในช่องปากเป็นกรด กรดที่เกิดขึ้นจะทำให้แร่ธาตุที่อยู่ในฟันเกิดการละลายตัว และกรดที่เชื้อสร้างขึ้นในช่องปากจะไปสลายผิวฟันเป็นผลให้เกิดฟันผุ (Loesche, 1986)

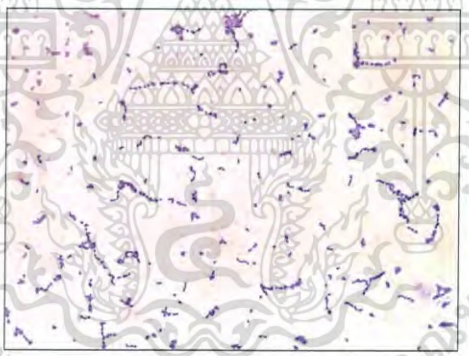


รูปที่ 2.1 *Streptococcus mutans*
(รูปจากใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Streptococcus sobrinus มีลักษณะทั่วไปเป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่เคลื่อนที่ (nonmotile) มีรูปร่างรีต่อเป็นเส้นสาย (spherical shape) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศหรือมีก๊าซไนโตรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นหลัก แต่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส และต่ำสุด 10 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีคือ 37 องศาเซลเซียส (Sneath, et al., 1986)

เชื้อ *S. sobrinus* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเชื้อ *S. mutans* เชื้อทั้งสองสามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (phenotypic) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใกล้เคียงกัน ในการทดลองแบบ in vitro ศึกษาความสามารถในการผลิตกรด (cariogenicity) และค่าความเป็นกรด (acidogenenic) ของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ โดยทดลองด้วย pH stat system ที่ควบคุม pH ให้อยู่ในช่วง 5.6-5 พบว่า เชื้อ *S. sobrinus* สามารถผลิตกรดได้มากกว่า *S. mutans* และยังสามารถผลิตกรดที่มีค่า pH ต่ำกว่าที่ *S. mutans* สามารถผลิตได้ และ*S. sobrinus* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียหลักตัวใหม่ที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุซึ่งจะมีนัยสำคัญในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ (de Soet, et al., 1991, เข็มทอง, 2559)



รูปที่ 2.2 *Streptococcus sobrinus*
(รูปจากใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า)

2.2 กลไกการเกิดฟันผุ

ฟันผุมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียที่มีอยู่ในช่องปากซึ่งมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน จากการที่เชื้อเหล่านี้มีความสามารถผลิตกรด เชื้อในกลุ่ม *streptococci* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติดังกล่าว และเชื่อว่าเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดฟันผุจะเห็นได้จากการทดลองของ Orland ซึ่งได้เอาเชื้อ *streptococci* ที่คัดแยกได้ในช่องปากของคนไปใส่ในปากหนูที่ไม่มีเชื้อ ปรากฏว่าสัตว์ทดลองเหล่านั้นมีฟันผุเกิดขึ้น โดยเฉพาะ *S. mutans* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเฉพาะ และคุณสมบัติเด่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางอย่างที่ไม่พบในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งในปัจจุบันเมื่อกล่าวถึงสาเหตุของฟันผุคนส่วนมากจะนึกถึง *S. mutans* แบคทีเรียสายพันธุ์นี้จึงถูกนำมาทดลอง *S. mutans* ทำให้เกิดฟันผุได้จากความสามารถยึดเกาะบนผิวหน้าฟันที่เรียบ กล่าวคือในขั้นแรกเกิดจากการยึดเกาะกันระหว่างสาร glucoprotein ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในน้ำลาย และกระจายอยู่ในแผ่นคราบฟัน (Acquired pellicle) glucoprotein จะไปจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ของ *S. mutans* ขั้นที่ 2 เกิดจากการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์ต่อเซลล์โดยมีสาร glucan เป็นสื่อช่วยในการยึดเกาะ glucan เป็นสารที่เกิดขึ้นเนื่องจากการรวมตัวกันของน้ำตาลกลูโคสหลายๆ โมเลกุล และมีคุณสมบัติเป็นเมือกเหนียวๆ ไม่ละลายน้ำ และที่บริเวณผนังของเซลล์ของ *S. mutans* จะมีที่สำหรับให้ glucan ยึดเกาะ (glucan receptor) นอกจากนี้ยังมีสารอย่างอื่นอีกที่ช่วยในการยึดเกาะ เช่น glucosyltransferase (GTF) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์ glucan ดังสมการ

$$n\ \text{Sucrose} \xrightarrow{\text{glucosyltransferase}} \underbrace{(\text{glucose})n}_{\text{glucan}} + n\ \text{fructose}$$

ในขั้นตอนนี้จะทำให้มีจำนวนแบคทีเรียมาสะสมกันอยู่จำนวนมาก และทับทมกันมากจนกลายเป็นแผ่นคราบแบคทีเรียที่หนาแน่น เมื่อตรวจแผ่นคราบแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนตัวฟันที่มีรอยผุจะพบเชื้อ *S. mutans* เป็นจำนวนมาก และในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสอยู่ด้วยจะพบว่ามีจำนวนเชื้อนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว *S. mutans* สามารถนำน้ำตาลซูโครสไปใช้สร้างสาร extraellular polysaccharide หรือ glucan ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียยึดเกาะกันได้ดี นอกจากนี้ยังมี fructan ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ จะแตกตัวออกเป็นโมเลกุลเล็กๆ และถูกแบคทีเรียนำไปใช้เป็นสารอาหารได้ และนอกจากนี้เชื้อ *S. mutans* สามารถนำน้ำตาลซูโครสไปใช้ได้อีกทางหนึ่ง คือเมื่อซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปแล้วจะถูกนำไปเผาผลาญให้กลายเป็นพลังงาน ซึ่งจะได้ผลผลิตออกมาเป็นกรด กรดที่ได้มีหลายชนิดด้วยกันทั้งนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อม กล่าวคือถ้ามีกลูโคสมากเกินพอผลผลิตที่ได้คือ กรดแลคติค ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก แต่ถ้ามีกลูโคสจำนวนจำกัด ผลิตผลที่ได้คือ กรดฟอร์มิค กรดอะซิติค และเอทานอล กรดแลคติคที่ผลิตออกมาได้นี้จะมีความรุนแรงมากกว่ากรดอะซิติด ในระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยกรดที่เชื้อสร้างขึ้นจะไปสลายแร่ธาตุซึ่งเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อฟัน ฟอสฟอรัสที่ละลายออกมากก็จะถูกนำไปใช้ในขบวนการ phosphorylation ซึ่งจะกระตุ้นกระบวนการการสร้างกรดของเชื้อ จนเนื้อเยื่อฟันถูกทำลายกลายเป็นแผลที่กว้างขึ้น ซึ่งเรียกอาการนี้ว่า ฟันผุ (กรณิศ และชัชวาล, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพร

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น ซึ่งจะมีต่อมหรือท่อที่สร้างและกักเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ที่ต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด ประกอบด้วย องค์ประกอบทางเคมีกว่าร้อยชนิด สามารถนำมาสกัดเป็นน้ำมันที่ได้จากพืชโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (Stream distillation) หรือการบีบ (expression) มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสีหรือมีสีอ่อนๆ ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิปกติ เมื่อได้รับความร้อนจะระเหยได้ดียิ่งขึ้น มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในพืชสมุนไพรแต่ละชนิด (นิจศิริ และพะยอม, 2534)

1. ตะไคร้

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf

ชื่อสามัญ : Lemon Grass, Lapine และ West Indian lemongrass

ชื่อวงศ์ : Poaceae (Gramineae)

รูปที่ 2.4 ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) stapf)

ที่มา : http://spirithorseherbals.com/2016/11/16/herb-spotlight-lemon-grass-cymbopogon-citratus/ (สืบค้นวันที่ 10/1/2017)

องค์ประกอบหลักน้ำมันตะไคร้ คือ alpha-citral (33.3%) และ beta-citral (39.0%) และ Myrcene (15.6%) การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจากน้ำมันตะไคร้พบว่าน้ำมันตะไคร้สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ และเชื้อรา โดยมีความสามารถในการต้านเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ (Tofiño-Riveraa, et al., 2016, Vazirian et al., 2012, Naik, et al., 2010) น้ำมันตะไคร้ไม่ออกฤทธิ์เป็นยากดประสาทหรือกล่อมประสาท นอกจากนี้น้ำมันตะไคร้ยังจัดว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีความสามารถในการช่วยปกป้องเยื่อบุกระเพาะอาหาร ต้านการอักเสบโดยลดภาวะเครียดที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชัน ช่วยปกป้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งจะเกิดความเสียหายจากการใช้ *N*-methyl-*N*-nitrosurea (MNU) และน้ำมันตะไคร้ยังยับยั้งการทำงานของ 7,12-dimethylbenz(a)antracene 1,2-dimethylhydrazine และ N-butyl-N-(4-hydroxibuthyl) nitrosamine ซึ่งใช้ทดลองเป็นสารก่อมะเร็งเต้านมในหนูตัวเมียสายพันธุ์ Balb/C (Bidinotto et al. 2010) และเมื่อทดลองใช้กับหนูเพศผู้สายพันธุ์ Swiss โดยให้น้ำมันตะไคร้ปริมาณ 1 10 และ 100 mg/kg b.w เท่ากันเป็นเวลา 21 วัน พบว่าน้ำมันตะไคร้ไม่แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง และต่อยีนแต่กลับพบว่าช่วยให้คอเลสเตอรอลในเลือดลดลง (Costa, *et al.*, 2011)

2. โป๊ยกั๊ก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Illicium verum* Hook.f.

ชื่อสามัญ : Chinese star anise, Star anise, Star aniseed

ชื่อวงศ์ : Illiciaceae

รูปที่ 2.4 โป๊ยกั๊ก (*Illicium verum* Hook.f.)

ที่มา : http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=87 (สืบค้นวันที่ 10/1/2017)

องค์ประกอบหลักน้ำมันโป๊ยกั๊ก คือ Trans-anethole (75.76%) และมีองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ P-anisaldehyde (8.65%) Estragole (4.70%) Farnesol (3.26%) Linalool (1.44%) Limonene (1.01%) และ 4'-methoxypropiophenone (0.72%) (Zhanag, et al.,2015) Anthole มีคุณสมบัติเป็นตัวขัดขวางการจับตัวกันของเกล็ดเลือด (antithrombotic) และคลายกล้ามเนื้อเรียบ (antispasmodic) (Ahmad และ Youssef, 2015) สารสกัดอะนีทอลที่ได้จากโป๊ยกั๊กและอะนีทอลมาตรฐาน เมื่อนำมาทดสอบพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ เชื้อรา และยีสต์ (De, et al., 2002) และยังพบว่าน้ำมันโป๊ยกั๊กที่ทำการสกัดด้วยเอทานอล และethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Yang, et al., 2012) นอกจากนี้น้ำมันโป๊ยกั๊กที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และฆ่าเชื้อราในกลุ่ม dermatophyte ได้แก่ *Microsporum canis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

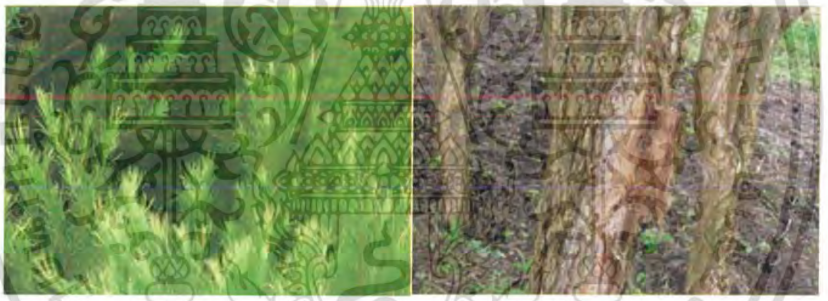
Epidermophyton fluccosum และ*Trichophyton mentagrophyte* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกลากและกลุ่มราที่ดำรงชีวิตแบบ saprophytes ได้แก่ *Aspergillus niger* และ*Candida albicans* โดยพบว่าน้ำมันโป๊ยกั๊กมีประสิทธิภาพดีสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. fluccosum* โดยใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 4 mg/ml (Yazdani, et al., 2008) เมื่อนำ Trans-anethole มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบกับน้ำมันโป๊ยกั๊กพบว่าทั้งสองมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ไม่ต่างกัน จึงสามารถกล่าวได้ว่า Trans-anethole เป็นสารสำคัญที่ส่งผลให้โป๊ยกั๊กมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา(Huang, et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานถึงอาการอาหารเป็นพิษหลังจากการบริโภคโป๊ยกั๊ก (*Illicium verum* Hook.f.) เนื่องจากการปนเปื้อนของ Anisatin และสารในกลุ่ม Sesquiterpene lactones ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ที่เป็นพิษ (Fritz, et al., 2008)

3. ชาออสเตรเลีย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Melaleuca alternifolia*

ชื่อสามัญ : tea tree

ชื่อวงศ์ : Myrtaceae



รูปที่ 2.6 ชาออสเตรเลีย (*Melaleuca alternifolia*)

ที่มา : http://www.ku.ac.th/e-magazine/july51/agri/tea.htm

(สืบค้นวันที่ 10/1/2017)

องค์ประกอบหลักของน้ำมันชาออสเตรเลีย คือ Terpinen-4-ol (40.1%) γ-Terpinene (23.0%) และ α-Terpinene (10.4%) (Carson , et al.,2006) โดยองค์ประกอบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพคือ Terpinen-4-ol และ α-Terpinene (Raman, et al.,1995) การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231 ของน้ำมันชาออสเตรเลีย และองค์ประกอบของน้ำมันชาออสเตรเลียด้วยวิธี microdilution และ macrodilution พบว่าน้ำมันชาออสเตรเลียมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.5%(v/v) สำหรับวิธี microdilution และ 0.25%(v/v) สำหรับวิธี macrodilution โดยองค์ประกอบที่ให้ ค่า MIC และ MBC ≤ 0.25%(v/v) คือ terpinen-4-ol, α-terpineol, linalool, α -pinene และ β-pinene และองค์ประกอบอื่นๆในน้ำมันชาออสเตรเลียมีค่า MIC และMBC อยู่ในช่วง 0.5-2%(v/v) ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

γ –Terpinene α –Terpinene Terpinolene 1,8-Cineole p-Cymene Aromadendrene Limonene และ a-Phellandrene ยกเว้น β-Myrcene ที่ต้องใช้ความเข้มข้น >2%(v/v) จึงถือว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* (Hammer, et al., 2003)

Terpinen-4-ol และน้ำมันชาออสเตรเลียมีคุณสมบัติในการยั้บยังการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในมนุษย์ซึ่งเป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เมลาโนซัยต์ซึ่งพบมากในผิวหนังได้ และ Terpinen-4-ol ยังมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และcoagulase-negative staphylococci (CoNS) ได้ดีกว่าน้ำมันชาออสเตรเลีย อย่างไรก็ตาม Terpinen-4-ol และน้ำมันชาออสเตรเลียมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Calcabrini, et al.,2004, Loughlin, et al., 2007) น้ำมันชาออสเตรเลียที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบ (Alcohol bases essential oils) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus Listeria monocytogenes Corynebacterium* spp. Enterococci Streptococci และ Staphylococci และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli Pasteurella multocida Stenotrophomonas maltophilia* และ *Acinetobacter baumanii* เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันชาออสเตรเลียกับน้ำมันลาเวนเดอร์ และน้ำมันพามาโรซ่า พบว่าน้ำมันชาออสเตรเลียสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าน้ำมันลาเวนเดอร์ และน้ำมันพามาโรซ่า โดยมีค่า MIC เฉลี่ย ≤1.25%(v/v) แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ และสำหรับแบคทีเรียกลุ่ม Streptococci น้ำมันชาออสเตรเลียให้ค่า MIC เฉลี่ย 0.56 %(v/v) (Mayaud, et al.,2008)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

The national committee for clinical laboratory standards (NCCLS) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเป็นวิธีมาตรฐานไว้ โดยมีขั้นตอนที่ชัดเจนตามชนิดของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบ อุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่มเพาะเชื้อ ตลอดจนการอ่าน และแปรผล ดังนั้นต้องปฏิบัติการตามแบบแผนอย่างถูกต้องทุกขั้นตอน จึงทำให้ผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพเชื่อถือได้ ทำให้การอ่าน และแปรผลถูกต้อง (ประสาทพร, 2551)

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์แบบ Broth dilution test เป็นการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่มีหลักการทั่วไป คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารสกัดจากพืช ในปริมาณต่างๆ กัน และสังเกตผลจากการเจริญเติบโตของเชื้อ การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสารสกัดที่ทำการทดสอบ วิธีการทำ broth dilution test แบ่งเป็น 2 วิธี คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Broth macrodilution test จะทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัดจากพืช Stock dilution ด้วยตัวเจือจางหรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอดทดลองเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดด้วย เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ตรงตามความเข้มข้นที่ระบุอยู่ในข้อกำหนด โดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer ที่ OD เท่ากับ 0.1 ความยาวคลื่น 540 nm และเจือจางเพื่อให้ได้ความขุ่นของเชื้อตามต้องการ (ประสาทพร, 2551)

2. Broth microdilution test ทำการทดลองใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง Stock solution ด้วย broth แบบ 2-fold serial dilution มีหลุดควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารสกัดจากพืช แต่ละหลุดจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตรจากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะอ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่าหรือสารเคมี ได้แก่ tetrazolium red, thiazolyl blue และ p-Iodonitrotetrazolium violet (INT) เป็นสารที่บ่งชี้การเจริญของเชื้อได้ (ประสาทพร, 2551)

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ ไมโครกรัม (µg) ต่อมิลลิลิตร (ml) หรือหน่วยสากล (IU, International unit) ต่อมิลลิลิตร ค่า MIC นี้สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อสารต้านจุลชีพหลายๆ ชนิดหรือความไวของเชื้อหลายๆชนิดต่อสารหนึ่งๆ และรวมทั้งเพื่อประเมินสารต้านจุลชีพหรือแปลผลของสารต่อเชื้อ (ประสาทพร, 2551)

Minimal Bacterialcidal Concentration (MBC) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยกล่าวได้ว่าเป็นการนำหลอดทดลองจากการหาค่า MIC ที่ใช้ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพต่ำที่สุด ที่ไม่สามารถสังเกตเห็นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง หากหลอดทดลองใดที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่มีเชื้อเจริญแสดงว่านั่นคือ MBC (ประสาทพร, 2551)

2.5 การทดสอบระยะเวลาในการฆ่าเชื้อแบบ Time killing assay

เป็นวิธีการทางจุลชีววิทยาขั้นพื้นฐานที่ใช้ในการประเมินฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพหรือสารฆ่าเชื้อในยาปฏิชีวนะ เป็นการทดสอบเวลาที่สามารถลดปริมาณของจุลินทรีย์ด้วยสารที่ต้องการทดสอบ โดยการทำ Time-kill assay จะแสดงผลออกมาในรูปของ time-kill curve โดยใช้กราฟ semi log ที่มีแกน x คือระยะเวลา แกน y คือ จำนวน viable cells count (CFU/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฤทธิ์การยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* จากสารสกัดใบกระทุ ทำการศึกษาโดยทดลองสกัดใบกระทุโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน 2 ชนิดคือเอทานอล และอะซิโตน พบว่าสารสกัดที่ได้จากเอทานอลมีค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 32 ถึง 1024 µg/ml ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากอะซิโตนมีค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 16 ถึง 256 µg/ml และระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดใบกระทุที่ได้จากเอทานอลและอะซิโตนพบว่าความเข้มข้น 4XMIC สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ไม่น้อยกว่า 90% (ศิริลักษณ์,2557)

จากการศึกษาน้ำมันตะไคร้ และน้ำมันตะไคร้หอมในการยับยั้งเชื้อการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus Streptococcus agalactiae* และ *Escherichia coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในโคนมด้วยวิธี broth dilution method ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันตะไคร้มีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* และ *St. agalactiae* ได้ดีกว่า *E. coli* โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 3.125 3.125 และ 12.5 µg/ml และค่า MBC เท่ากับ 6.25 25.0 และ 25.0 µg/ml ตามลำดับ และพบว่าน้ำมันตะไคร้หอมพบว่าสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *St. agalactiae* และ *E. coli* ตามลำดับ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.5625 3.125 และ 6.25 µg/ml และมีค่า MBC เท่ากับ 6.25 6.25 และ 25 µg/ml ตามลำดับ (อัจฉรัตน์ และคณะ, 2557)

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร 10 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยหนึ่งในสมุนไพรที่นำมาศึกษานั้นคือโป๊ยกั๊ก ซึ่งสกัดโดยใช้ 95% เอทานอล ซึ่งในการศึกษาฤทธิ์ของการยับยั้งโดยใช้วิธี agar well diffusion พบว่าโป๊ยกั๊กมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบได้ โดยมีค่า MIC และ MBC ของโป๊ยกั๊กต่อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็น 8 และ 16 mg/ml ค่า MIC และ MBC ของโป๊ยกั๊กต่อ *Bacillus cereus* คือ 8 และ 8 mg/ml และต่อ *E. coli* ATCC 25922 มีค่า MIC และ MBC เป็น 4 และ 4 mg/ml (วัชรินทร์ และคณะ, 2557)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่างๆในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่าง หนึ่งในเชื้อที่ศึกษาคือ *S. sobrinus* และผลการศึกษาพบว่ามีพืช 4 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. sobrinus* ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 500 µl/mL คือ Sacaca (*Croton cajucara* Benth) สนซีกิ (*Cryptomeria japonica* (sugi)) กานพลู (*Eugenia caryophyl lata* L.) และโรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis* L.) เมื่อนำน้ำมันที่สกัดได้จากใบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sacaca น้ำมันที่สกัดได้จากส่วนลำต้นเหนือดินของสนซีกิ น้ำมันที่สกัดได้จากดอกกานพลู และน้ำมันที่สกัดได้จากใบโรสแมรี่ ให้ค่า MIC เท่ากับ 13.8 100 200 และ500 µl/mL ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด และนำองค์ประกอบนั้นมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียพบว่า Sabanene, Terpinen-4-ol , α-Pinene และ α-Terpineol ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันสนซีกิ เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 27607 มีค่า MIC เท่ากับ 200 1600 6400 และ 1600 µl/mL ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ 200 3200 12800 และ 1600 µl/mL ตามลำดับ ในขณะที่ Eugenol และβ-Caryophyllene ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำมันกานพลูสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 27607 ได้ที่ความเข้มข้น 200 และ12800 µl/mL และมีค่า MBC เท่ากับ 400 และ12800 µl/mL สำหรับ Camphor Verbenone α-Pinene β-Caryophyllene และ β-Myrcene ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำมันโรสแมรี่เมื่อนำมาทดสอบกับ *S. sobrinus* ATCC 33478 พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 1500 1000 1000 400 และ 1500 µl/mL ตามลำดับ

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบกับ *S. mutans* พบว่าน้ำมัน sacaca ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 40.1 และ 13.8 µl/mL ตามลำดับ น้ำมันสนซีกิให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 100 และ 200 µl/mL ตามลำดับ น้ำมันกานพลูทดสอบกับ *S. mutans* ATCC 25175 ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 200 และ 800 µl/mL ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับ *S. mutans* ATCC 5175 มีค่า MIC เท่ากับ 600 µl/mL และเมื่อนำน้ำมันโรสแมรี่มาทดสอบพบว่ามีค่า MIC มากกว่า 2000 µl/mL ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจาก Sacaca มีประสิทธิภาพในการยั้ง และฆ่า *S. sobrinus* และ*S. mutans* ที่สุดตามด้วย น้ำมันสนซีกิ น้ำมันกานพลู และน้ำมันโรสแมรี่ตามลำดับ (Freires และคณะ, 2015)

จากการศึกษาน้ำมันหอมระเหยสองชนิดคือ กานูกา (*Kunzea ericoides* ,kanuka) และเมนูกา (*Leptospermum scoparium* ,manuka) ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศนิวซีแลนด์ ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อของน้ำมันทั้ง 2 ชนิดด้วยวิธี broth microdilution พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แก่ *S. aureus* ATCC 29213 *S. mutans* ATCC 25175 *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *E. coli* ATCC 35218 ได้ดีที่ความเข้มข้น 10% (v/v) และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Malassezia furfur Trichosporon mucoides* ATCC 204094 *Candida albicans* และ *C. tropicalis* ATCC 9968 โดยน้ำมันซากานูกามีค่า MIC เท่ากับ 0.78 0.78 3.13 3.13% (v/v) ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันเมนูกามีค่า MIC เท่ากับ 1.56 1.56 3.13 3.13%(v/v) ตามลำดับ (Chen และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

Streptococcus mutans

Streptococcus sobrinus

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Brain heart infusion

3.1.3 น้ำมันหอมระเหยจากพืช

Cymbopogon citratus (D.C) Stapf (ตะไคร้)

Melaleuca Alternifolia (ชาออสเตรเลีย)

Illicium verum Hook.f. (โป๊ยกั๊ก)

3.1.4 สารเคมี

Tween 20

Tween 80

Ethanol Alcohol 95%

Sodium Chloride

3.1.5 อุปกรณ์

Autoclave

Larminar air flow

Hot air oven

Microscopes

Incubator 37 C^0

Litmus paper

Digital Precision Balances

1.5 ml Microcentrifuge tube

250 ml Duran flask

Bunsen burner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rack

Forcep

5 ml Pipette

10 ml Pipette

Beaker

Cylinder

Spatula

Plate

Petri dish

13 × 100 mm Test Tube With Screw Cap

16 × 100 mm Test Tube With Screw Cap

20 × 150 mm Test Tube With Screw Cap

1,000 µl Micropiplate

200 µl Micropiplate

10 µl Micropiplate

1,000 µl Micropiplate Tip

200 µl Micropiplate Tip

10 µl Micropiplate Tip

Inoculating loop

Vortex mixer

3.2 การหาสัดส่วนของตัวช่วยทำละลายที่เหมาะสมในการละลายน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหย (Essential Oils) 15 µl ใส่ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมตัวทำละลายร่วม (cosolvent) คือ 95 % เอทานอล ปริมาตร 30 µl ลงในหลอดเดียวกัน จำนวน 3 หลอด ทำการเขย่าให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใส่ Tween 20 หรือ Tween 80 ลงไปในหลอดทดลองดังกล่าว (หลอดที่1 แทนน้ำมันหอมระเหย 1 ชนิด และใส่ Tween 20 หรือ Tween 80 ในปริมาตร 30 35 และ 40 µl ลงในแต่ละหลอดแตกต่างกันตามลำดับ) ทำการเขย่าให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่น โดยใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำใส่ลงในหลอดทดลองครั้งละ 5 µl แล้ว

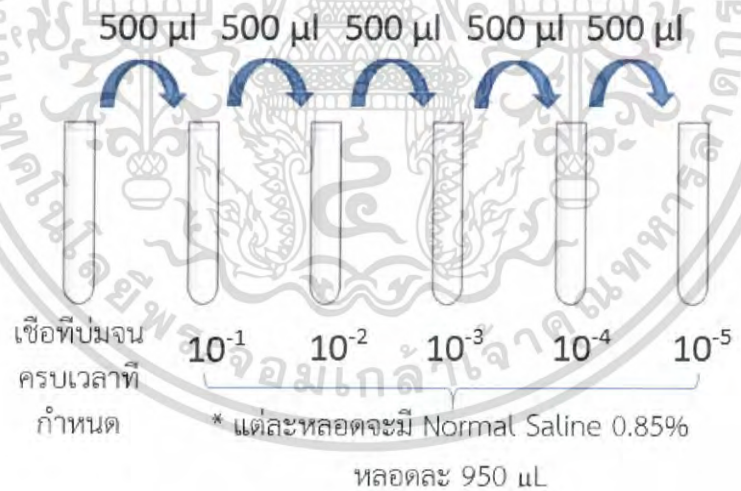
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขย่าหลอดทดลองเพื่อให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการเติมน้ำกลั่นไปเรื่อยๆ จนปริมาตรสารในหลอดครบ 1,000 µl และดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหลอด พร้อมบันทึกผล

หลังจากนั้นนำหลอดทดลองข้างต้นมาบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทิ้งไว้ให้ครบ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ถ่ายรูปและสังเกตลักษณะสารในหลอดทดลอง พร้อมบันทึกผล และทำการเขย่าสารในหลอดทดลองเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสารในหลอดทดลองว่าสารสามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หรือเกิดการตกตะกอนหรือไม่ พร้อมบันทึกผล

3.3 การหากราฟการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

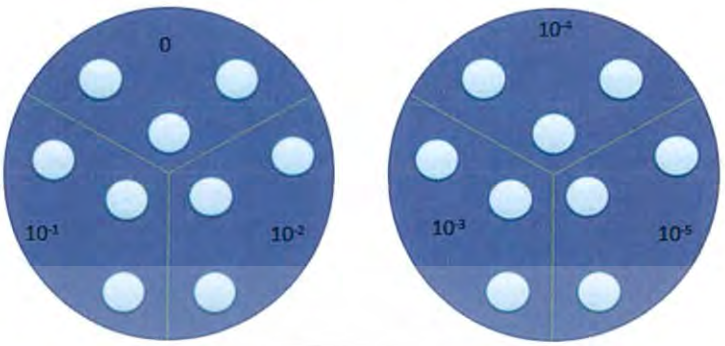
นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงไปเลี้ยงต่อในหลอดอาหารใหม่ และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดเชื้อปริมาตร 50 µl ลงในหลอดอาหารใหม่ 10 mL หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างการเจริญของเชื้อที่เวลา ที่ 0 2 4 6 8 และ 10 ชั่วโมง และนำตัวอย่างการเจริญของเชื้อจากข้างต้นในแต่ละเวลามาทำการเจือจางแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และที่ไม่ทำการเจือจาง และทำการเจือจางโดยใช้ Normal Saline 0.85% ดังรูป



รูปที่ 3.1 แสดงตัวอย่างการเจือจางเชื้อ

เมื่อทำการเจือจางเสร็จแล้ว นำแต่ล่ะความเจือจางมาทำการหยดเชื้อ ด้วยวิธี drop plate technique ปริมาตร 25 µl ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร BHI agar โดยจะหยดความเจือจางละ 3 หยด ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ทำการนับโคโลนีของเชื้อแบ้คทีเรีย พร้อมบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แสดงตัวอย่างการ prop เชื้อลงบนเพลตที่มีอาหาร BHI agar

3.4 การหาค่า Minimal Inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงไปเลี้ยงต่อในหลอดอาหารใหม่ และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการดูดเชื้อปริมาตร 50 µl ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารใหม่ 10 mL และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ตามข้อมูล growth curve ที่ทำการทดลอง) เมื่อครบเวลาทำการเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 5×10^5 CFU/0.5 mL

จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางด้วยวิธี Two-fold serial dilution จาก 0 ถึง 1:512 ใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 500 µl เติมเชื้อที่มีความเข้มข้น 5×10^5 CFU/0.5 mL ลงไป 500 µl นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจผล MIC โดยดูจากความขุ่นของสารละลายด้วยตาเปล่า พร้อมบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การหาค่า Minimal bactericidal concentration (MBC) ของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

นำผลการทดลองที่ได้จากการหา MIC โดยนำหลอดที่ไม่มีการเจริญเชื้อหรือหลอดที่สารละลายใส มาหยดลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร BHI agar ด้วยวิธี drop plate technique 3 หยด ปริมาตรหยดละ 25 µl รอให้แห้ง และนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการตรวจผล MBC โดยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมบันทึกผล

3.6 การทดสอบการหารยะเวลาในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* จากน้ำมันหอมระเหยจากพืชด้วยวิธี time kill assay

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงไปเลี้ยงต่อในหลอดอาหารใหม่ และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการดูดเชื้อปริมาตร 50 µl ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารใหม่ 10 mL นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ตามข้อมูล growth curve ที่ทำการทดลอง) เมื่อครบเวลา ทำการเจือจางเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 5×10^5 CFU/0.5 mL

จากนั้นนำน้ำมันตะไคร้ที่เจือจางด้วยวิธี Two-fold serial dilution จากผลการหา MIC ที่ได้ก่อนหน้านี้ โดยใช้ความเข้มข้น MIC 2MIC และ 4MIC ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดละ 500 µl เติมเชื้อที่มีความเข้มข้น 5×10^5 CFU/0.5 mL ลงไป 100 µl และเติมอาหาร BHI broth 400 µl

หลังจากนั้นทำการหา Time kill โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 5 และ 10 นาที ด้วยวิธี drop plate technique 3 หยด ปริมาตรหยดละ 25 µl (โดยในแต่ละความเข้มข้นของ MIC ที่ใช้ทดสอบในแต่ละเวลา จะทำการเจือจางที่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}) และนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5% เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการตรวจผล MBC โดยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมบันทึกผล

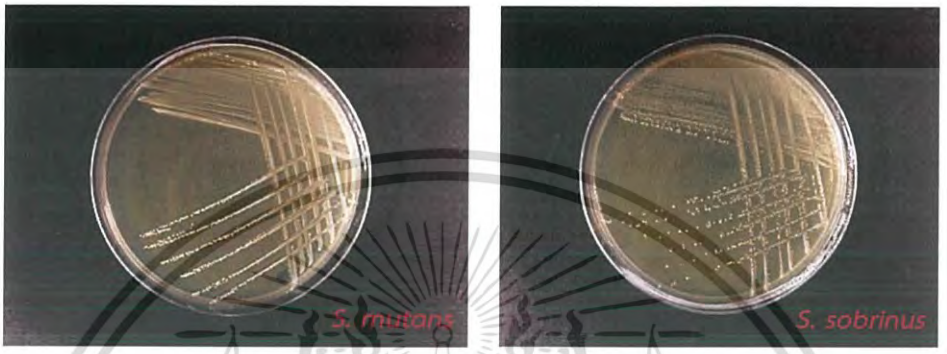
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

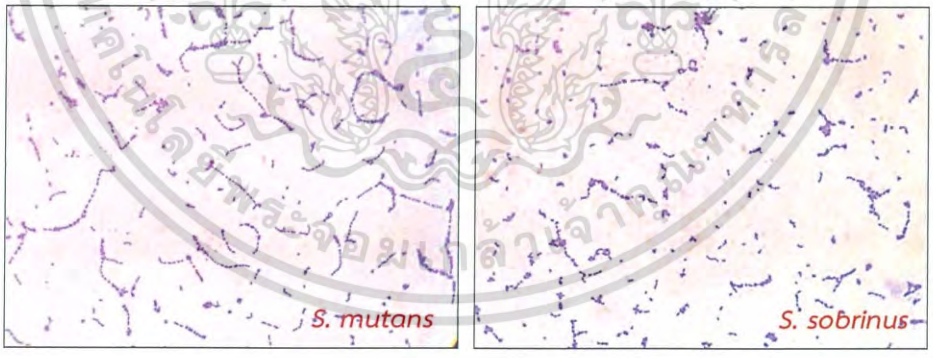
ก. ข.



รูปที่ 4.1 ลักษณะของเชื้อ *S. mutans* (ก) และ *S. sobrinus* (ข) ที่เจริญบนอาหาร BHI agar

จากรูปที่ 4.1 พบว่าลักษณะโคโลนีที่เจริญอาหาร BHI agar มีลักษณะเป็นโคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก และพบว่าเชื้อ *S. mutans* มีโคโลนีขนาดเล็กกว่าเชื้อ *S. sobrinus*

ก. ข.



รูปที่ 4.2 ลักษณะและการจัดเรียงตัวของเชื้อ *S. mutans* (ก) และ *S. sobrinus* (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

จากรูปที่ 4.2 เมื่อนำเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* มาย้อมด้วยสีแบบแกรมแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ติดสีน้ำเงินของ crystal violet โดยมีลักษณะเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย ซึ่งเชื้อ *S. mutans* มีรูปร่างกลมในขณะที่เชื้อ *S. sobrinus* มีรูปร่างรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การหาสัดส่วนของตัวช่วยทำละลายที่เหมาะสมในการละลายน้ำมันหอมระเหย

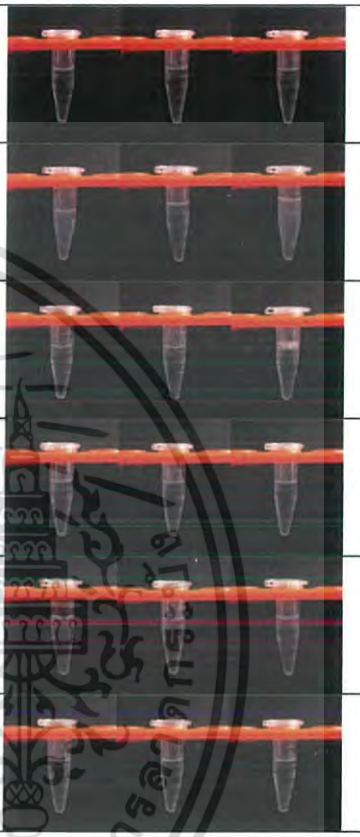
ตารางที่ 4.1 แสดงสัดส่วนของตัวช่วยทำละลายในการละลายน้ำมันหอมระเหย โดยในแต่ละหลอดจะประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย 15 µl Ethanol 95% 30 µl และ Tween 20 ในปริมาตรที่ต่างกัน (30 35 และ 40 µl)

น้ำมันหอมระเหย		Tween 20			รูปผลการทดลอง
		30 µl	35 µl	40 µl	
ก่อนบ่ม	ตะไคร้	++	++	++	
	โป๊ยกั๊ก	++	+++	+++	
	ชาออสเตรเลีย	-	-	-	
หลังบ่ม ที่ 37 °C 24 hr.	ตะไคร้	+	+	+	
	โป๊ยกั๊ก	+	++	++	
	ชาออสเตรเลีย	-	-	-	

หมายเหตุ
- คือ สารละลายใส
+ คือ สารละลายขุ่นเล็กน้อย
++ คือ สารละลายขุ่นปานกลาง
+++ คือ สารละลายขุ่นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงสัดส่วนของตัวช่วยทำละลายในการละลายน้ำมันหอมระเหย โดยในแต่ละหลอดจะประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย 15 µl Ethanol 95% 30 µl และ Tween 80 ในปริมาตรที่ต่างกัน (30 35 และ 40 µl)

น้ำมันหอมระเหย		Tween 80			รูปผลการทดลอง
		30 µl	35 µl	40 µl	
ก่อนบ่ม	ตะไคร้	-	-	-	
	โป๊ยกั๊ก	-	-	-	
	ชาออสเตรเลีย	-	-	-	
หลังบ่ม ที่ 37 °C 24 hr.	ตะไคร้	-	-	-	
	โป๊ยกั๊ก	-	-	-	
	ชาออสเตรเลีย	-	-	-	

หมายเหตุ
- คือ สารละลายใส
+ คือ สารละลายขุ่นเล็กน้อย
++ คือ สารละลายขุ่นปานกลาง
+++ คือ สารละลายขุ่นมาก

จากตารางที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าปริมาณของ tween 20 ที่ต่ำสุดที่สามารถช่วยในการละลายน้ำมันชาออสเตรเลียได้คือ 30 µl แต่ tween 20 ไม่สามารถช่วยละลายน้ำมันตะไคร้ และน้ำมันโป๊ยกั๊กได้ ในขณะที่ปริมาตรของ tween 80 ที่ต่ำสุดที่สามารถช่วยละลายน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดได้คือ 30 µl เพราะฉะนั้นสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวช่วยทำลายในการละลายน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำมันหอมระเหย 15 µl : Ethanol95% 30 µl : Tween80 30 µl

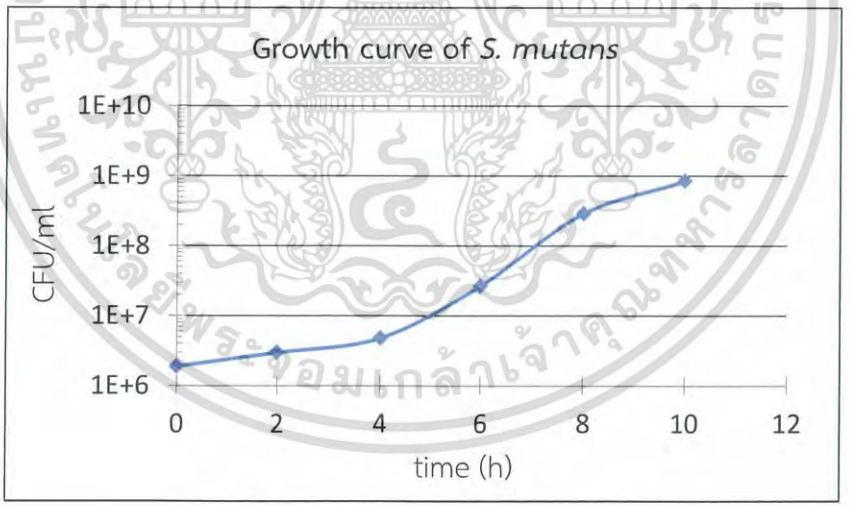
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษากราฟการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ในอาหารเหลว BHI ในระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 10 แสดงดังรูปที่ 4.3 สำหรับเชื้อ *S. mutans* และรูปที่ 4.4 สำหรับเชื้อ *S. sobrinus*

ตารางที่ 4.3 แสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *S. mutans* ระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 10

ชั่วโมงที่	CFU/ml
0	1.9×10^{6}
2	3×10^{6}
4	4.8×10^{6}
6	2.67×10^{7}
8	2.89×10^{8}
10	8.47×10^{8}

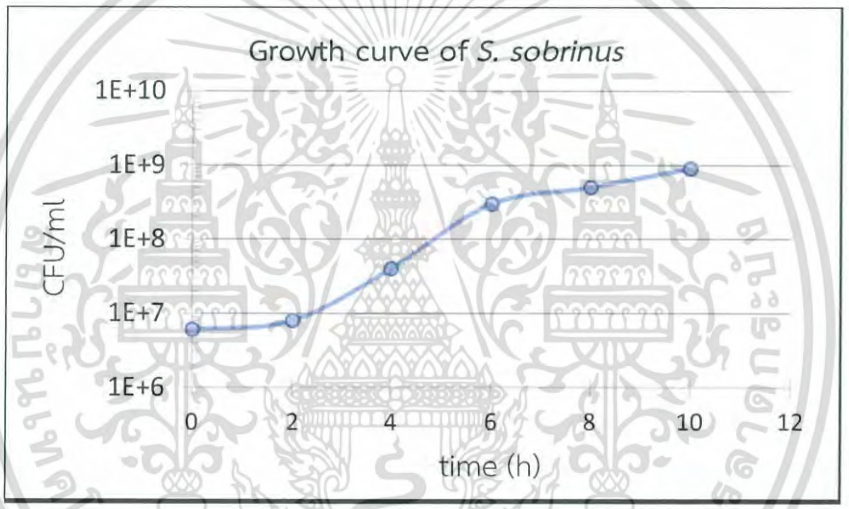


รูปที่ 4.3 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *S. sobrinus* ระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 10

ชั่วโมงที่	CFU/ml
0	6×10^{6}
2	8×10^{6}
4	4×10^{7}
6	3×10^{8}
8	5×10^{8}
10	9×10^{8}



รูปที่ 4.4 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. sobrinus*

จากรูปที่ 4.3 และ 4.4 พบว่าเชื้อ *S. mutans* มีการเจริญอยู่ในระยะ lag phase ในช่วงระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 4 และเข้าสู่การเจริญในระยะ log phase หลังจากชั่วโมงที่ 6 และพบว่าเชื้อ *S. sobrinus* มีการเจริญอยู่ในระยะ lag phase ในช่วงระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 2 และเข้าสู่การเจริญในระยะ log phase หลังจากชั่วโมงที่ 2

Matson และคณะ (2015) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อ *S. mutans* มีระยะ log phase อยู่ประมาณชั่วโมงที่ 5 ถึงชั่วโมงที่ 13 แล้วจึงเข้าระยะ stationary phase

Hasan และคณะ (2012) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อ *S. mutans* พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 5 เชื้อเริ่มเขาสู่ระยะ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 เชื้อจึงเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งทั้งสองงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การทดสอบความไวของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

4.4.1 การหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

ตารางที่ 4.5 ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. mutans*

น้ำมันหอมระเหย	ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (µg/ml)									
	15	7.5	3.75	1.875	0.9375	0.4688	0.2344	0.1172	0.0586	0.0293
ตะไคร้	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
โป๊ยกั๊ก	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ชาออสเตรเลีย	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ - คือ สารละลายใส (ไม่พบการเจริญของเชื้อ)
+ คือ สารละลายขุ่น (พบการเจริญของเชื้อ)

ตารางที่ 4.6 ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. sobrinus*

น้ำมันหอมระเหย	ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (µg/ml)									
	15	7.5	3.75	1.875	0.9375	0.4688	0.2344	0.1172	0.0586	0.0293
ตะไคร้	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
โป๊ยกั๊ก	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ชาออสเตรเลีย	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ - คือ สารละลายใส (ไม่พบการเจริญของเชื้อ)
+ คือ สารละลายขุ่น (พบการเจริญของเชื้อ)

จากตารางที่ 4.5 พบว่าเมื่อทดสอบเชื้อ *S. mutans* กับน้ำมันตะไคร้ และน้ำมันชาออสเตรเลีย ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.9375 และ 3.75 µg/ml ตามลำดับ และจากตารางที่ 4.6 จะเห็นว่าเมื่อทดสอบเชื้อ *S. sobrinus* กับน้ำมันตะไคร้ และน้ำมันชาออสเตรเลีย มีค่า MIC เท่ากับ 0.4688 และ 1.875 µg/ml ตามลำดับ ส่วนน้ำมันโป๊ยกั๊กไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Almeida และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาเรื่อง Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. โดยใช้น้ำมันตะไคร้ทำในการหา MIC ที่มีผลต่อ *S. mutans* ATCC 35688 ผลปรากฏว่าค่า MIC เท่ากับ 0.25% และสามารถยับยั้งเชื้อได้ 50%

อัจฉรัตน์และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาเรื่อง ประสิทธิภาพของน้ำมันตะไคร้และน้ำมันตะไคร้หอมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* และ *Escherichia coli* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเของ *S. aureus* และ *St. agalactiae* ได้ดีที่สุดรองลงมาคือ *E. coli* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.125 3.125 และ 12.5µg/ml ตามลำดับ

Mayaud และคณะ (2008) ทำการศึกษาเรื่อง Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อกลุ่ม Streptococci ของน้ำมันตะไคร้และน้ำมันชาออสเตรเลีย พบว่าน้ำมันตะไคร้ และน้ำมันชาออสเตรเลียมีค่า MIC เท่ากับ 0.26 และ 0.56% v/v ตามลำดับ

Carson และคณะ (2006) ได้รวบรวมการประสิทธิภาพของน้ำมันชาออสเตรเลียในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าน้ำมันชาออสเตรเลียมีค่า MIC ต่อเชื้อ *Streptococcus pyogenes* *Staphylococcus aureus* *S. aureus* (methicillin resistant) และ *E. coli* เท่ากับ 0.12–2 0.5–1.25 0.04–0.35 และ 0.08–2 %(v/v) ตามลำดับ

Freires และคณะ (2016) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันชาออสเตรเลียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. sobrinus* 6715 และ*S. sobrinus* B13 พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 10,000 และ 2500 µg/mL ตามลำดับ

เกษร (2535) กล่าวว่าโป๊ยกั๊กมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans*, *A. flavus* และ *T. mentagophytes*

วัชรินทร์และคณะ (2559) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันโป๊ยกั๊กในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 *B. cereus* และ *E. coli* ATCC 25922 โดยให้ค่า MIC เป็น 8 8 และ 4 mg/ml ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การหาค่า Minimal Bactericidal Concentration ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

ตารางที่ 4.7 ค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

เชื้อ	น้ำมันหอมระเหย	ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (µg/ml)					
		15	7.5	3.75	1.875	0.9375	0.4688
S. mutans	ตะไคร้	-	-	-	+	+	ND
	โป๊ยกั๊ก	+	+	+	+	+	ND
	ชาออสเตรเลีย	-	-	+	+	+	ND
S. sobrinus	ตะไคร้	-	-	-	-	-	+
	โป๊ยกั๊ก	+	+	+	+	+	+
	ชาออสเตรเลีย	-	-	+	+	+	+

หมายเหตุ - คือ ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง BHI

\+ คือ พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง BHI

ND คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ (not done)

จากตารางที่ 4.7 จะเห็นว่าเมื่อนำเชื้อ *S. mutans* ทดสอบกับน้ำมันตะไคร้ และ น้ำมันชาออสเตรเลีย มีค่า MBC เท่ากับ 3.75 และ 7.5 µg/ml ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อ *S. sobrinus* ทดสอบกับน้ำมันตะไคร้ และน้ำมันชาออสเตรเลีย มีค่า MBC เท่ากับ 0.9375 และ 7.5 µg/ml ตามลำดับ ส่วนน้ำมันโป๊ยกั๊กไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *mutans* และ *S. sobrinus* ได้

จากการศึกษาของ Almeida และคณะ (2013) ได้การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* พบว่าน้ำมันตะไคร้มีค่า MBC เท่ากับ 0.125%

การศึกษาของอัจฉรัตน์และคณะ (2555) พบว่าน้ำมันตะไคร้ ให้ค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus St. agalactiae* และ *E. coli* เท่ากับ 6.25 25.0 และ 25.0 µg/ml ตามลำดับ

Carson และคณะ (2006) ได้รวบรวมการประสิทธิภาพของน้ำมันชาออสเตรเลียในการยับยั้งแบคทีเรียพบว่าน้ำมันชาออสเตรเลียมีค่า MBC ต่อเชื้อ *Streptococcus pyogenes S. aureus S. aureus* (methicillin resistant) และ *E. coli* เท่ากับ 0.25–4 1-2 0.5 และ 0.25–4 %(v/v) ตามลำดับ

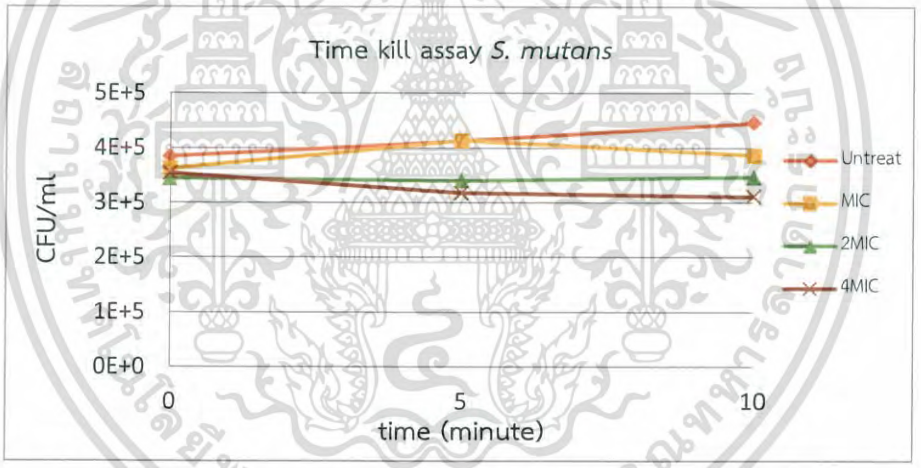
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Freires และคณะ (2016) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันชาออสเตรเลียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. sobrinus* 6715 และ*S. sobrinus* B13 พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีค่า MBC เท่ากัน คือ 10,000 µg/mL

จากการศึกษาความไวของน้ำมันตะไคร้ น้ำมันชาออสเตรเลีย และน้ำมันโป๊ยกั๊กต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ทั้งในการหาค่า MIC และMBC ชี้ให้เห็นว่าน้ำมัน ตะไคร้ และน้ำมันชาออสเตรเลีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนนี้ที่กล่าวว่า น้ำมันตะไคร้และน้ำมันชาออสเตรเลียมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนน้ำมันโป๊ยกั๊กจากการศึกษานี้พบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

4.5 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของน้ำมันหอมระเหย (Time kill assay)

4.5.1 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ของน้ำมันตะไคร้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ของน้ำมันตะไคร้

เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อของน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.9375 µg/ml (MIC) กับเชื้อ *S. mutans* พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้น 6.62 %

เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อของน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 1.875 µg/ml (2MIC) กับเชื้อ *S. mutans* พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที เชื้อมีปริมาณลดลง 0.78

เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อของน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 3.75 µg/ml (4 MIC) กับเชื้อ *S. mutans* พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที เชื้อมีปริมาณลดลง 12.8% ดังแสดงในภาพที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ *S. sobrinus* ของน้ำมันตะไคร้

รูปที่ 4.6 กราฟแสดงระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ *S. sobrinus* ของน้ำมันตะไคร้

เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อของน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.4688 µg/ml (MIC) กับเชื้อ *S. sobrinus* พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้น 55.36%

เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อของน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 1.875 µg/ml (2MIC) กับเชื้อ *S. sobrinus* พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที เชื้อมีปริมาณลดลง 11.69%

เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อของน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 3.75 µg/ml (4MIC) กับเชื้อ *S. sobrinus* พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที ปรากฏว่าเชื้อมีปริมาณเชื้อมีเท่ากับปริมาณเริ่มต้น ดังแสดงในภาพที่ 4.6

ศิริลักษณ์ (2557) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของสารสกัดใบกระทุ้วยวิธี Time kill assay โดยศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบกระทุ้วยเอทาเนอล และอะซิโตน พบว่าสารสกัดใบกระทุ้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 256 µg/ml สามารถลดเชื้อลงได้ 2 log ในเวลา 20 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น ส่วนสารสกัดใบกระทุ้วยอะซิโตนที่ความเข้มข้น 64 และ 128 µg/ml สามารถลดเชื้อลงได้ 2 log ภายในเวลา 16 ชั่วโมง สำหรับ Chlorhexidine ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 µg/ml สามารถลงเชื้อลงได้ 2 log ภายในเวลา 16 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ

Li และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาเรื่อง Time-kill behavior against eight bacterial species and cytotoxicity of antibacterial monomers โดยทำการศึกษาโดยใช้ dimethyl aminododecyl methacrylate (DMADDM) และ imethylammoniumethyl dimethacrylate (DMAEDM) ซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นโดยการทำปฏิกิริยากับ tretairy amine group ด้วย organo-halide ซึ่ง DMAEDM เป็นสารที่ยับยั้งการแสดงออกของ glucosyltransferases (*gtf*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gene ของ *S. mutans* ยับยั้งการรวมตัวกันของแบคทีเรียและการเกิดไบโอฟิล์ม และ DMADDM เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดไบโอฟิล์มและการผลิตกรดแลคติค จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ DMAEDM ต่อ *Streptococcus mutans* UA159 มี MIC เท่ากับ 20 และ MBC เท่ากับ 40 mg/mL สำหรับการศึกษา Time kill ของ DMAEDM พบว่าที่ความเข้มข้น 80 mg/mL ฆ่าเชื้อทั้งหมดได้ในเวลา 240 นาที และที่ความเข้มข้น 160 mg/mL ฆ่าเชื้อทั้งหมดได้ในเวลา 30 นาที และสำหรับ DMADDM มี MIC เท่ากับ 0.0049 mg/mL MBC เท่ากับ 0.0098 mg/mL และ Time kill ของ DMADDM ที่ความเข้มข้น 9.8 19.5 และ39 µl/ml สามารถฆ่าเชื้อทั้งหมดได้ในเวลา 360 120 และ 10 นาที ตามลำดับ

จากผลการทดลอง time kill ซึ่งเป็นการดูปริมาณของความเข้มข้นของสารในการฆ่าแบคทีเรียโดยขึ้นกับเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะน้อยลง ในขณะที่ผลการทองลองในโครงงานพิเศษเล่มนี้ เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำมันตะไคร้ในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* พบว่าที่ความเข้ม 3.75 µg/ml (4MIC) และ 0.9375 µg/ml (2MIC) ตามลำดับ สามารถฆ่าเชื้อได้ 12.08% และ 11.69 % ตามลำดับภายในเวลา 10 นาที ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นและเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการฆ่าเชื้อ *S. mutans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิด ในการต้านการเจริญของเชื้อและศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อพบว่า น้ำมันตะไคร้ ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันชาออสเตรเลีย ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อโรคในช่องปาก ส่วนน้ำมันโป๊ยกั๊กไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการต้านการเจริญของเชื้อทั้งสองตัวได้ โดยสัดส่วนที่เหมาะสมในการละลายน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำมันหอมระเหย 15 µl : Ethanol95% 30 µl : Tween80 30 µl : น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 925 µl และทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อของน้ำมันตะไคร้ และชาออสเตรเลียต่อเชื้อ *S. mutans* พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 0.9375 และ 3.75 µg/ml ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ 3.75 และ 7.5 µg/ml ตามลำดับ ส่วนน้ำมันตะไคร้ และชาออสเตรเลียต่อเชื้อ *S. sobrinus* มีค่า MIC เท่ากับ 0.4688 และ 1.875 µg/ml ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ 0.9375 และ 7.5 µg/ml ตามลำดับ จากนั้นได้เลือกน้ำมันตะไคร้มาทำการทดสอบการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ด้วย วิธี time kill assay กับเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* พบว่าเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 10 นาที ที่ความเข้มข้น 3.75 µg/ml (4MIC) สามารถลดปริมาณของเชื้อ *S. mutans* ได้ 12.08% และที่ความเข้มข้น 0.9375 µg/ml (2MIC)สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. sobrinus* ได้ 11.69%

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด ดังนั้นจึงสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดงานวิจัย โดยศึกษาพัฒนาการผลิตยา หรือเครื่องสำอาง โดยต้องศึกษาถึงประสิทธิภาพของการรักษาและความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นเพื่อความปลอดภัย และเป็นประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไป ถ้าสามารถพัฒนาถึงขั้นการผลิตจริง จะเป็นการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้ประโยชน์ จึงเป็นการลดการใช้สารเคมีในทางอ้อม ดังนั้นจึงอาจคิดค้นงานวิจัยอื่นๆ เพื่อเป็นการนำสารสกัดจากพืชมาใช้ประโยชน์ และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans และ S. sobrinus* เพื่อระบุชนิดและประเภทของสารเหล่านั้น แล้วนำสารเหล่านั้นมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิด เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติได้จริง หรือในอุตสาหกรรมได้สะดวกกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรณิศ วิรานุวัตร และชัชวาล ฐานมโนวงศ์. 2549. “น้ำยาบ้วนปากชนิดแกรนูลฟู่ของสารสกัดชาเขียว ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อในช่องปาก” ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

เกษร นันทจิต. 2535. “รายงานวิจัยฤทธิ์ต้านจุล ชีพของผลโป๊ยกั๊ก.” เชียงใหม่ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เข็มทอง มิตรกูล และบุณฑริกา อัครพิพัฒน์กุล. 2016. “แบคทีเรียหน้าใหม่ในรูฟันของเด็กน้อยเชื้อ *Streptococcus sobinus*.” Thai dental magazine. 1(1), 48-51.

ชุติมา ไตรรัตน์วรกุล. 2554. “ทันตกรรมป้องกันในเด็กและวัยรุ่น.” พิมพ์ครั้งที่4 กรุงเทพฯ : ภาควิชาทันตกรรมสาหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิจศิริ เรืองรังสี และพยอม ตันติวัฒน์. 2534. “พืชสมุนไพร” พิมพ์ที่ โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์ : กรุงเทพฯ. หน้า 112.

ประภัสสร วีระพันธ์ และวัชรี คุณกิตติ. 2011. “คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง.” วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกลูพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.” หน้า 91-101. ใน การประชุมวิชาการสัตวแพทย์ศาสตร์ มข. ครั้งที่9. ขอยแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปัทมา พิทยขจรวุฒิ. 2008. “สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าจากทรัพยากรชีวภาพของไทย.” กระทรวงวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี.

พันทิพา ลาภปริสุทธิ. 2558. “การเกิดฟันผุในเด็ก.” หน้า 27-32. ใน การประชุมวิชาการศูนย์การแพทย์กาญจนา. โรงพยาบาลทันตกรรมมหาจักรีสิรินธร.

วลัยลักษณ์ เมธาภัทร. 2559. “Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity.” [Online]. Available : https://bdn.go.th/pt/newsDetail/6.

วัชรินร์ รังสีภาณุรัตน์ พัชรี กัมมารเจษฎากุล และอิรยา จันทร์วิทยานุชิต. 2559. “ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cererus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922.” วารสาร มฉก. วิชาการ 19, 38 (มกราคม-มิถุนายน): 35-48.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิริลักษณ์ หอมละเอียด. 2557. "ฤทธิ์การยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* จากสารสกัดใบกระทุ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลา.

สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล สุทธิมาส หยวกหยง กรรณิการ์ มาสี พชราวลี นันบุญตา และภัทธวุฒิ บุรีรักษ์. 2014. "ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดชะเอมเทศต่อเชื้อ *Srephylococcus aureus* ที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์ม." ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

อิสริยา เตชะธนะวัฒน์. "Tea Tree Oil." [Online]. Available : http://www.thailabonline.com/aromateatree.htm.

อัจฉรัตน์ สุวรรณภักดี รังสิมา สายศรทิพย์ และศุภารัตน์ สุทธิมุสิก. 2555. "ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม: *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae* และ *Escherichia coli.*" แก่นเกษตร 40(2): 230-235.

Ahmad A. and Youssef, M. 2015. "Chemical composition and bioactive properties of *Illicium verum* (star-anise) extracts Prepared by different methods." Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. 5(2): 1160-1170.

Alvaro, M.R. Alejandra, H.H. and Antonio, D.C. 2015. "In vitro Antibacterial Activity of *Maclura tinctoria* and *Azadirachta indica* against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*" Journal of Pharmaceutical. 7(4): 291-298.

Almida, R. Akisue, G. Cardoso, L. Junqueira, J. Jorge, A. 2013. "Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. On *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp." Rev. Bras. Pl. Med., Campinas. 474-482

Calcabrini, A. Stringaro, A. Toccacieli, L. Meschini, S. Marra, M. Colone, M. Salvatore, G. Mondellow, F. Arancia, G. and Molinari, A. 2004. "Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca Alternifolia* (TeaTree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of Human Melanoma Cells." J Invest Dermatol 122 : 349-360.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Carson, C.F. Hammer, K.A. and Riley, T.V. 2006. "*Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil : a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties" Clinical Microbiology. 50–62.

Chen, C.C. Yan, S.H. Yen, M.Y. Wu, P.F. Liao, W.T. Huang, T.S. Wen, Z.H. Wang, H.D.W. "Investigations of kanuka and manuka essential oils for in vitro treatment of disease and cellular inflammation caused by infectious microorganisms." Journal of Microbiology, 49: 104-111.

Choi, O. Cho1, S.K. Kim, J. Park, C.G. Kim, J. 2015. "In vitro antibacterial activity and major bioactive components of *Cinnamomum verum* essential oils against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 6(4): 308-314.

Costa, C.A. Bidinotto, L.T. Takahira, R.K. Salvadori, D.M. Barbisan, L.F. and Costa, M. 2011. "Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil." Food Chem Toxicol. 49(9): 2268-72.

De, M. De, A.K. Sen, P. Banerjee, A.B. 2002. "Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* Hook.f)." Phytother Research. 16(1): 94-5.

De Soet, J.J. van Loveren, C. Lammens, A.J. Pavicić, M.J. Homburg, C.H. ten Cate, J.M. de Graaff, J. 1991. "Differences in cariogenicity between fresh isolates of Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans." Caries Research. 25(2): 116-22.

Freires, I.A. Denny, C. Benso, B. Matias de Alencar, S. and Luiz Rosalen, P. 2015. "Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review." Molecules, 20, 7329-7358.

Fritz, E. Olzant, S. and Langer, R. 2008. "*Illicium verum* Hook. f. and *Illicium anisatum* L.: Anatomical Characters and their Value for Differentiation." Sci Pharm. 76: 65–76.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Raman, A. Weir, U. and Bloomfield, S.F. 1995. "Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus, Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*" Applied Microbiology. 21(4): 242–245.

Sneath, P.H.A. Mair, N.S. Sharp, M.E. and Holt, J.G. 1986. "Bergey's manual of systemic bacteriology." *Williams & Wilkins* 2: 1054-1063

Li, F. Weir, M. Fouad, A. and Xu, H. 2013. "Time-kill behavior against eight bacterial species and cytotoxicity of antibacterial monomers" J Dent. 41(10)

Loesche, W.J. 1986. "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay." Microbial Rev 50: 353- 380.

Hammer, K.A. Carson, C.F. and Riley, T.V. 2003. "Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil" Journal of Applied Microbiology. 95: 853-860

Hasan, S. Danishuddin, M. Adil, M. Singh, K. Verma, PK. and Khan, AU. 2012. "Efficacy of E. officinalis on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*: a novel and alternative approach to suppress quorum-sensing mechanism." Indranil Biswas, University of Kansas Medical Center United States of America. 1-12.

Huang, Y. Zhao, J. Zhou, L. Wang, J. Gong, Y. Chen, X. Guo, Z. Wang, Q. and Jiang, W. 2010. "Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component *trans*-Anethole." Molecules. 15: 7558-7569.

Loughlin, R. Gilmore, B.F. McCarron, P.A. and Tunney, M.M. 2007. "Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells." Letters in Applied Microbiology. ISSN: 0266-8254.

Mayaud, L. Carricajo, A. Zhiri, A. and Aubert, G. 2008. "Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to Antibiotics." Letters in Applied Microbiology. ISSN: 0266-8254.

Matson, A. Herrera, A. and Díaz, A. 2015. "In vitro Antibacterial Activity of Maclura tinctoria and Azadirachta indica against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*." Journal of Pharmaceutical. 7(4): 291-298.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Naik, M.I. Fomda, B.A. Jaykumar, E. and Bhat, J.A. 2010. "Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias" Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 535-538.

Onawunmi, G.O. Yisak, WA. Ogunlana, E.O. 1984. "Antibacterial constituents in the essential oil of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf." J Ethnopharmacol. 12(3): 279-86.

Tofiño-Rivera, A. Ortega-Cuadrosc, M. Galvis-Pareja, D. Jiménez-Rios, H. Merinie, L.J and Martínez-Pabón, M.C. 2016. "Effect of Lippia alba and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells." Journal of Ethnopharmacology. 191, 749-754.

Vazirian, M. Kashani, S.T. Ardekani, M. Khanavi, M. Jamalifar, H. Fazeli, M.R and Toosi, A.N. 2012. "Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) essential oil against food-borne pathogens added to cream-filled cakes and pastries." Journal of Essential Oil. 579-582.

Yang, C.H. Chang, F.R. Chang, H.W. Wang, S.M. Hsieh, M.C. and Chuang, L.Y. 2012. "Investigation of the antioxidant activity of *Illicium verum* extracts." Journal of Medicinal Plants. 6(2): 314-324.

Yazdani, D. Rezazadeh, S. Amin, G. Zainal Abidin, M.A. Shahnazi, S. and Jamalifar, H. 2009. "Antifungal Activity of Dried Extracts of Anise (*Pimpinella anisum* L.) and Star anise (*Illicium verum* Hook. f.) Against Dermatophyte and Saprophyte Fungi." Journal of Medicinal Plants. 24-29.

Zhang, W. Zhang, Y. Yuan, X. and Sun, E. 2015. "Determination of Volatile Compounds of *Illicium verum* Hook. f. Using Simultaneous Distillation-Extraction and Solid Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry." Journal of Pharmaceutical. 14(10): 1879-1884.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเหลวและอาหารแข็ง brain heart infusion (BHI)

1.1 BHI broth

BHI 37 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.2 BHI agar

BHI	37 g
agar	15 g

นำสารผสมกันตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น เป็น 1,000 ml ฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. การเพาะเลี้ยง

เพาะเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobinus* ลงบนอาหาร BHI agar ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มี CO_2 5% และนำโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงใน BHI broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเก็บรักษาเชื้อ

3.1 การเตรียมอาหาร

BHI	3.7 g
Glycerol	30 ml

นำสารผสมกันตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น เป็น 100 ml ฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.2 การเก็บเชื้อ

นำเชื้อปริมาตร 1 ml ใส่ลงใน ependroft จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เหลือตะกอนไว้ที่ก้นหลอด เติมเชื้อปริมาตร 1 ml ปั่นเหวี่ยงอีก 1 รอบที่ 8000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการ resuspend ด้วยอาหาร BHI ที่มี glycerol ปริมาตร 1 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. ข้อมูลดิบการศึกษาการเจริญ (Growth curve) ของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

ชั่วโมงที่	*S. mutans*	*S. sobrinus*
	CFU/mL	CFU/ml
0	1.91×10^{6}	6×10^{6}
2	3×10^{6}	8×10^{6}
4	4.83×10^{6}	4×10^{7}
6	2.67×10^{7}	3×10^{8}
8	2.89×10^{8}	5×10^{8}
10	8.47×10^{8}	9×10^{8}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ข้อมูลดิบของผลการทดสอบ Time kill ของน้ำมันตะไคร้ต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

2.1 *S. mutans*

ความเข้มข้น	เวลา(นาที)		
	0	5	10
Untreat	3.84×10^{5}	4.12×10^{5}	4.45×10^{5}
MIC	3.63×10^{5}	4.13×10^{5}	3.87×10^{5}
2MIC	3.44×10^{5}	3.4×10^{5}	3.47×10^{5}
4MIC	3.53×10^{5}	3.17×10^{5}	3.11×10^{5}

2.2 *S. sobrinus*

ความเข้มข้น	เวลา(นาที)		
	0	5	10
Untreat	1.4×10^{6}	1.79×10^{6}	2.01×10^{6}
MIC	7.47×10^{5}	1.17×10^{6}	1.16×10^{6}
2MIC	1.03×10^{6}	8.27×10^{5}	9.07×10^{5}
4MIC	9.2×10^{5}	1×10^{6}	9.2×10^{5}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

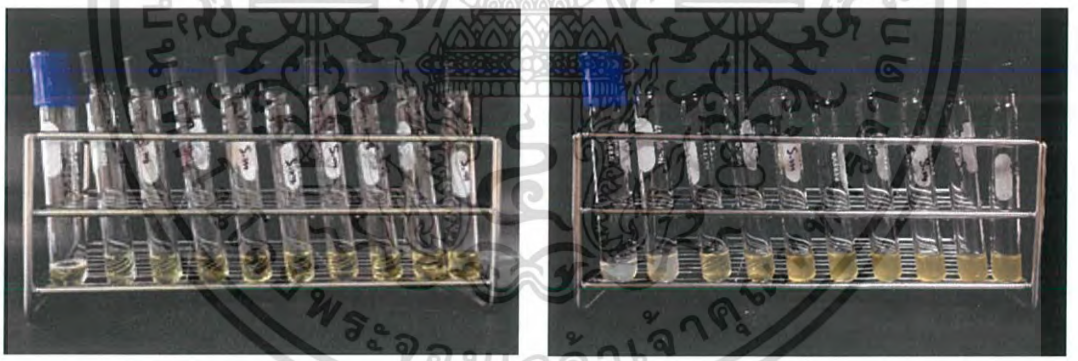
1. ผลการหา Minimal Inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus*

1.1 MIC ของตะไคร้ต่อเชื้อ *S. mutans*

ก่อนบ่ม หลังบ่ม

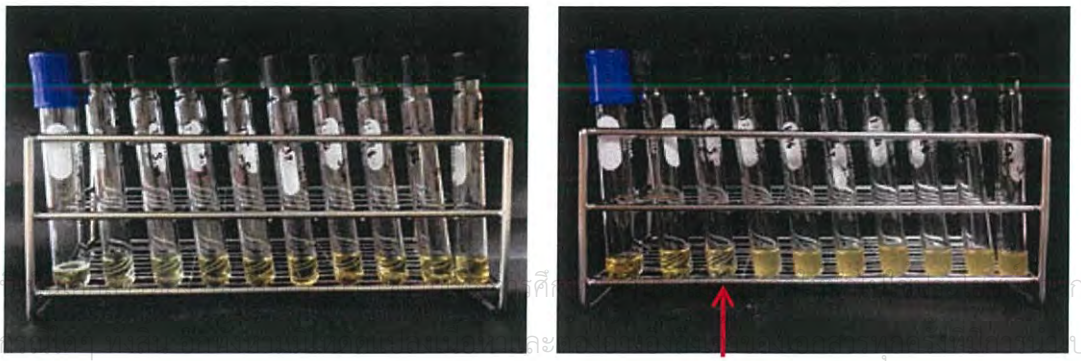
1.2 MIC ของโป๊ยกั๊กต่อเชื้อ *S. mutans*

ก่อนบ่ม หลังบ่ม



1.3 MIC ของซาออสเตรเลียต่อเชื้อ *S. mutans*

ก่อนบ่ม หลังบ่ม

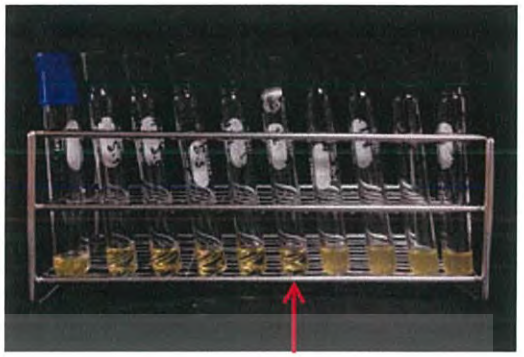


เอกสาร ศึกษา การค้า ไม่ว่า ใช้

1.4 MIC ของตะไคร้ต่อเชื้อ *S. sobrinus*

ก่อนบ่ม

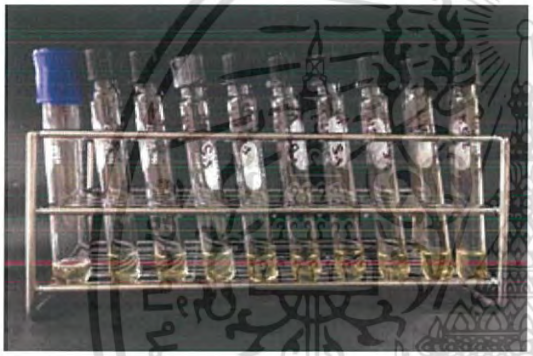
หลังบ่ม



MIC

1.5 MIC ของโป๊ยกั๊กต่อเชื้อ *S. sobrinus*

ก่อนบ่ม

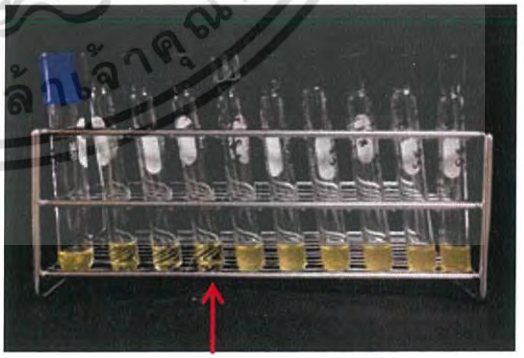


หลังบ่ม

1.6 MIC ของชาออสเตรเลียต่อเชื้อ *S. sobrinus*

ก่อนบ่ม

หลังบ่ม



MIC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้