

ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญและการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อกลุ่ม
Oral Streptococci
EFFECTS OF ESSENTIAL OIL ON GROWTH AND BIOFILM FORMATION
OF ORAL STREPTOCOCCI



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2568

KMITL-2025-SC-M-020-022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECTS OF ESSENTIAL OIL ON GROWTH AND BIOFILM FORMATION
OF ORAL STREPTOCOCCI



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2025
KMUTL-2025-SC-M-020-022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABAN

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญและการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อกลุ่ม Oral Streptococci
ชื่อนักศึกษา	นายเกษมชาติ พรหมสอน
รหัสนักศึกษา	64605017
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2568
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

สุขภาพช่องปากเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของประชาชน โดยเฉพาะปัญหาการเกิดคราบพลัค (dental plaque) ซึ่งเป็นต้นเหตุของโรคฟันผุและโรคปริทันต์ สาเหตุสำคัญมาจากการก่อตัวของไบโอฟิล์มที่สร้างโดยแบคทีเรียในกลุ่ม oral streptococci โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และ *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402 ปัจจุบันมีการนำสารจากธรรมชาติมาใช้ทดแทนสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะในการควบคุมแบคทีเรียในช่องปาก ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ของ citral และ methyl chavicol ต่อสายพันธุ์แบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* ATCC 33478 ในด้านการยับยั้งการเจริญ การก่อตัวของไบโอฟิล์ม การฆ่าเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์ม และการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารทั้งสอง โดยใช้วิธี broth microdilution crystal violet assay และ time-kill assay พบว่า citral มีประสิทธิภาพสูงกว่า methyl chavicol อย่างมีนัยสำคัญ โดย citral มีค่า MIC เท่ากับ 0.0313% ต่อ *S. sobrinus* ATCC 33478 และ 0.063% ต่อ *S. mutans* ATCC 25175 ส่วน methyl chavicol มีค่า MIC เท่ากับ 0.500% สำหรับทั้งสองสายพันธุ์ ค่า MBC ของ citral อยู่ที่ 0.063% ขณะที่ methyl chavicol อยู่ที่ 1.000% การยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มพบว่า citral ที่ความเข้มข้น 0.063% สามารถลดไบโอฟิล์มได้ถึง 95–96% ส่วน methyl chavicol ที่ 0.250–1.000% ลดได้ 94–95% นอกจากนี้ citral ยังสามารถฆ่าเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์มได้ถึง 99% ที่ความเข้มข้น 0.0313% ขณะที่ methyl chavicol ต้องใช้ความเข้มข้นอย่างน้อย 0.125% จึงให้ผลใกล้เคียงกัน ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ระหว่าง citral และ methyl chavicol โดยใช้ค่า FICI พบว่าไม่มีฤทธิ์เสริมกัน (FICI > 0.5) และไม่พบความสามารถในการทำลายโครงสร้างของไบโอฟิล์มของสารทั้งสองตัว แม้ใช้ในความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ ข้อมูลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า citral เป็นสารที่มีศักยภาพสูง สำหรับการควบคุมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญและการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรียในช่องปาก และอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากจากธรรมชาติในอนาคต

คำสำคัญ: citral methyl chavicol การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก ไบโอฟิล์ม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Effects of Essential Oil on the Growth and Biofilm Formation of Oral Streptococci
Student Name	Mr. Kasemchart Promsorn
Student ID	64605017
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Academic Year	2025
Advisor	Asst. Prof. Dr. Karn Wongsariya

Abstract

Oral health is a critical factor influencing the quality of life, with dental plaque being a primary cause of dental caries and periodontal diseases. A major contributor to plaque formation is the biofilm produced by oral streptococci, particularly *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402. Recently, there has been increasing interest in utilizing natural compounds as alternatives to chemical agents or antibiotics in controlling oral bacteria. This study aimed to evaluate the effects of citral and methyl chavicol on *S. mutans* ATCC 25175 and *S. sobrinus* ATCC 33402, focusing on bacterial growth inhibition, biofilm formation, bacterial killing within biofilms, and the potential synergistic interaction between the two compounds. Using broth microdilution, crystal violet assay, and time-kill assay, citral demonstrated significantly higher efficacy than methyl chavicol. Citral exhibited MIC values of 0.0313% for *S. sobrinus* ATCC 33402 and 0.063% for *S. mutans* ATCC 25175, while methyl chavicol showed MIC values of 0.500% for both strains. The MBC of citral was 0.063%, compared to 1.000% for methyl chavicol. Citral at 0.063% inhibited biofilm formation by 95–96%, while methyl chavicol at concentrations ranging from 0.250% to 1.000% achieved 94–95% inhibition. Moreover, citral achieved 99% bacterial killing within biofilms at 0.0313%, whereas methyl chavicol required at least 0.125% to achieve similar efficacy. Synergy testing using FICI values indicated no synergistic interaction (FICI > 0.5). Furthermore, neither compound could

disrupt mature biofilm structures, even at the highest tested concentrations. These findings suggest that citral possesses high potential as a natural agent for controlling oral bacterial growth and biofilm formation and may be developed into a natural oral healthcare product in the future.

Keywords: Oral pathogenic bacteria, Citral, Methyl chavicol, Biofilm, Antibacterial activity



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาค้นคว้าวิทยานิพนธ์เรื่อง “ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญและการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อกลุ่ม Oral Streptococci” ฉบับนี้ จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากขาดความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะอันทรงคุณค่า ตลอดจนติดตามและส่งเสริมความก้าวหน้าของงานวิจัยอย่างใกล้ชิดตลอดระยะเวลาการดำเนินงาน ซึ่งเป็นแรงผลักดันสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้มีคุณภาพและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกศษหญิง พิมพ์ิกา กาญจนดำเกิง อาจารย์ประจำวิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์จัดหาสารที่ใช้ในการทดสอบในงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี ซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยดำเนินไปอย่างราบรื่น

คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และผู้ช่วยวิจัยทุกท่าน ที่ได้ให้การสนับสนุนทั้งในด้านองค์ความรู้ เครื่องมือ และอุปกรณ์ ตลอดจนความเอื้อเฟื้อในการใช้ทรัพยากรของภาควิชาอย่างเต็มที่ ครอบครัวของข้าพเจ้า โดยเฉพาะคุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ๆ ที่เป็นกำลังใจที่มั่นคงที่สุด ทั้งทางจิตใจและการดำเนินชีวิต รวมถึงคอยให้กำลังใจในทุกช่วงเวลาที่สำคัญโดยไม่มีเงื่อนไข

พี่ ๆ และเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และสนับสนุนข้าพเจ้าอย่างไม่ห่างในทุกสถานการณ์ ทั้งในยามประสบความสำเร็จและในยามที่เผชิญอุปสรรค

ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการส่งเสริมความรู้ด้านการใช้สารจากธรรมชาติในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพช่องปากในอนาคตอย่างเหมาะสม

เกษมชาติ พรหมสอน

มิถุนายน 2568

Acknowledgements

This thesis entitled "Effects of Essential Oils on the Growth and Biofilm Formation of Oral Streptococci" would not have been successfully completed without the support and assistance from many individuals. I would like to express my sincere gratitude to

Assistant Professor Dr. Kan Wongsariya, my advisor, for her invaluable guidance, constructive suggestions, and continuous encouragement throughout the research process. Her close supervision was a major driving force that enhanced the quality and completeness of this study.

Assistant Professor Dr. Pimpika Kanjanadamkerng, lecturer of Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, for kindly providing the essential substances used in this research, which significantly facilitated the smooth progress of the study.

The faculty members of the Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), the laboratory staff, and all research assistants who generously supported me with knowledge, equipment, and resources throughout the research period.

My family, especially my parents and siblings, whose unwavering support both mentally and in daily life has been my greatest source of strength, standing by me unconditionally during all important moments.

My seniors and friends, for their continuous advice, support, and companionship in every situation, both in times of success and challenges.

I sincerely hope that this thesis will contribute to the advancement of knowledge regarding the use of natural substances in controlling oral bacteria and can be further applied in developing oral health products appropriately in the future.

Kasemchart Promsorn

June 2025

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ.....	๗
สารบัญรูป.....	๘
สารบัญตาราง.....	๘
สารบัญกราฟ.....	๙
บทที่ 1	1
บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	4
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2	6
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 แบคทีเรียในช่องปาก.....	6
2.2 การก่อโรค.....	9
2.2.1 โรคฟันผุ.....	9
2.2.2 โรคปริทันต์.....	10
2.3 ไปโอฟิล์ม.....	11
2.3.2 สภาพแวดล้อม.....	13
2.4 น้ำมันหอมระเหย.....	14
2.7 Citral.....	21
2.8 Methyl chavicol : MC.....	22
บทที่ 3	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี.....	25
3.1.1 อุปกรณ์.....	25
3.1.2 สารเคมี.....	26
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	26
3.1.4 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ.....	26
3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	26
3.2.1 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC).....	26
3.2.2 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถฆ่า เชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC).....	27
3.3 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (Time Killing Assay).....	27
3.4 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของ เชื้อแบคทีเรีย.....	28
3.5 การทดสอบความสามารถของสารละลายของ citral และ methyl chavicol ในการลดการก่อตัว ของไบโอฟิล์มของสารละลาย.....	29
3.6 การทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์ม.....	29
3.7 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการชะไบโอฟิล์ม.....	30
บทที่ 4.....	32
ผล และอภิปรายผล.....	32
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	32
4.1.1 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC).....	32
4.1.2 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถฆ่า เชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC).....	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (Time Killing Assay).....	34
4.3 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	38
4.4 การทดสอบความสามารถของสารละลายของ citral และ methyl chavicol ในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์ม.....	41
4.5 การทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์ม.....	44
4.6 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการชะไบโอฟิล์ม.....	46
บทที่ 5.....	50
สรุปผลการทดลอง.....	50
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	50
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	50
เอกสารอ้างอิง.....	51
ประวัติผู้เขียน.....	59



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ limonene และ linalool (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024).....	15
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ β -caryophyllene และ zingiberene (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024)	16
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ eugenol และ anethole (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024).....	17
รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ citral (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024).....	21
รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ methyl chavicol (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024).....	23
รูปที่ 6 แสดงการเจือจางระหว่างสารละลาย methyl chavicol และสารละลาย citral	28



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ได้ของสารละลาย citral และ methyl chavicol.....	32
ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ได้ของสารละลาย citral และ methyl chavicol.....	32
ตารางที่ 3 แสดงค่าปริมาณเชื้อ (Log CFU/ml) <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ที่ลดลง ณ ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อทดสอบกับสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC 2xMIC MIC และ 1/2xMIC	34
ตารางที่ 4 แสดงค่าปริมาณเชื้อ (Log CFU/ml) <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ที่ลดลง ณ ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อทดสอบกับสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC MIC และ 1/2xMIC.....	36
ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของสารละลายผสมระหว่างสาร citral และ methyl chavicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478.....	38
ตารางที่ 6 แสดงค่า FICI ของสารละลายผสมระหว่างสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478.....	39
ตารางที่ 7 แสดงความเข้มข้นของสารละลายผสมระหว่างสาร citral และ methyl chavicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	39
ตารางที่ 8 แสดงค่า FICI ของสารละลายผสมระหว่างสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	40
ตารางที่ 9 แสดงร้อยละการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารละลาย citral	41
ตารางที่ 10 แสดงร้อยละการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารละลาย methyl chavicol	42
ตารางที่ 11 แสดงร้อยละการกำจัดแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มของสารละลาย citral ที่ความเข้มข้นต่างๆ .44	
ตารางที่ 12 แสดงร้อยละการกำจัดแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มของสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 แสดงร้อยละความสามารถในการชะไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ของสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC.....	46
ตารางที่ 14 แสดงร้อยละความสามารถในการชะไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ของสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC.....	47



สารบัญกราฟ

กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อ <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 (Log CFU/ml) กับเวลาหลังจากการทดสอบกับสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC 2xMIC MIC และ 1/2xMIC	35
กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 (Log CFU/ml) กับเวลาหลังจากการทดสอบกับสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC 2xMIC MIC และ 1/2xMIC	35
กราฟที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อ <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 (Log CFU/ml) กับเวลาหลังจากการทดสอบกับสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC MIC และ 1/2xMIC.	37
กราฟที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 (Log CFU/ml) กับเวลาหลังจากการทดสอบกับสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC MIC และ 1/2xMIC.	37
กราฟที่ 5 แสดงร้อยละความสามารถการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ของสารละลาย citral.....	42
กราฟที่ 6 แสดงร้อยละความสามารถการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ของสารละลาย methyl chavicol	43
กราฟที่ 7 แสดงร้อยละความสามารถการกำจัดแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มของสารละลาย citral	44
กราฟที่ 8 แสดงร้อยละความสามารถการกำจัดแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มของสารละลาย methyl chavicol	45
กราฟที่ 9 แสดงร้อยละความสามารถในการชะไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ของสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC	47
กราฟที่ 10 แสดงร้อยละความสามารถในการชะไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 และ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ของสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC	48

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ช่องปากถือเป็นหนึ่งในอวัยวะที่มีความหลากหลายของแบคทีเรียมากกว่า 700 สปีชีส์ โดยที่สภาวะสมดุลของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มในช่องปากมีส่วนช่วยป้องกันการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปาก แต่อย่างไรก็ตามการดูแลสุขลักษณะช่องปากที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลให้เกิดภาวะการเสียสมดุลของแบคทีเรียในช่องปาก ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม oral streptococci ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแรก ๆ ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้น (Muñoz-González et al., 2015; Diaz et al., 2015)

โรคในช่องปากส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพชีวิต และสุขภาพโดยภาพรวมในระยะยาวได้ เนื่องจากการสูญเสียฟันที่ส่งผลต่อการบดเคี้ยวอาหาร การพูด และบุคลิกภาพ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโรคติดเชื้อในช่องปาก เช่น โรคปริทันต์ อาจมีความสัมพันธ์กับโรคระบบอื่น ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน และโรคระบบทางเดินหายใจ ซึ่งเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ หรือสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในช่องปากเข้าสู่กระแสเลือด (Han & Wang, 2013; Tonetti & Van Dyke, 2013) ดังนั้น การควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปาก และการรักษาสุขอนามัยช่องปากอย่างต่อเนื่องจึงมีความสำคัญในการป้องกันโรคในช่องปาก และระบบร่างกาย

แบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* spp. โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ถือเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อโรคร้ายในช่องปาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะเริ่มต้นของโรคฟันผุ เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างกรดจากกระบวนการหมักน้ำตาล ทำให้ค่า pH บริเวณผิวฟันลดต่ำลง ซึ่งเป็นสภาวะที่เอื้อต่อการเกิดกระบวนการ demineralization ส่งผลให้เกิดการสลายแร่ธาตุของเคลือบฟัน ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดโรคฟันผุ นอกจากความสามารถในการสร้างกรดแล้ว แบคทีเรีย *S. mutans* ยังมีความสามารถในการยึดเกาะบนผิวฟันและสร้างโครงสร้างชีวภาพที่เรียกว่าไบโอฟิล์ม (biofilm) โดยใช้เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase; GTF) ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างโพลีแซ็กคาไรด์ประเภทกลูแคนจากน้ำตาลซูโครส ซึ่งกลูแคนที่ได้จะเป็นสารเหนียวที่ช่วยยึดแบคทีเรียให้ติดแน่นบนผิวฟัน ทั้งยังเป็นองค์ประกอบหลักในการก่อตัวของไบโอฟิล์ม ซึ่งไบโอฟิล์มนี้เป็นสภาพแวดล้อมเฉพาะ (niche) ที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตและอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก เมื่อไบโอฟิล์มมีการพัฒนาไปอย่างต่อเนื่อง จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบภายใน โดยมีการเพิ่มจำนวนและความหลากหลายของจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ที่เกี่ยวข้องกับโรคเหงือกและโรคปริทันต์ เช่น *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Tannerella forsythia* ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์และสารก่อการอักเสบที่ทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ และมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคปริทันต์เรื้อรัง การสะสมตัวของจุลินทรีย์เหล่านี้ในไบโอฟิล์มจะนำไปสู่ความรุนแรงของโรคในช่องปากเพิ่มมากขึ้น และหากไม่มีการควบคุมหรือรักษาอย่างเหมาะสม อาจส่งผลให้เกิดการสูญเสียฟันในระยะยาว (Chiu et al., 2021)

โดยกระบวนการก่อตัวของไบโอฟิล์มในช่องปากนั้นเริ่มต้นจาก การสร้างคราบเพลลิเคิล (pellicle) บนพื้นผิวของฟัน ซึ่งเป็นชั้นโปรตีนจากน้ำลายที่เคลือบอยู่บนเคลือบฟัน จากนั้นแบคทีเรียเริ่มยึดเกาะกับคราบเพลลิเคิลนี้ผ่านโปรตีนยึดเกาะ (adhesins) บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่ยึดเกาะได้แล้วจะเริ่มเจริญเติบโต แบ่งตัว และเริ่มสร้างสารโพลิเมอร์นอกเซลล์ (extracellular polymeric substances: EPS) ซึ่งทำหน้าที่เหมือนกาวชีวภาพช่วยในการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์แบคทีเรีย และผิวฟัน โดยการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียอย่างต่อเนื่อง และการสื่อสารระหว่างเซลล์ (quorum sensing) ทำให้เกิดโครงสร้างไบโอฟิล์มที่มีความซับซ้อน และทนทานต่อการกำจัดมากขึ้น โดยแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ถือเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มหลักที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferases: GTF) ที่จะเปลี่ยนซูโครสให้เป็นโพลิแซ็กคาไรด์สำหรับใช้ในการสร้างโครงสร้างของไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งโพลิแซ็กคาไรด์ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้นนี้ไม่เพียงแต่ทำหน้าที่ยึดเกาะตัวเซลล์แบคทีเรียไว้ด้วยกัน และยึดเกาะกับพื้นผิวฟัน แต่ยังช่วยป้องกันไม่ให้สารต้านการเจริญ หรือสารเคมีแทรกซึมเข้าไปในชั้นไบโอฟิล์มได้ง่าย ส่งผลให้แบคทีเรียภายในไบโอฟิล์มมีความทนทาน และยากต่อการกำจัดมากขึ้น นอกจากนี้องค์ประกอบในน้ำลาย โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่ผ่านการย่อยให้มีขนาดเล็กลงหลังจากการบริโภคอาหาร ก็ยังจัดเป็นแหล่งอาหารสำคัญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย การก่อตัวและการขยายตัวของไบโอฟิล์มส่งผลให้เกิดการสะสมของกรดในระดับสูงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเร่งกระบวนการการละลายแร่ธาตุจากเคลือบฟัน และก่อให้เกิดภาวะฟันผุในระยะเริ่มต้นจนถึงขั้นรุนแรง นอกจากนี้ยังเพิ่มโอกาสในการเกิดโรคปริทันต์จากการกระตุ้นกระบวนการอักเสบในเหงือก และเนื้อเยื่อปริทันต์โดยรอบ (Bowen & Koo, 2011; Lemos et al., 2019)

ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของไบโอฟิล์มในช่องปากจึงมีผลกระทบต่อสุขภาพช่องปาก เนื่องจากเป็นทั้งแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ซึ่งเป็นตัวการหลักที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรตที่ส่งผลให้เกิดการทำลายสารเคลือบฟัน และเนื้อฟันตามมา โดยกระบวนการนี้เริ่มต้นจากความสามารถของเชื้อในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก ซึ่งจะลดค่า pH ที่บริเวณผิวฟันทำให้เกิดการละลายของแร่ธาตุในเคลือบฟัน (demineralization) และนำไปสู่การพัฒนาของรอยโรคฟันผุ หากไม่มีการรักษาสุขภาพลักษณะช่องปากอย่าง

สม่ำเสมอ การควบคุมอาหาร และการใช้สารป้องกันฟันผุ จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะฟันผุอย่างรุนแรงและโรคปริทันต์ในระยะยาว (Chiu et al., 2020; Loesche, 1986; Takahashi & Nyvad, 2011)

จากผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากของประชากรไทยในช่วงอายุระหว่าง 5–85 ปี โดยสำนักทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข เมื่อปี พ.ศ. 2561 พบว่า เด็กอายุ 5 ปีมีอัตราการเกิดฟันผุสูงถึงร้อยละ 75 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการชุกของโรคฟันผุสูงที่สุด รองลงมาคือเด็กอายุ 15 ปี และ 12 ปี ซึ่งพบการชุกของโรคฟันผุที่ร้อยละ 62.7 และ 52 ตามลำดับ สำหรับกลุ่มวัยผู้ใหญ่ช่วงอายุ 35–44 ปี พบว่าปัญหาหลักคือการสูญเสียฟัน โดยมีค่าเฉลี่ยของฟันที่สูญเสียอยู่ที่ 3.6 ซึ่งต่อคน นอกจากนี้ยังพบความชุกของปัญหาอื่น ๆ ได้แก่ เหงือกอักเสบร้อยละ 62.4 รากฟันโผล่ฟันเหงือกร้อยละ 57.1 ฟันสึกร้อยละ 49.7 และร่องลึกปริทันต์ร้อยละ 25.9 ในกลุ่มผู้สูงอายุช่วงอายุ 60–74 ปี และ 80–85 ปี ปัญหาหลักยังคงเป็นการสูญเสียฟันถาวร โดยพบอัตราการสูญเสียฟันถาวรอยู่ที่ร้อยละ 56.1 และ 22.4 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีการตรวจพบภาวะปริทันต์อักเสบร้อยละ 36.3 ฟันผุที่เกี่ยวข้องกับภาวะเหงือกกร่นร้อยละ 16.5 และโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงในอัตราร้อยละ 12.2 (สำนักทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2561)

จากรายงานสถานการณ์สุขภาพช่องปากทั่วโลกขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) เมื่อปี พ.ศ. 2565 ระบุว่า โรคในช่องปากส่งผลกระทบต่อประชากรเกือบ 3.5 พันล้านคนทั่วโลก โดยกลุ่มที่ได้รับผลกระทบส่วนใหญ่มีอาศัยอยู่ในประเทศที่มีรายได้ปานกลางถึงต่ำ คิดเป็นสัดส่วนประมาณสามในสี่ของผู้ป่วยทั้งหมด ปัญหาสุขภาพช่องปากที่พบมากที่สุด ได้แก่ โรคฟันผุในฟันแท้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อประชากรกว่า 2 พันล้านคน และโรคฟันผุในฟันน้ำนมที่พบในเด็กมากกว่า 514 ล้านคน ทั้งนี้ ปัญหาเหล่านี้ล้วนมีความเกี่ยวข้องกับการก่อตัวของไบโอฟิล์มในช่องปาก ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปาก (World Health Organization, 2021)

โดยวิธีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก และการกำจัดไบโอฟิล์ม ได้แก่ การทำความสะอาดช่องปากอย่างถูกต้องสม่ำเสมอ เช่น การแปรงฟันอย่างน้อยวันละสองครั้งด้วยยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสารต้านจุลชีพ และการใช้ไหมขัดฟัน แปรงซอกฟันเพื่อกำจัดเศษอาหาร และคราบพลัคที่ติดตามซอกฟัน นอกจากนี้ยังควรใช้น้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียเพื่อเสริมการทำความสะอาดช่องปากให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มักประกอบด้วยสารต้านจุลชีพ เช่น ไตรโคลซาน ฟลูออไรด์ เซทิลเพริดีเนียมคลอไรด์ และคลอเฮกซิดีนกลูโคเนต อย่างไรก็ตาม สารเหล่านี้อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น การเปลี่ยนสีของเคลือบฟัน การเปลี่ยนแปลงการรับรส และความเสี่ยงต่อการได้รับฟลูออไรด์ในปริมาณสูงเกินไป โดยเฉพาะในเด็ก ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะฟันตกกระ (Dental Fluorosis) ได้ (Isabela de Oliveira Carvalho et al., 2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อไบโอฟิล์ม และกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในไบโอฟิล์มมีความสามารถในการปรับตัว และติดต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน รวมถึงการกำจัดไบโอฟิล์มที่มีโครงสร้างซับซ้อน และมีความทนทานสูง ทำให้การควบคุมโรคในช่องปากยังคงเป็นปัญหาเรื้อรังในประชากรจำนวนมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนา และปรับปรุงผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง โดยในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ปลอดภัยต่อผู้ใช้ และลดผลข้างเคียงระยะยาว เพื่อตอบสนองต่อความต้องการในการดูแลสุขภาพช่องปากอย่างยั่งยืน และมีประสิทธิภาพ

ซึ่งในปัจจุบัน มีแนวโน้มในการประยุกต์ใช้สารจากธรรมชาติ โดยเฉพาะสารสกัดจากพืชที่รับประทานได้ในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปากเพิ่มมากขึ้น เช่น น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืช ซึ่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น citral และ methyl chavicol โดยมีรายงานว่าสารทั้งสองชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* รวมถึงยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ การนำสารเหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปากจึงอาจเป็นทางเลือกใหม่ที่ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในช่องปาก

การศึกษานี้ให้ความสำคัญถึงการประเมินศักยภาพของสารสกัดจากธรรมชาติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการสร้างไบโอฟิล์มในช่องปากได้จริง ซึ่งจะเป็นแนวทางหนึ่งในการลดการพึ่งพาสารเคมีสังเคราะห์ อันนำไปสู่การแก้ไขปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ในระยะยาว อีกทั้งยังตอบสนองต่อแนวโน้มของผู้บริโภคที่ให้ความสำคัญกับผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และความปลอดภัยในการใช้งานมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสาร citral และ methyl chavicol
- 2) เพื่อศึกษาผลของสาร citral และ methyl chavicol ต่อความสามารถในการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรคในช่อง *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- 3) เพื่อศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ระหว่างสาร citral และ methyl chavicol ในการยับยั้งการเจริญ และก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อของสาร ความสามารถในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์ม และความสามารถในการเสริมฤทธิ์ของสาร citral และ methyl chavicol ต่อแบคทีเรีย เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสาร citral และ methyl chavicol
- 2) ทราบถึงความสามารถในการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และความสามารถในการกำจัดเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์มของสาร citral และ methyl chavicol
- 3) ทราบถึงประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ในการต้านการเจริญ และการกำจัดแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสาร citral และ methyl chavicol

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียในช่องปาก

ช่องปากเป็นอวัยวะที่เอื้อต่อการตั้งถิ่นฐานและเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่เอื้อต่อการเจริญรวมถึงมีแหล่งสารอาหารอย่างต่อเนื่องจากอาหารที่บริโภคและน้ำลาย จึงทำให้ช่องปากกลายเป็นระบบนิเวศที่ซับซ้อน โดยปกติแล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้อยู่ร่วมกันภายใต้ภาวะสมดุล ซึ่งช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในช่องปาก อันเนื่องมาจากการดูแลสถานะของช่องปากที่ไม่เหมาะสม การรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลในปริมาณสูง หรือการลดลงของแบคทีเรียชนิดที่เป็นประโยชน์ อาจนำไปสู่ภาวะเสียสมดุลของจุลินทรีย์ (microbial dysbiosis) ซึ่งเอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรค ในภาวะดังกล่าว แบคทีเรียหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในช่องปากจะเริ่มเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่น *Actinomyces naeslundii* และ *Actinomyces viscosus* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีบทบาทในการเริ่มต้นการสร้างไบโอฟิล์มและฟันผุบริเวณรากฟัน *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในระยะแรกของการเกิดฟันผุ โดยอาศัยความสามารถในการหมักน้ำตาลเป็นกรด และทนต่อสภาวะความเป็นกรด นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจน เช่น *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งเป็นเชื้อสำคัญในโรคปริทันต์เรื้อรัง *Treponema denticola* ซึ่งเป็นเชื้อรูปเกลียวที่สัมพันธ์กับการอักเสบรุนแรง และ *Fusobacterium nucleatum* ซึ่งมีบทบาทในการเป็นตัวกลางเชื่อมแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ภายในไบโอฟิล์มและเร่งการอักเสบของเหงือก (Carvalho et al., 2020) เชื้อในกลุ่ม oral streptococci โดยเฉพาะ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ถือเป็นแบคทีเรียกลุ่มแรกที่สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้กลไกการยึดกับโปรตีนในเยื่อหุ้มผิวฟัน (pellicle) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการก่อตัวของไบโอฟิล์ม จากนั้นเชื้อเหล่านี้จะเริ่มสร้างโครงสร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ที่เรียกว่า exopolysaccharides โดยเฉพาะกลูแคนที่ได้จากการย่อยซูโครส ซึ่งช่วยให้เกิดการยึดเกาะกันระหว่างเชื้อและสร้างโครงสร้างสามมิติที่ซับซ้อนขึ้น กระบวนการนี้เอื้อต่อการตั้งรกรากของเชื้ออื่น ๆ เช่น *Prevotella intermedia* และ *Tannerella forsythia* ซึ่งล้วนเป็นเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเหงือกและโรคปริทันต์ในระยะยาว (Lu et al., 2019)

2.2 Oral Streptococci

แบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* spp. ที่อาศัยอยู่ในช่องปาก หรือที่เรียกอีกชื่อว่า oral streptococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างทรงกลมหรือรูปไข่ เรียงตัวเป็นสาย มีความหลากหลายทางชีวภาพ และมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศของช่องปาก โดยจัดเป็นกลุ่มประชากรหลักของจุลินทรีย์ในช่องปาก และมีบทบาทสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์มบน ผิวฟัน เหงือก และเยื่อเมือก (Lemos et al.,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2019) แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม facultative anaerobes และสามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการหมัก ได้ผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก (Takahashi & Nyvad, 2011) ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้แก่ ความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และชนิดของสารอาหาร โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 35–37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6.5–7.5 ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถทนกรดได้มากกว่านี้ (Loesche, 1986) คุณสมบัติเด่นของแบคทีเรีย oral streptococci คือความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวในช่องปาก โดยเฉพาะบริเวณเคลือบฟันและเยื่อเมือก กลไกการยึดเกาะเกี่ยวข้องกับโปรตีนบนผิวเซลล์ เช่น adhesins และองค์ประกอบของแคปซูลหรือโพลิแซ็กคาไรด์ที่ช่วยในการสร้างไบโอฟิล์ม (Bowen & Koo, 2011; Chiu et al., 2021) โดยไบโอฟิล์มที่เชื้อกลุ่มนี้สร้างขึ้นประกอบด้วยสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular polymeric substances: EPS) รวมถึงโปรตีน, ดีเอ็นเอภายนอกเซลล์ (eDNA) และโพลิแซ็กคาไรด์ที่ช่วยให้เชื้อสามารถคงสภาพและสื่อสารกันภายในชุมชนแบคทีเรีย (Flemming & Wingender, 2010) นอกจากนี้ เชื้อในกลุ่มนี้ยังสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลากหลาย โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ซึ่งถูกย่อยผ่านเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตเอง เช่น กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase, GTF) และฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรส (fructosyltransferase, FTF) ซึ่งทำให้เกิดการผลิตกรดอินทรีย์จากกระบวนการหมัก (Bowen & Koo, 2011) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การเพิ่มจำนวนของเชื้อกลุ่มนี้สามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว โดยมี generation time อยู่ในช่วง 30–60 นาที (Han & Wang, 2013)

2.2.1 *Streptococcus sobrinus*

Streptococcus sobrinus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (coccus) เรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35–37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) โดยเฉพาะในสภาพที่มี pH ค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 6.3) (Abranches et al., 2018; Sato et al., 2013) เชื้อนี้จัดเป็นหนึ่งในแบคทีเรียกลุ่ม oral streptococci ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคฟันผุในมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเพิ่มจำนวนบริเวณผิวฟันที่มีคราบอาหารหรือน้ำตาลสะสม การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย *S. sobrinus* ยังมีส่วนสำคัญในการสร้างสภาวะที่เอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ (anaerobes) เช่น *Porphyromonas gingivalis* และ *Fusobacterium nucleatum* ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์ (Flemming et al., 2016; Han & Wang, 2013) เชื้อ *S. sobrinus* มีความสามารถในการหมักน้ำตาล เช่น กลูโคส และซูโครส เพื่อให้ได้พลังงานผ่านกระบวนการ fermentation แบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยมีกรดแลกติกเป็นผลพลอยได้หลัก ส่งผลให้ช่องปากมีสภาวะเป็นกรด เป็นผลให้เกิดกระบวนการสลายแร่ธาตุของเคลือบฟันยังเป็นกลไกสำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคฟันผุ (Takahashi & Nyvad, 2011) นอกจากนี้ แบคทีเรีย *S. sobrinus* ยังมีศักยภาพในการสร้างไบโอฟิล์มที่แข็งแรง โดยอาศัยโปรตีนจำเพาะของผิว

เซลล์ (adhesins) และการผลิตโพลีแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ (EPS) ผ่านเอนไซม์ไกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (GTF) ซึ่งไปโอฟิล์มที่สร้างขึ้นนั้นมีบทบาทสำคัญที่ก่อให้เกิดการรวมตัวกับแบคทีเรียชนิดอื่นในช่องปาก เช่น *S. mutans* และ *Actinomyces* spp. ทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมชีวภาพแบบหลายชนิดที่ยึดเกาะผิวฟันแน่นหนา (Bowen & Koo, 2011; Lemos et al., 2019) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว แบคทีเรีย *S. sobrinus* จึงจัดเป็นหนึ่งในแบคทีเรียก่อโรคหลักในช่องปากที่ควรให้ความสำคัญในการศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีควบคุมหรือกำจัดเชื้อในผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากจากธรรมชาติ

2.2.2 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (coccus) จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และสามารถดำรงชีวิตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) โดยเจริญได้ดีที่สุดในอุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดค่อนข้างต่ำ (pH ประมาณ 6.3) (Abranches et al., 2018; Sato et al., 2013) แบคทีเรียชนิดนี้ถือเป็นหนึ่งในแบคทีเรียก่อโรคหลักในช่องปากของแบคทีเรียในกลุ่ม oral streptococci ที่เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดโรคฟันผุ โดยเฉพาะในระยะเริ่มต้นของการสร้างไบโอฟิล์มบนผิวฟัน กลไกการก่อโรคของแบคทีเรีย *S. mutans* เกิดจากความสามารถในการหมักน้ำตาล เช่น ซูโครส และกลูโคส เพื่อผลิตพลังงานโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน และได้กรดอินทรีย์ โดยเฉพาะกรดแลกติกเป็นผลพลอยได้หลัก ซึ่งมีบทบาทในการลด pH ในช่องปากและผิวฟัน ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสลายแร่ธาตุของเคลือบฟัน อันนำไปสู่การเกิดโรคฟันผุ (Takahashi & Nyvad, 2011) นอกจากนี้แบคทีเรีย *S. mutans* ยังมีศักยภาพในการสร้างไบโอฟิล์ม โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (GTF) ในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้กลายเป็นโพลีแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ (EPS) เช่น เดกซ์แทรน ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะบนผิวฟันได้อย่างเหนียวแน่น และสร้างโครงสร้างเมทริกซ์ของไบโอฟิล์มที่ป้องกันแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Bowen & Koo, 2011) ทั้งนี้แบคทีเรีย *S. mutans* ยังแสดงความสามารถในการรวมตัวกับแบคทีเรียในช่องปากชนิดอื่น เช่น *S. sobrinus* และ *Actinomyces* spp. ในการสร้างนิเวศน์ภายใต้ไบโอฟิล์มที่มีการอาศัยร่วมกันของแบคทีเรียหลายชนิด (multispecies biofilm) (Lemos et al., 2019) อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *S. mutans* มีโครงสร้างของโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการยึดติดกับพื้นผิวฟันในระยะเริ่มต้นของการสร้างไบโอฟิล์ม (Zhu et al., 2006) ความสามารถทั้งหมดนี้ ไม่เพียงแต่ทำให้แบคทีเรีย *S. mutans* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการก่อฟันผุเท่านั้น แต่ยังเอื้อให้แบคทีเรียชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์ เช่น *Fusobacterium nucleatum* และ *Porphyromonas gingivalis* สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนภายใต้ไบโอฟิล์มได้ง่ายยิ่งขึ้น (Han & Wang, 2013) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ *S. mutans* จึงเป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักของการวิจัยด้านการป้องกันโรคในช่องปาก โดยเฉพาะการพัฒนาสารต้านจุลชีพจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธรรมชาติ เช่น น้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดจากพืช ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Carvalho et al., 2020; Wongsariya et al., 2024)

2.2 การก่อโรค

2.2.1 โรคฟันผุ

โรคฟันผุ (Dental caries) คือกระบวนการทำลายเนื้อฟันที่เกิดจากการสะสม และกิจกรรมของแบคทีเรียในช่องปาก โดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* spp. เช่น *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญ และเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาของโรคฟันผุ (Kuramitsu et al., 2018) เมื่อเวลาผ่านไปร่องรอยการก่อตัวของโรคสามารถขยายจากเคลือบผิวฟันด้านนอก ลุกกลามไปยังเนื้อฟันที่อยู่ลึกลงไป และหากไม่ได้รับการรักษา อาจกระจายไปถึงโพรงประสาทฟัน ไกล่รากฟัน หรือแม้กระทั่งเข้าสู่กระแสเลือดได้

โดยฟันผุเกิดจากแบคทีเรียที่อาศัยบนผิวฟันซึ่งสามารถใช้น้ำตาล และโปรตีนจากเศษอาหารที่อยู่ในช่องปากเป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แบคทีเรียจะเจริญ และเพิ่มจำนวน แล้วสร้างไบโอฟิล์ม โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ glucosyltransferases (GTFs) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้กลายเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ เช่น เดกซ์แทรน ที่มีส่วนช่วยให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับผิวฟันได้แน่นหนา (Lemos et al., 2019) และนอกจากนี้กรดที่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปากจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่องปากและบนผิวฟันลดต่ำลงจนถึงระดับที่เคลือบฟันเริ่มสลายตัว (ต่ำกว่า 5.5) เมื่อฟันถูกทำลายเกิดเป็นโพรง หรือรูในฟันที่เรียกว่า ฟันผุ (Bowen & Koo, 2011) เมื่อไบโอฟิล์มสะสมตัวมากขึ้น จะพัฒนาเป็นคราบพลัค (plaque) และหากไม่ได้รับการกำจัด จะกลายเป็นหินปูน (calculus) ซึ่งเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์หลายสกุล เช่น *Streptococcus* sp. และ *Actinomyces* sp. ที่ยิ่งเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดฟันผุ และการเกิดโรคปริทันต์อันนำไปสู่การสูญเสียฟันที่สุด

โดยพฤติกรรมการบริโภคอาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญ อาหารที่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุได้แก่: น้ำอัดลม และเครื่องดื่มรสหวานหรือมีกรด ลูกอม เค้ก ขนมกรุบกรอบ อาหารเหนียวติดฟัน เช่น คาราเมล ข้าวหลาม การบริโภคอาหารเหล่านี้ในปริมาณมาก และโดยเฉพาะในช่วงเวลาที่ไม่มีการทำความสะอาดช่องปาก จะเร่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการสร้างกรดในช่องปาก ทำให้เกิดฟันผุได้ง่ายยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย *S. mutans* และ *S. sobrinus* อย่างต่อเนื่อง ยังเป็นสัญญาณของความเสี่ยงต่อโรคฟันผุเรื้อรัง เนื่องจากทั้งสองชนิดสามารถทนกรดและสร้างไบโอฟิล์มที่เหนียวแน่นมากกว่าสายพันธุ์อื่น ทำให้การทำความสะอาดโดยทั่วไปไม่เพียงพอในการกำจัดเชื้อเหล่านี้

2.2.2 โรคปริทันต์

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นภาวะการติดเชื้อเรื้อรังในช่องปากที่มีผลกระทบต่อเนื้อเยื่อ และโครงสร้างบริเวณรอบฟัน ได้แก่ เหงือก เอ็นยึดฟัน และกระดูกขากรรไกร โดยมีพัฒนาการเริ่มต้นจากโรคเหงือกอักเสบ (gingivitis) ซึ่งเป็นการอักเสบที่จำกัดอยู่เฉพาะบริเวณเหงือกก่อนจะลุกลามลึกลงไปสู่โครงสร้างที่รองรับตัวฟัน จนกลายเป็นโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) ซึ่งหากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม อาจนำไปสู่การสูญเสียฟันอย่างถาวร (Kinane et al., 2017) กลไกการเกิดโรคปริทันต์เริ่มต้นจากการสะสมไบโอฟิล์มบนผิวฟัน ซึ่งเป็นชั้นที่มีการสะสมของแบคทีเรียหลากหลายชนิดซึ่งมีความซับซ้อน โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น *Porphyromonas gingivalis* *Treponema denticola* และ *Tannerella forsythia* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน บริเวณร่องเหงือกลึก แบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตสารชีวโมเลกุลที่มีผลกระทบต่อเซลล์ และเนื้อเยื่อรอบฟัน เช่น lipopolysaccharide (LPS) protease lipoteichoic acid และกรดอินทรีย์ ซึ่งกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้เกิดการอักเสบในเนื้อเยื่อ (Graves et al., 2019) เมื่อเกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการกำจัดจะทำให้แบคทีเรียเกิดการลุกลามลงไปยังเอ็นยึดฟัน และกระดูกขากรรไกร ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญในการพยุงฟันให้อยู่ในเบ้าฟัน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อ เช่น matrix metalloproteinases (MMPs) และ cathepsins ที่ผลิตโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเซลล์เนื้อเยื่อที่ได้รับผลกระทบ เช่น นิวโทรฟิล มาโครฟาจ และเซลล์เยื่อบุโพรงปากที่เกิดการอักเสบ โดยจะส่งเสริมการสลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูก ทำให้เหงือกร่น ฟันโยก และอาจนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด (Hajishengallis, 2014) นอกจากนี้ แบคทีเรียและสารพิษที่สร้างขึ้นยังสามารถเข้าสู่กระแสเลือด และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในอวัยวะ และเนื้อเยื่อหลายแห่งในร่างกาย (systemic inflammation) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโรคเรื้อรังอื่น เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน และภาวะแทรกซ้อนในการตั้งครรภ์ (Tonetti et al., 2013)

ในช่วงเริ่มต้นของการเกิดไบโอฟิล์ม แบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของฟันผุ ก็มีบทบาทสำคัญในการสร้างสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการก่อโรคในปริทันต์ แม้ว่าทั้งสองชนิดจะไม่ใช่อุบัติเหตุหลักในการก่อโรคปริทันต์โดยตรงแต่แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญได้ดีในสภาวะเป็นกรด (aciduric) และผลิตกรด (acidogenic) จากการย่อยสลายน้ำตาล พวกมันยังผลิตเอนไซม์ glucosyltransferases (GTFs) เพื่อสร้างกลูแคน ซึ่งเป็นสารเหนียวที่ช่วยยึดแบคทีเรียเข้ากับผิวฟัน และกับจุลชีพอื่น ทำให้โครงสร้างไบโอฟิล์มมีความหนาแน่น และซับซ้อน ส่งเสริมให้แบคทีเรียก่อโรคอื่น เช่น *P. gingivalis* สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Bowen & Koo, 2011) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แสดงว่าแบคทีเรีย *S. mutans* สามารถผลิตโปรตีนจำเพาะ เช่น SpaP และ glucan-binding proteins (Gbps) ซึ่งช่วยในการยึดเกาะกับคอลลา

เจน และเซลล์เยื่อบุเหงือก ส่งผลให้สามารถรุกรานเยื่อบุปริทันต์ได้ในกรณีที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน หรือภาวะเสียสมดุลของจุลชีพในช่องปาก (Nobbs et al., 2009) การผลิตกรดของเชื้อดังกล่าวยังมีผลทำให้ค่า pH ในไบโอฟิล์มลดต่ำลง เกิดภาวะเครียดต่อเซลล์เหงือก และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic low-grade inflammation) ซึ่งเป็นสภาวะที่เอื้อต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพในร่องเหงือกจากชนิดไม่ก่อโรค (commensals) ไปสู่ชนิดที่ก่อโรค (pathogens) (Lamont et al., 2018; Hajishengallis, 2014) โดยปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการเกิด และความรุนแรงของโรคปริทันต์ ได้แก่ พฤติกรรมการดูแลสุขภาพลักษณะในช่องปากที่ไม่เหมาะสม การสูบบุหรี่ โรคเบาหวาน ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ความเครียด และพันธุกรรม ซึ่งสามารถส่งผลต่อการตอบสนองของร่างกายต่อจุลชีพในช่องปาก (Pihlstrom et al., 2005)

2.3 ไบโอฟิล์ม

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) เป็นโครงสร้างที่เกิดจากกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่รวมตัว และยึดเกาะกันบนพื้นผิวที่มีชีวิต หรือไม่มีชีวิต โดยถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเอง โครงสร้างนี้มีชื่อว่า Extracellular Polymeric Substances (EPS) ซึ่งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก (Flemming & Wingender, 2010) โครงสร้าง EPS ไม่เพียงช่วยในการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิว และระหว่างเซลล์ด้วยกันเท่านั้น แต่ยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันสิ่งคุกคามจากภายนอก เช่น ยาปฏิชีวนะ สารฆ่าเชื้อ หรือการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม การสร้างไบโอฟิล์มเป็นกระบวนการหลายขั้นตอน ซึ่งจุลินทรีย์จะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มยึดเกาะจนถึงการสลายตัวของไบโอฟิล์ม กระบวนการนี้แบ่งออกได้เป็น 5 ระยะเวลาสำคัญ

เริ่มจากการยึดเกาะเบื้องต้น (Initial Attachment) เป็นระยะแรกที่จุลินทรีย์ลอยอิสระ (planktonic form) เข้ามาสัมผัส และเริ่มยึดเกาะกับพื้นผิว โดยแรงที่มีบทบาทสำคัญในระยษะนี้ คือแรงทางกายภาพและเคมี เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals forces) และแรงทางไฟฟ้าสถิต การยึดเกาะในช่วงแรกยังไม่ถาวร จุลินทรีย์สามารถหลุดออกจากพื้นผิวได้ง่ายหากสภาพแวดล้อมไม่เอื้ออำนวย

จากนั้นจะเริ่มมีการยึดเกาะอย่างถาวร (irreversible attachment) บนพื้นผิวที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต จะมีการหลั่งสาร EPS เพื่อเสริมความมั่นคงของการยึดเกาะ จุลินทรีย์ในระยษะนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน เช่น ในกรณีของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* จะมีการผลิตเอนไซม์ในตระกูลกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferases; GTFs) ที่เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน *GtfB* *GtfC* และ *GtfD* เพื่อสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดกลูแคนจากน้ำตาลกลูโคส ซึ่งช่วยยึดเซลล์เข้าด้วยกัน และกับพื้นผิวฟัน (Lemos et al., 2019) ในกลุ่ม GTFs ยีน *GtfB* มีหน้าที่สังเคราะห์กลูแคนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งประกอบด้วยพันธะแบบ α (1 \rightarrow 3)-glucan เป็นหลัก ทำให้มีความเหนียวและแข็งแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วยเสริมความมั่นคงของโครงสร้างไบโอฟิล์ม ยีน *GtfC* สามารถสร้างได้ทั้งกลูแคนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ โดยมีพันธะแบบผสมทั้ง α (1 \rightarrow 3) และ α (1 \rightarrow 6) ทำให้มีความยืดหยุ่นในการเชื่อมโยงระหว่างโครงสร้างภายในไบโอฟิล์ม ส่วนยีน *GtfD* จะผลิตกลูแคนที่ละลายน้ำได้เป็นหลัก เช่น dextran ซึ่งมีพันธะ α (1 \rightarrow 6)-glucan เป็นองค์ประกอบสำคัญ โดยกลูแคนที่ผลิตโดย GTFs เหล่านี้จะเป็นส่วนประกอบสำคัญของ EPS ที่เป็นโครงสร้างหลักของไบโอฟิล์ม และยังช่วยให้แบคทีเรียสามารถยึดติดกับพื้นได้แน่นหนา

หลังจากนั้นจะเกิดการรวมตัว และมีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย รวมถึงมีการขยายตัวของไบโอฟิล์ม โดยโครงสร้างของไบโอฟิล์มจะมีลักษณะเป็นโครงสร้างสามมิติ ซึ่งจะมีช่องว่างภายใน ซึ่งทำหน้าที่ลำเลียงน้ำ และสารอาหารสู่เซลล์ชั้นลึก และยังช่วยกำจัดของเสียออกจากโครงสร้าง นอกจากนี้ยังพบว่ามี การสื่อสารระหว่างกลุ่มเชื้อภายในไบโอฟิล์มผ่าน quorum sensing เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนร่วมกัน (Parsek & Greenberg, 2005)

หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่มีการขยายตัวของไบโอฟิล์มจนไปถึงระยะที่มีการขยายตัวเต็มที่ (Biofilm Maturation) ในระยะนี้ไบโอฟิล์มจะมีโครงสร้างซับซ้อนมากขึ้น โดยประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่น การผลิตเมทริกซ์ การย่อยสารอาหาร หรือการสร้างสารต้านทานพวกสารต้านจุลชีพ ซึ่งช่วยให้ไบโอฟิล์มมีเสถียรภาพ และสามารถต้านทานต่อการฆ่าเชื้อ หรือการโจมตีจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพนอกจากเอนไซม์ GTFs แล้วแบคทีเรีย *S. mutans* ยังมีโปรตีนที่จับกับกลูแคนอย่างจำเพาะ (glucan-binding proteins; Gbps) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างและคงอยู่ของไบโอฟิล์ม โดยโปรตีน GbpA จะจับกับกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำและช่วยเสริมการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิวและโปรตีน GbpB มีบทบาทช่วยเสริมสร้างความคงทนของโครงสร้างเซลล์รวมถึงโปรตีน GbpC มีความสามารถในการยึดเกาะกับกลูแคนทั้งที่ละลายและไม่ละลายน้ำ ในขณะที่ GbpD มีบทบาทสำคัญในการควบคุมความสมดุลและการกระจายตัวของโครงสร้างไบโอฟิล์ม (Bowen & Koo, 2011; Zhu et al., 2006)

ระยะสุดท้ายคือระยะการสลายตัว และแพร่กระจาย (dispersion) เมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลง เช่น มีสารอาหารลดลง การเปลี่ยน pH หรือการสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อ จุลินทรีย์บางส่วนจะกระจายตัวออกจากโครงสร้างไบโอฟิล์มและกลับไปสู่ภาวะ planktonic เพื่อแพร่กระจายและเริ่มกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มใหม่ในพื้นที่อื่น กระบวนการนี้จึงมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของการติดเชื้อ (Kaplan, 2010)

ในบริบทของสุขภาพช่องปาก ไบโอฟิล์มที่พบบ่อยคือแผ่นคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ และโรคปริทันต์แบคทีเรีย *Streptococcus mutans* เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญซึ่งสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย *S. mutans* มีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ และสารฆ่าเชื้อ

ได้มากกว่ารูปแบบเซลล์ลอยอิสระหลายเท่า ทำให้เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการติดเชื้อเรื้อรังในช่องปาก ปัจจัยภายนอกที่ส่งผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ ความชื้น อุณหภูมิที่เหมาะสม ค่า pH ต่ำ และการได้รับน้ำตาลอย่างต่อเนื่อง ซึ่งส่งเสริมให้จุลินทรีย์ผลิตกลูแคนได้มากขึ้น และเพิ่มความแข็งแรงของไบโอฟิล์ม (Koo et al., 2013)

2.3.2 สภาพแวดล้อม

ความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วและรุนแรงของแบคทีเรียในกลุ่ม oral streptococci ถือเป็นคุณลักษณะที่สำคัญที่เอื้อต่อการอยู่รอดและการเป็นสาเหตุของโรคฟันผุในมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่ำ อันเนื่องมาจากกรดที่แบคทีเรียผลิตขึ้นจากการหมักของคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะกรดแลคติกที่สามารถลด pH บริเวณผิวฟันลงอย่างมาก (กระทรวงสาธารณสุข, 2560; Carvalho et al., 2020)

นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยภายนอกอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ในช่องปาก ได้แก่ ความชื้นสูง อุณหภูมิที่เหมาะสม (35–37 °C) ค่า pH ต่ำ และการมีน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะซูโครส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ของไบโอฟิล์ม (กลุ่มวิจัยนวัตกรรมตรวจวินิจฉัยเชื้อดื้อยา, 2561) สภาวะเหล่านี้ไม่เพียงแต่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. mutans* เท่านั้น แต่ยังเอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น เช่น *Porphyromonas gingivalis* และ *Fusobacterium nucleatum* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในโรคปริทันต์ (Han & Wang, 2013)

แบคทีเรียอย่าง *S. mutans* และ *S. sobrinus* ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการเกิดโรคฟันผุ สามารถดำรงอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดเหล่านี้ ผ่านกลไกหลายประการ เช่น การรักษาความเป็นกลางภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic buffering) และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะการเพิ่มสัดส่วนของกรดไขมันสายยาว และการผลิตฟอสโฟลิพิดชนิดคาร์ดิโอไลพิน (cardiolipin) ซึ่งช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ภายใต้ความเป็นกรดสูง ทั้งนี้เอนไซม์สำคัญอย่าง cardiolipin synthase (Cls) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นในการต้านทานความเป็นกรด หากเกิดการสูญเสียการทำงานของ Cls จะทำให้เซลล์ไวต่อกรด และเสียหายได้ง่าย (Lemos et al., 2019)

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สนับสนุนการสร้างไบโอฟิล์มและการอยู่รอดของเชื้อในช่องปากเหล่านี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาวิธีเพื่อควบคุมหรือป้องกันโรคในช่องปาก โดยเฉพาะการเลือกใช้สารธรรมชาติ เช่น น้ำมันหอมระเหย หรือสารต้านจุลชีพจากพืช ซึ่งเริ่มมีบทบาทมากขึ้นในการออกฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์ม และลดความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรีย (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553; Badr et al., 2021)

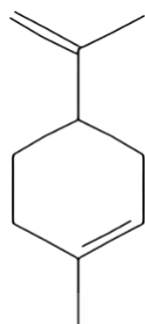
2.4 น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยจัดเป็นสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนโดยพืชจะสร้างขึ้น เพื่อใช้ในการดึงดูดแมลง และใช้ในการป้องกันตัวจากศัตรูพืช เช่น แมลง แבקทีเรีย หรือเชื้อราก่อโรค (หาชัย, 2558; สุวิมล ทองแกมแก้ว และคณะ, 2559) โดยพืชเหล่านี้จะมีเซลล์พิเศษ ต่อม หรือท่อ ได้แก่

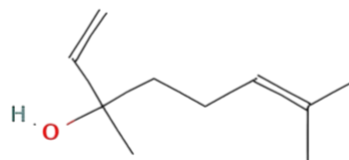
1. เซลล์น้ำมัน (Oil cells) หรือเซลล์เรซิน (Resin cells) พบได้จากพืชวงศ์อบเชย พืชวงศ์ขิง พืชวงศ์พริกไทยและพืชวงศ์จันทน์เทศ
 2. โพรงเก็บน้ำมัน (Oil cavities) หรือถุงน้ำมัน (Oil sacs) พบได้จากพืชวงศ์ส้ม และพืชวงศ์ชมพู
 3. ช่องเก็บน้ำมัน (Oil canals) หรือช่องเก็บเรซิน (Resin canals) พบได้จากพืชวงศ์ผักชี และพืชวงศ์สน
 4. ท่อเก็บน้ำมัน (Oil ducts) พบได้จากพืชวงศ์ Asteraceae เช่น คาโมไมล์
 5. ขนต่อม (Glandular hairs) พบได้จากพืชวงศ์กะเพรา
 6. ขนภายใน (Internal hairs) พบได้จากพืชวงศ์กล้วยไม้
 7. บริเวณเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ รอบพาราเรโนโคมา (Parenchyma) หรือ Idioblast พบได้จากพืชวงศ์จำปา
- เซลล์พิเศษที่ได้กล่าวมาทำหน้าที่ในการสร้าง และกักเก็บน้ำมันหอมระเหย โดยต่อมน้ำมันที่เห็นได้ชัดที่สุดจะอยู่ที่ส่วนของใบ และเปลือก และพบได้ตามส่วนต่างๆของพืช เช่น ราก ลำต้น ดอก ผล เมล็ด เป็นต้น (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553) น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีความหลากหลาย โดยองค์ประกอบหลักมักเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีนส์ (terpene) ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $(C_5H_8)_n$ terpenes เป็นกลุ่มสารที่พบได้ทั่วไปในน้ำมันหอมระเหย มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นไอโซพรีน (isoprene units) โดยอาจอยู่ในรูปแบบของ monoterpenes sesquiterpenes หรือ diterpenes ซึ่งมีความหลากหลายทางเคมีสูง สารกลุ่มนี้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไบโอฟิล์ม (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553; กระทรวงสาธารณสุข, 2560) ซึ่งสามารถแยกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่

โมนอเตอร์พีนส์ (Monoterpenes)

โมนอเตอร์พีนเป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนจำนวน 10 อะตอม ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของหน่วยไอโซพรีน (isoprene units) จำนวน 2 หน่วย โดยสามารถจัดเรียงได้ทั้งในรูปแบบวงอะโรมาติก เช่น limonene ซึ่งพบมากในผิวของส้มและมะนาว และแบบสายตรง (acyclic) เช่น β -myrcene และ linalool ซึ่งพบในลาเวนเดอร์และใบโหระพา เป็นต้น (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553)



limonene



linalool

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ limonene และ linalool (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024)

น้ำมันหอมระเหยที่มีสารกลุ่มนี้มักแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการ อาทิ การกระตุ้นระบบประสาท การลดความเครียด และที่สำคัญคือความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ผิดปกติเกิดกระบวนการ apoptosis ซึ่งเป็นการตายของเซลล์โดยไม่กระตุ้นการอักเสบ (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553)

นอกจากนี้ กลุ่มสารโมโนเทอร์พีนยังมี ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ อย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียได้โดยตรง เช่น limonene และ linalool มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด อาทิ *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และ *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในร่างกายและในช่องปาก (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553; Badr et al., 2021; Andrés Martínez et al., 2021)

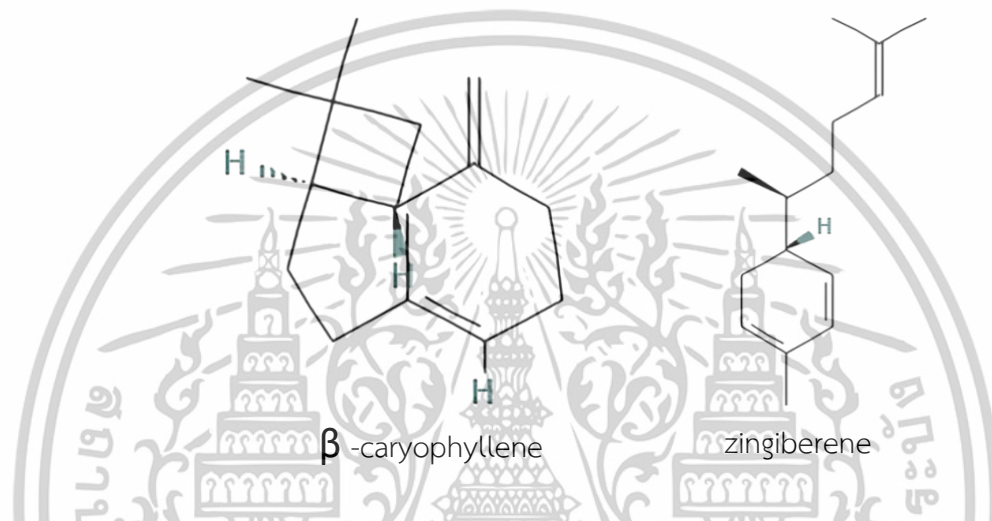
กลไกการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้ต่อจุลชีพส่วนใหญ่มาจากความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ แล้วเปลี่ยนแปลงความสามารถในการควบคุมการแพร่ของสารผ่านเยื่อหุ้ม ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบสำคัญในเซลล์ เช่น ATP และไอออนต่าง ๆ นำไปสู่การหยุดชะงักของกระบวนการเมแทบอลิซึมและการตายของเซลล์ในที่สุด (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553; Gill & Holley, 2006; Helander et al., 1998)

เสสควิเทอร์พีนส์ (Sesquiterpenes)

เสสควิเทอร์พีนส์เป็นกลุ่มสารประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่มีโครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เกิดจากการรวมตัวของหน่วยไอโซพรีน (isoprene) จำนวน 3 หน่วย โดยทั่วไปพบในรูปแบบของสารระเหยที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าโมโนเทอร์พีนส์ (monoterpenes) ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ β -caryophyllene ซึ่งพบได้มากในน้ำมันหอมระเหยจากฝรั่ง และ zingiberene ซึ่งเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553; National Center for Biotechnology Information, 2024) กลุ่มสารเสสควิเทอร์พีนส์มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ช่วยในการผ่อนคลาย และลดความตึงเครียดของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะ β -caryophyllene ซึ่งมีรายงานว่าสามารถจับกับตัวรับ cannabinoid type 2 (CB2 receptor) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการลดการอักเสบและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553)



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ β -caryophyllene และ zingiberene (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024)

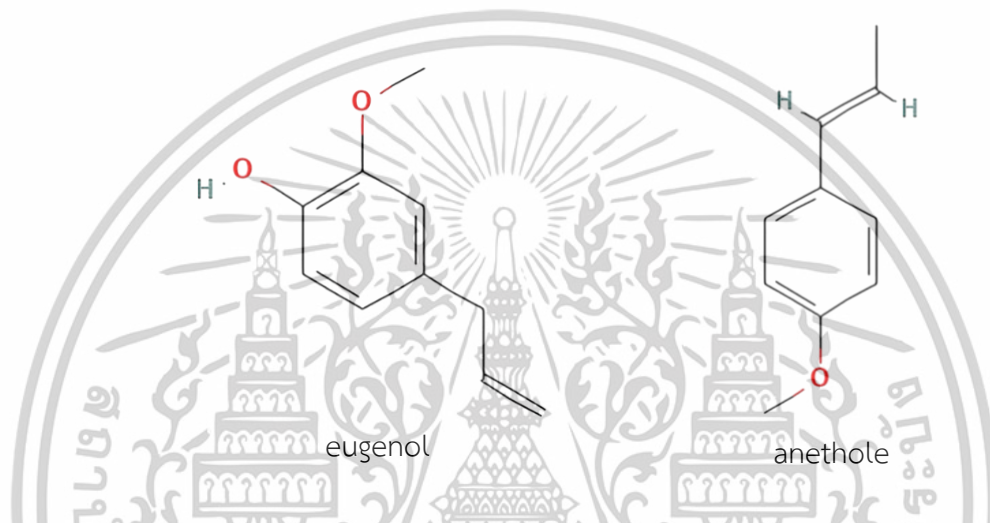
นอกจากฤทธิ์ต้านการอักเสบแล้ว เสสควิเทอร์พีนส์ยังมีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและในช่องปาก โดยสาร β -caryophyllene และ zingiberene มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus mutans* ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคในช่องปาก เช่น โรคฟันผุและโรคปริทันต์ โดยสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพผ่านกลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย และรบกวนความสมดุลของเอนไซม์ภายในเซลล์ (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553; กลุ่มวิจัยนวัตกรรมตรวจวินิจฉัยเชื้อดื้อยา, 2561; กระทรวงสาธารณสุข, 2560)

จากคุณสมบัติทางชีวภาพดังกล่าว ทำให้สารในกลุ่มเสสควิเทอร์พีนส์ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปาก และเครื่องสำอางต้านจุลชีพ โดยเฉพาะในรูปแบบของน้ำยาบ้วนปากหรือเจลฆ่าเชื้อ ซึ่งอาจมีศักยภาพในการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มในช่องปาก อันเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคฟันผุ และโรคเหงือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟีนิลโพรพิเนส (Phenylpropenes)

ฟีนิลโพรพิเนสเป็นกลุ่มสารในน้ำมันหอมระเหยที่มีโครงสร้างทางเคมีหลักเป็นวงอะโรมาติก (Aromatic) ต่อกับโซ่ข้างที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนจำนวน 3 อะตอม ตัวอย่างที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ Eugenol ซึ่งพบมากในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู และ Cinnamic aldehyde ซึ่งพบในน้ำมันอบเชยจีนและอบเชยลังกา นอกจากนี้ยังมี Anethole และ Estragole ซึ่งพบได้ในน้ำมันหอมระเหยจากต้นจันทร์เทศและโหระพา (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553)



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ eugenol และ anethole (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024)

น้ำมันหอมระเหยกลุ่มฟีนิลโพรพิเนสมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ เช่น ลดการอักเสบ แก้อาการเกร็งของกล้ามเนื้อ และที่สำคัญคือมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะต่อเชื้อแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคในช่องปาก (Burt, 2004; Bassolé & Juliani, 2012) eugenol มีความสามารถในการแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการรั่วของสารภายในเซลล์ และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (Gill & Holley, 2006; Helander et al., 1998) ขณะเดียวกัน Anethole และ Estragole แสดงฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มและการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิวชีวภาพ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดฟันผุ และการติดเชื้อเรื้อรังในช่องปาก (กลุ่มวิจัยนวัตกรรมตรวจวินิจฉัยเชื้อดื้อยา, 2561; Kaplan, 2010)

ยิ่งไปกว่านั้น งานวิจัยหลายชิ้นได้ยืนยันถึงความสามารถการเสริมฤทธิ์เสริมฤทธิ์กันของสารในกลุ่มฟีนิลโพรพิเนสร่วมกับสารกลุ่มอื่นในน้ำมันหอมระเหย เช่น monoterpenes และ phenols ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาพัฒนาในรูปแบบนาโน

อิมัลชัน (nanoemulsion) ซึ่งช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารออกฤทธิ์เข้าสู่เซลล์ของจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Badr et al., 2021; Andrés Martínez et al., 2021)

ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว น้ำมันหอมระเหยกลุ่มฟีนิลโพรพินส์จึงมีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปาก เช่น น้ำยาบ้วนปาก ยาสีฟัน หรือเจลสำหรับรักษาโรคเหงือกอักเสบ โดยสามารถลดจำนวนเชื้อก่อโรคและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Carvalho et al., 2020; Isabela de Oliveira Carvalho et al., 2020)

ในทำนองเดียวกัน สารในกลุ่ม terpenes ก็ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในแวดวงการศึกษา เนื่องจากมีคุณสมบัติในการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์จุลชีพ เพิ่มการรั่วไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ และสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Nogueira Diaz et al. (2015) รายงานว่า thymol และ carvacrol ซึ่งจัดเป็น monoterpenes แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และลดความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้ออย่างชัดเจน

Firmino et al. (2019) ยังรายงานว่าการยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* และ *Lactobacillus acidophilus* ได้ โดยกลไกการออกฤทธิ์ ประกอบด้วย การลดการเกาะติดของเชือบนผิวฟัน การลดการผลิตกรด และการแทรกซึมเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน ส่งผลให้เซลล์จุลชีพตายในที่สุด (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553)

Chiu et al. (2020) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ limonene ซึ่งเป็น monoterpene ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Streptococcus mutans* ได้ผ่านการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร EPS (extracellular polymeric substances)

งานวิจัยของ Firmino et al. (2019) ยังได้ศึกษาฤทธิ์ของสารไดเทอร์พีน ICB4 และ ICB8 ที่แยกได้จากพืช *Croton blanchetianus* ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus parasanguinis* พบว่าสารดังกล่าวสามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถลดจำนวนแบคทีเรียภายใต้ไบโอฟิล์มได้ถึง 100% แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของไดเทอร์พีนในการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มและการติดเชือบนช่องปาก

นอกจากนี้ Badr et al. (2021) ยังได้ศึกษาคุณสมบัติของนาโนอิมัลชันที่พัฒนาจากน้ำมันหอมระเหยของ *Lavandula spica* ซึ่งมีสารสำคัญในกลุ่ม monoterpenes เช่น camphene และ α -terpinyl acetate พบว่านาโนอิมัลชันเหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบทั่วไป แสดงให้เห็นถึงแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของสารธรรมชาติด้วยเทคโนโลยีนาโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในแง่ของการประยุกต์ใช้อื่น ๆ Nedroostova et al. (2009) ได้ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไอรระเหย (vapour phase) โดยใช้เทคนิค disc volatilization พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *Azadirachta indica* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) เช่นเดียวกับน้ำมันจาก *Allium sativum* *Origanum vulgare* และ *Thymus vulgaris* ซึ่งทั้งหมดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ควบคุมการปนเปื้อนในอาหารและต่อยอดสู่การใช้ในอุตสาหกรรมสุขภาพ

โดยสรุป สารในกลุ่ม terpenes ทั้งในรูปแบบทั่วไปและนาโนเทคโนโลยีแสดงศักยภาพสูงในการต้านจุลินทรีย์และลดการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเฉพาะในเชื้อที่เกี่ยวข้องกับโรคในช่องปาก เช่น แบคทีเรีย *Streptococcus mutans* *Streptococcus sobrinus* และ *Streptococcus parasanguinis* ซึ่งงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นล้วนสนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารธรรมชาติที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในอนาคต

2.5 กลไกการต้านเชื้อของสาร Essential Oils

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารระเหยง่ายที่มีองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ เทอร์พีน (terpenes) และ สารอนุพันธ์ เช่น โมโนเทอร์พีน (monoterpenes) เซสควิเทอร์พีน (sesquiterpenes) แอลกอฮอล์ ฟีนอล อัลดีไฮด์ และคีโตน เป็นต้น (Bassolé & Juliani, 2012) ตัวอย่างเช่น carvacrol และ thymol ซึ่งพบในน้ำมันออริกานและไทม์ eugenol ในน้ำมันกานพลู และ terpinen-4-ol ในน้ำมันทีทรี ล้วนแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยน้ำมันหอมระเหยสามารถออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้หลายกลไก โดยกลไก เช่น การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (disruption of cell membrane integrity) ถือหนึ่งในกลไกหลักของสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีความสามารถในการแทรกซึม และรบกวนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เยื่อหุ้มสูญเสียความสามารถในการควบคุมการแลกเปลี่ยนสาร ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารสำคัญ เช่น ATP ไอออน กรดนิวคลีอิก และโปรตีนภายในเซลล์ (Burt, 2004; Lambert et al., 2001) สารในกลุ่มฟีนอล เช่น thymol และ carvacrol มีสมบัติในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิพิดของเยื่อหุ้ม และลดความต่างศักย์ของเยื่อหุ้ม ทำให้เซลล์เชื้อโรคสูญเสียการทำงาน และตายในที่สุด ความสามารถในการรบกวนกระบวนการสร้างพลังงาน (inhibition of energy metabolism) น้ำมันหอมระเหยสามารถขัดขวางการสร้างพลังงานของจุลินทรีย์โดยการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และทำลายการทำงานของโปรตอนมอเตอร์ (proton motive force) ที่จำเป็นต่อการผลิต ATP (Ultee et al., 2002) เมื่อเซลล์ไม่สามารถสร้างพลังงานได้อย่างเพียงพอ จะส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์สารชีวภาพที่จำเป็น และการเจริญเติบโตของเซลล์ อีกทั้งยังมีการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลีอิก (inhibition of protein and nucleic acid synthesis) มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักฐานว่าองค์ประกอบบางชนิดในน้ำมันหอมระเหยสามารถรบกวนการแสดงออกของยีน หรือการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีน ตัวอย่างเช่น eugenol และ cinnamaldehyde แสดงฤทธิ์ยับยั้งการจำลองและการแปลรหัสกรดนิวคลีอิกของเชื้อรา *Candida* และแบคทีเรีย *Escherichia coli* (Gill & Holley, 2006; Helander et al., 1998) ทั้งยังมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (anti-biofilm activity) น้ำมันหอมระเหยยังสามารถป้องกันการก่อตัวของไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นโครงสร้างชีวภาพที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากสภาพแวดล้อม และยาปฏิชีวนะ โดยกลไกการยับยั้งดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง quorum sensing หรือสัญญาณการสื่อสารระหว่างเซลล์ในชุมชนจุลชีพ (Kavanaugh & Ribbeck, 2012) เช่น น้ำมันทีทรีสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ และความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกิดออกซิเดชัน (Oxidative stress induction) น้ำมันหอมระเหยบางชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการสะสมของสารอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species: ROS) ภายในเซลล์จุลชีพ ทำให้เกิดภาวะออกซิเดชันของสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน ลิพิด และกรดนิวคลีอิก ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ (Sharifi-Rad et al., 2017)

2.6 หลักการการซึมผ่านผนังเซลล์ของสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหย (Essential Oils)

น้ำมันหอมระเหย (Essential oils; EOs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สกัดได้จากพืช ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีที่มีความซับซ้อน เช่น เทอร์พีน (terpenes) ฟีนอล (phenols) แอลดีไฮด์ (aldehydes) คีโตน (ketones) และเอสเทอร์ (esters) โดยทั่วไปสารเหล่านี้มักมีคุณสมบัติที่เป็นลิพิด (lipophilic) และมีโมเลกุลเล็ก ส่งผลให้สามารถซึมผ่านผนัง และเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี (Burt, 2004; Bassolé & Juliani, 2012) โดยกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์จะมีความซับซ้อน และสัมพันธ์กับโครงสร้างของผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์เป็นหลัก โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ที่มีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นเพปทิโดไกลแคนที่หนา และไม่มีเยื่อหุ้มชั้นนอก ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) มีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า โดยมีชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งประกอบด้วยลิโปโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharides: LPS) ทำหน้าที่เป็นส่วนที่คัดแยกสารแปลกปลอม ส่งผลให้แบคทีเรียแกรมลบมีความทนทานต่อสารเคมีมากกว่า (Nazzaro et al., 2013) กลไกการซึมผ่านของน้ำมันหอมระเหยเข้าเซลล์จะเริ่มจากคุณสมบัติทางเคมีของสารที่มีความสามารถใ้การแทรกซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มลิพิด (phospholipid bilayer) ได้ เนื่องจากความเป็นลิพิดของน้ำมันหอมระเหย ส่งผลให้สารเหล่านี้สามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยไม่ต้องอาศัยตัวพา หรือพลังงาน (passive diffusion) เมื่อแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ น้ำมันหอมระเหยจะทำให้โครงสร้างของฟอส

โพลีฟิตเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ในการควบคุมความเป็นระเบียบ (membrane order) และความสามารถในการกักเก็บสารภายในเซลล์ลดลง (Xi et al., 2011)

สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่มีการศึกษา พบว่ามีกลไกในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ได้แก่ carvacrol thymol citral และ eugenol ซึ่งสามารถรบกวนคุณสมบัติของโครงสร้างลิพิด ส่งผลให้เกิดการสูญเสียศักย์ไฟฟ้าภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane potential; $\Delta\psi_m$) ทำให้การเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติก และทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออนภายในเซลล์ (Ultee et al., 2002; Gutiérrez-Pacheco et al., 2023) โดยในบางกรณี น้ำมันหอมระเหยยังสามารถเกิดปฏิกิริยาโควาเลนต์กับหมู่ซัลไฮดริล (-SH) ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสาร หรือไอออน ทำให้การทำงานของโปรตีนเสียหาย นำไปสู่การหยุดชะงักของกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ และทำให้การสร้างพลังงานภายในเซลล์หยุดชะงัก (Gutiérrez-Pacheco et al., 2023) เมื่อเกิดการซึมผ่าน และรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์โดยน้ำมันหอมระเหย จะก่อให้เกิดการรั่วไหลของสารชีวโมเลกุลภายใน เช่น ATP กรดนิวคลีอิก ไอออน K^+ และโปรตีน ทำให้เซลล์ไม่สามารถดำรงความมีชีวิตอยู่ได้ (Bassolé & Juliani, 2012)

2.7 Citral

citral จัดเป็นสารในกลุ่ม แอลดีไฮด์โมโนเทอร์ปีนเชิงเส้น ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (lemongrass oil) โดยมีปริมาณมากกว่า 85 % v/v นอกจากนี้ยังพบในพืชใบและผลไม้หลายชนิด เช่น มะนาว ส้ม มะกรูด มะเขือเทศ และใบโหระพา (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553) โดย citral เป็นการผสมของไอโซเมอร์สองชนิด คือ neral (cis-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-al) และ geranial (trans-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-al)



รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ citral (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024)

citral เป็นโมเลกุลโมโนเทอร์ปีนที่มีขนาดเล็ก มีโครงสร้างสายไฮโดรคาร์บอนที่สามารถละลายในไขมันได้ดี ทำให้แทรกซึมผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพได้ง่าย กลุ่มอัลดีไฮด์ชนิด α,β -ไม่อิ่มตัวในโครงสร้างของ citral ยังมีคุณสมบัติเป็นตัวรับนิวคลีโอฟิลิก ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาการเติมอเล็กโตรฟิลิกกับหมู่กรดอะมิโนที่มีอเล็กโตรอนหนาแน่น เช่น ซิสเทอีน บนโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ และนำไปสู่การยับยั้งการเจริญของจุลชีพ (Dai, Bai, et al., 2023)

นอกจากฤทธิ์ทางกายภาพในการทำลายโครงสร้างเซลล์แล้ว citral ยังมีบทบาทสำคัญในด้านชีวภาพ ได้แก่ การยับยั้งการดูดซึมสารอาหารของเชื้อจุลชีพ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม และการรบกวนการสื่อสารทางเคมี (quorum sensing) ที่ใช้ในการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญของเชื้อก่อโรคในช่องปาก เช่น *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* (กลุ่มวิจัยนวัตกรรมตรวจวินิจฉัยเชื้อดื้อยา, 2561; Abranches et al., 2018; Chiu et al., 2021)

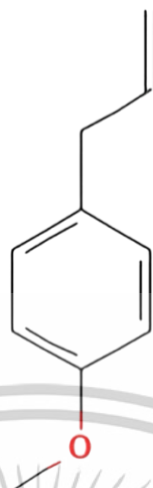
ฤทธิ์การต้านจุลชีพของ citral ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อรา และปรสิต โดยมีผลทำลายความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์รั่วและเสียหายที่สำคัญในการรักษาสสมดุลภายในเซลล์ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษของเชื้อก่อโรค และต้านการเกิดไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ (Gutiérrez-Pacheco et al., 2023; Dai, Liu, et al., 2023)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าความสามารถของ citral ในการชะลอกระบวนการออกซิเดชันอาจมีส่วนช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรค และส่งผลให้มีคุณสมบัติต้านการอักเสบและต้านการเกิดมะเร็งในมนุษย์ด้วย (Gutiérrez-Pacheco et al., 2023; Bakkali et al., 2008)

จากการศึกษาที่เกี่ยวข้องพบว่า citral มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพทางเลือก โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปาก เช่น ยาสีฟัน หรือน้ำยาบ้วนปาก เพื่อป้องกันหรือควบคุมการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปาก และการสร้างไบโอฟิล์ม (Carvalho et al., 2020; Isabela de Oliveira Carvalho et al., 2020)

2.8 Methyl chavicol : MC

Methyl chavicol (ชื่อทางเคมี 1-methoxy-4-prop-2-enylbenzene หรือที่รู้จักในชื่อ estragole, p-allylanisole) เป็นสารประกอบในกลุ่ม phenylpropanoids ซึ่งจัดเป็นสารเมตาบอลิต์ทุติยภูมิที่พบในน้ำมันหอมระเหยของพืชสมุนไพรหลายชนิด โดยมีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ methoxy-phenylpropane ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ทั้งในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านแมลง และต้านจุลชีพ (Wongsariya et al., 2024)



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ methyl chavicol (ดัดแปลงจาก PubChem, 2024)

จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่า methyl chavicol มีฤทธิ์ยับยั้งช่อง sodium channel ของเซลล์จุลชีพ ส่งผลต่อการส่งสัญญาณและการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ทั้งยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว และกระตุ้นการฟาโกไซโทซิสของเซลล์มาโครฟาจ จึงมีศักยภาพในการต้านการอักเสบและต้านเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในด้านฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ methyl chavicol แสดงผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และเชื้อก่อโรคในช่องปากอย่าง *Streptococcus mutans* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดฟันผุ โดยกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อของ methyl chavicol ร่วมกับสารสำคัญอื่นในน้ำมันหอมระเหย คือสามารถรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพ ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน ตลอดจนกระตุ้นการเกิด ROS (Reactive Oxygen Species) ภายในเซลล์จุลชีพ ส่งผลให้เกิดความเสียหายจากกระบวนการออกซิเดชัน ซึ่งเป็นกลไกการตายของเซลล์จุลชีพอย่างมีประสิทธิภาพ (Ifeoma Felicia Chukwuma et al., 2023)

นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยที่มี methyl chavicol เป็นองค์ประกอบหลักยังถูกกล่าวถึงในรายงานของ กรมวิทยาศาสตร์บริการ (2553) ว่าสามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเน้นถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยในงานด้านการแพทย์ สุขภาพ และผลิตภัณฑ์ในช่องปาก

ข้อมูลจาก กระทรวงสาธารณสุข (2560) และ กลุ่มวิจัยนวัตกรรมตรวจวินิจฉัยเชื้อดื้อยา (2561) ยังแสดงให้เห็นว่า การควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก เช่น *Streptococcus mutans* และการป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม เป็นหัวใจสำคัญของการส่งเสริมสุขภาพช่องปาก โดยการใช้สารสกัดจากพืช

เช่น methyl chavicol ถือเป็นแนวทางที่สอดคล้องกับกระแสการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในงานทันตกรรม
ป้องกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. Laminar air flow ยี่ห้อ FASTER BIO48
2. Autoclave ยี่ห้อ Hirayama
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Shel-Lab1350FD
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS
5. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าควมอณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ GALLENKAMP
6. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance) ยี่ห้อ Pioneer
7. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital balance) ยี่ห้อ Sartorius BSA2245-cw
8. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร
9. ไมโครปิเปตต์ทีป (Micropipette tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร และ 1,000 ไมโครลิตร
10. ปิเปตต์ (Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
11. ลูกยางปิเปตต์ (Pipette bulb)
12. เวอร์เนียแคลลิเปอร์ (Vernier caliper)
13. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
14. ลวดเขี่ยเชื้อ (Inoculating loop)
15. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
16. ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50 100 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
17. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
18. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร
19. จานเพาะเชื้อ (Plate) ขนาด 100x15 มิลลิเมตร
20. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 16x100 มิลลิเมตร
21. หลอดทดลองฝาเกลียว (Test tube with screw cap) ขนาด 12x75 มิลลิเมตร
22. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
23. แผ่นสไลด์ (Slide)
24. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25. ลูกยางปิเปตต์ (Pipette bulb)

3.1.2 สารเคมี

1. สารละลายน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline: PBS) 10X
2. เอทานอล 95% v/v (Ethyl alcohol)
3. สารละลายไอโอดีน (Gram's iodine) ความเข้มข้น 0.1 N
4. คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ความเข้มข้น 0.1% w/v
5. ซาฟรานิน (Safranin) ความเข้มข้น 0.0025% w/v
6. ทวิน 80 (Tween 80)
7. 96-well plate

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วุ้นผง (Agar) Bio Agars
2. Brain Heart Infusion (BHI) Broth
3. Brain Heart Infusion (BHI) Agar

3.1.4 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

1. *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478
2. *Streptococcus mutans* ATCC 25175

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175

3.2.1 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

เพาะเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 บนอาหารแข็ง Brain Heart Infusion (BHI) นำไปบ่มภายใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2-3 โคโลนี ลงในอาหารเหลว BHI ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่สภาวะเดียวกันกับก่อนหน้าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่เจริญปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว BHI หลอดใหม่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จนเชื้อที่เจริญในหลอดมีค่าความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (ประมาณ 10^8 cfu/mL)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายหลังจากนั้นทำการเจือจางด้วย phosphate buffer saline (pH 7.4) ให้ได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 2×10^6 cfu/mL เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดสอบ (Wongsariya et al., 2014)

เตรียมสารละลาย citral และ methyl chavicol ความเข้มข้น 2% v/v ในอาหารเหลว BHI ที่มีส่วนประกอบ ethyl alcohol (99.9% v/v) และสารละลาย tween 80 ปริมาณ 4% v/v เพื่อช่วยในการละลาย หลังจากนั้นทำการเจือจางสารละลาย citral และ methyl chavicol ด้วยวิธีการทำเจือจางทีละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) โดยใช้อาหารเหลว BHI เป็นตัวเจือจางใน 96-well plate โดยกำหนดให้ปริมาตรของสารละลายในแต่ละหลุมมีปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังทำการเจือจาง จากนั้นเติมหัวเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม โดยปริมาตรสุดท้ายของทุกหลุมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร (Wongsariya et al., 2014) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar บันทึกผลโดยระบุให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเป็นค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Raja Mazlan et al., 2016)

3.2.2 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

นำทุกระดับความเข้มข้นของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มาทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ โดยถ่ายสารละลายทุกหลุมความเข้มข้นจาก 96-well plate ที่ทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง BHI นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน Candle jar โดยระบุให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Raja Mazlan et al., 2016)

3.3 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (Time Killing Assay)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลาย citral และ methyl chavicol และสารละลายผสม citral และ methyl chavicol ในการกำจัดเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ด้วยการหาระยะเวลาที่สารทดสอบใช้ฆ่าเชื้อตามวิธีดัดแปลงของ Adusei et al. (2019) และคณะ โดยความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ความเข้มข้นที่ $0.5 \times \text{MIC}$ $2 \times \text{MIC}$ และ $4 \times \text{MIC}$ ตามลำดับ หลังจากนั้นเติมเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยกำหนดให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อมีค่าเท่ากับ 1×10^6 cfu/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 0 2 4 6 8 10 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่นับปริมาณเชื้อในแต่ละช่วงเวลาด้วยวิธี viable plate cant และนำมาคำนวณหาปริมาณเชื้อโดยแสดงผลในรูปแบบของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Log cfu/mL ต่อเวลา

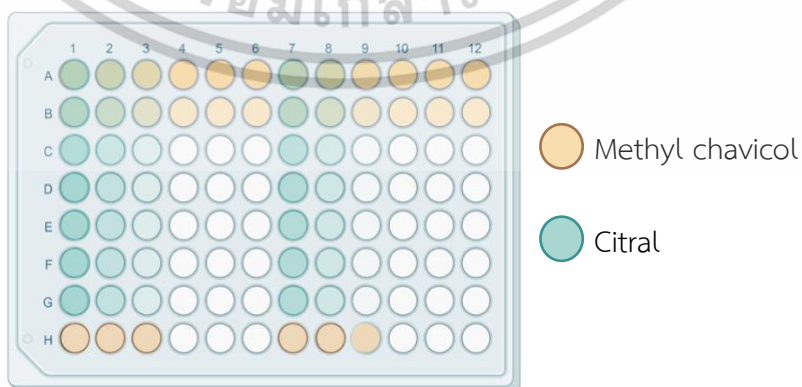
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ในการเสริมฤทธิ์กันของสารละลาย methyl chavicol และ citral ด้วยวิธี checkerboard microdilution assay ตามวิธีดัดแปลงของ Wongsariya et al. (2014) โดยทำการเจือจางสารละลาย methyl chavicol ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.5% v/v ด้วยวิธี 2-fold serial dilution โดยอาหารเหลว BHI ใน 96-well plate ในแนวตั้ง (แถว A-G) จากนั้นเติมสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 0.02-0.5% v/v ลงใน 96-well plate ในแนวนอน (คอลัมน์ 1-12) ที่มีสารละลาย methyl chavicol ในแต่ละความเข้มข้นในแต่ละหลุมของ 96-well plate ที่มีสารละลาย methyl chavicol อยู่ในแต่ละความเข้มข้นในแนวนอน(คอลัมน์ 1-12) ดังแสดงในรูปที่ 6 หลังจากนั้นเติมเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 2×10^6) ลงในทุกหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar บันทึกความเข้มข้นของสารผสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และคำนวณหาความเข้มข้นของสารผสมที่เสริมฤทธิ์ที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อตามสมการที่แสดงดังนี้

$$FICI = \left(\frac{MIC_{\text{การเสริมฤทธิ์ของสารละลาย Methyl chavicol และ Citral}}}{MIC_{\text{Methyl chavicol}}} \right) + \left(\frac{MIC_{\text{การเสริมฤทธิ์ของสารละลาย Citral และ Methyl chavicol}}}{MIC_{\text{Citral}}} \right)$$

โดยคู่ความเข้มข้นของสารผสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้และมีค่า Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) ต่ำกว่า 0.5 จะถือว่า ณ คู่ความเข้มข้นดังกล่าวของสารผสมมีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กัน จากนั้นหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1 และข้อ 3.2.2 โดยเตรียมสารตามวิธีข้างต้น



รูปที่ 6 แสดงการเจือจางระหว่างสารละลาย methyl chavicol และสารละลาย citral

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดสอบความสามารถของสารละลายของ citral และ methyl chavicol ในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มของสารละลาย

เตรียมสารทดสอบ และเจือจางสารทดสอบตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1 ในอาหารเหลว BHI ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครส (sucrose) ความเข้มข้น 4% w/v โดยกำหนดให้ปริมาตรสุดท้ายหลังทำการเจือจางเท่ากับ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1×10^6 cfu/mL) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูอาหาร และตัวเซลล์แขวนลอยทั้ง เติมสารละลาย PBS (pH 7.2) ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมเพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ได้ยึดเกาะทำซ้ำ 3 ครั้ง ทำการเติมสารละลาย ethyl alcohol (99.9% v/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำการตรึงไบโอฟิล์ม จากนั้นเติมสารละลายคริสตัลไวโอเลตความเข้มข้น 0.01% (0.01%w/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อทำการย้อมไบโอฟิล์ม เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูสีส่วนเกินทั้ง ล้างไบโอฟิล์มด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เพื่อล้างสีส่วนเกินออก ทิ้งให้แห้งทำการชะสีที่ติดกับไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย ethyl alcohol (95 % v/v) หาปริมาณ 200 ไมโครลิตร ทำการถ่ายสารละลายที่ถูกชะออกจากไบโอฟิล์มลง 96-well plate อันใหม่ นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร บันทึกค่าที่วัดได้และทำการวิเคราะห์การออกฤทธิ์ของสารต่อการก่อตัวของไบโอฟิล์มจากการคำนวณ และจะถูกแสดงให้เห็นในรูปของร้อยละการลดลงของไบโอฟิล์มเมื่อเทียบกับไบโอฟิล์มที่ไม่ได้มีการเติมสารทดสอบตามสมการตามที่อธิบายไว้ด้านล่าง (Andrés Martínez et. al., 2021)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของการเจริญ} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่มีการเติมตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของการเจริญ}} \times 100$$

3.6 การทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อภายในไบโอฟิล์ม

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์ม โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลซูโครสในทุกหลุม 2 % w/v ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และความเข้มข้นแบคทีเรียสุดท้ายอยู่ที่ 1×10^6 cfu/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการถ่ายอาหารออกครึ่งหนึ่ง จากนั้นเตรียมสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่ใช้ทดสอบ และเจือจางสารทดสอบตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1 ด้วยอาหารเหลว BHI ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส (sucrose) 2 % w/v โดยกำหนดให้ปริมาตรสุดท้ายหลังจากทำเจือจางเท่ากับ 200 ไมโครลิตร ทำการเจือจางสารละลาย methyl chavicol (0.5% v/v) ด้วยวิธี 2-fold serial dilution ด้วยอาหารเหลว BHI ใน 96-well plate ในแนวตั้ง (แถว A-G) หลังจากนั้นเติมสารละลาย Citral ที่ทำการเจือจางไว้แล้ว(ช่วงความเข้มข้น 0.5-0.02% v/v) ในแต่ละความเข้มข้นในแต่ละหลุมของ 96-well plate ที่มีสารละลาย Methyl chavicol อยู่ในแต่ละความเข้มข้นในแนวนอน(คอลัมน์ 1-12) ดังแสดงในภาพที่ 1 จากนั้นเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม และ BHI ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส(Sucrose) 4% w/v ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน Candle jar จากนั้นล้างไปโอฟิล์มด้วย PBS (pH 7.2) เพื่อขจัดแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะ เติมสารละลาย 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (1mg/ml MTT ใน PBS (pH 7.4)) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการประเมินการมีชีวิตของเซลล์ เพื่อทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายใต้ไปโอฟิล์ม โดยเติมลงในแต่ละหลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อที่มีชีวิตเกิดกระบวนการเผาผลาญทำให้เกิดผลึกฟอร์มาซาน เมื่อครบระยะเวลาทำการล้างส่วนเกินจะถูกกำจัดออก และทำการละลายผลึกฟอร์มาซานด้วย DMSO 200 μ l จากนั้นทำการถ่ายผลึกที่ละลายแล้วไปยังเพลต 96 หลุม (96-wellplate)อันใหม่ และค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร (Pimpikar Kanchanadumkerng and Karn Wongsariya, 2021) เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดเชื้อที่มีชีวิตจะถูกคำนวณโดยใช้สมการดังที่อธิบายไว้ด้านล่าง

$$\% \text{Eradication} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A ถูกกำหนดให้เป็นค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของไปโอฟิล์มที่ไม่ได้รับสาร

B ถูกกำหนดให้เป็นค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของไปโอฟิล์มที่ได้รับสาร

3.7 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการชะไปโอฟิล์ม

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียตามข้อ 3.6 จากนั้นทำการเตรียมสารละลาย citral และ methyl chavicol เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการกำจัดไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* ATCC 33478 และเพื่อหาระยะเวลาที่สารทดสอบใช้ชะไปโอฟิล์มวิธีดัดแปลงของ Itumeleng T. Baloyi et al. (2023) เตรียมเชื้อตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.5 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อออกและทำการเติมสารที่ความเข้มข้น 0.5xMIC MIC 2xMIC และ 4xMIC ตามลำดับ จากนั้นนำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4 6 8 10 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมด้วยสียคริสตัลไวโอเลต ความเข้มข้น 0.01% (0.01%w/v) ตามที่ระบุไว้ในข้อ 3.5 นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร บันทึกค่าที่วัดได้และทำการวิเคราะห์การออกฤทธิ์ของสารต่อการชะไปโอฟิล์มจากการคำนวณ และจะถูกแสดงให้เห็นในรูปของเปอร์เซ็นต์การลดลงของไปโอฟิล์มจากการชะตามระยะเวลาเมื่อเทียบกับไปโอฟิล์มที่ไม่ได้มีการเติมสารทดสอบ ตามสมการตามที่อธิบายไว้ด้านล่าง

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของการเจริญ} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่มีการเติมตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของการเจริญ}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistics เวอร์ชัน 28 (SPSS software, New York, USA) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-way Analysis of Variance: One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีของ Duncan โดยตั้งสมมติฐานว่าง (H_0) ว่า เมื่อค่า p-value > 0.01 หมายถึง อย่างน้อยหนึ่งปัจจัยไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยอมรับสมมติทางเลือก (H_1) เมื่อค่า p-value < 0.01 ซึ่งหมายถึง อย่างน้อยหนึ่งปัจจัยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองดำเนินการซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อชุดตัวอย่าง เพื่อจัดกลุ่มทางสถิติและหาค่าเฉลี่ยที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99 ($P < 0.01$)



บทที่ 4

ผล และอภิปรายผล

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175

4.1.1 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

จากการทดลองการหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย citral มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดอยู่ที่ 0.03125 % v/v และ 0.06250 % v/v ตามลำดับ ในส่วนของสารละลาย methyl chavicol จะมีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดอยู่ที่ 0.5000 ของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ของสารละลาย citral และ methyl chavicol

Pathogen	Citral (%v/v)	Methyl chavicol (%v/v)
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	0.031	0.500
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0.063	0.500

4.1.2 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

จากการทดลองหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดสามารถฆ่าเชื้อได้ของสารละลาย citral และ methyl chavicol พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย citral อยู่ที่ 0.6250 ของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ฆ่าเชื้อได้ของสารละลาย methyl chavicol อยู่ที่ 1.000 ของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ของสารละลาย citral และ methyl chavicol

Pathogen	citral (%v/v)	methyl chavicol (%v/v)
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	0.063	1.000
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0.063	1.000

จากการศึกษาพบว่าสารละลาย citral ซึ่งเป็นสารในกลุ่มอัลดีไฮด์โมโนเทอร์ปีนที่พบมากในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ทำให้สามารถแทรกซึมเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย และรบกวนโครงสร้างฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ได้ ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสมบูรณ์และเกิดการรั่วไหลของสารสำคัญภายในเซลล์ เช่น ATP และไอออน ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด นอกจากนี้ citral ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจระดับเซลล์ และรบกวนการส่งสัญญาณทางชีวเคมี เช่น quorum sensing ซึ่งเป็นกลไกการสื่อสารระหว่างแบคทีเรียในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม (Dai et al., 2023, Tariq et al., 2019, Kavanaugh & Ribbeck, 2012) ในด้านฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียของสารละลาย methyl chavicol (MC) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม phenylpropanoids ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเร่วหอม (*Etlingera pavieana*) ได้รับการยืนยันจากการศึกษาของ Wongsariya et al. (2024) ว่าสามารถยับยั้งเชื้อในช่องปาก เช่น *S. mutans* และ *S. sobrinus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลาย methyl chavicol มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านจุลชีพผ่านการทำงานของ sodium channel ในเซลล์จลินทรีย์ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ และการยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์ อีกทั้งสารละลายทั้ง 2 ชนิด ยังมีความสามารถในการเหนี่ยวนำภาวะเครียดที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative stress) ผ่านการกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species: ROS) ซึ่งสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ได้แก่ ลิพิด กรดนิวคลีอิก และโปรตีน (Sharifi-Rad et al., 2017) กลไกเหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดผลกระทบแบบลูกโซ่ภายในเซลล์ และส่งผลให้เซลล์จุลชีพสูญเสียการทำงาน และตายลงในที่สุด โดยภาพรวม กลไกการออกฤทธิ์ของ citral และ methyl chavicol แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากน้ำมันหอมระเหยสามารถเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพจากธรรมชาติ ทั้งในด้านการรักษาและการป้องกันการติดเชื้อ โดยเฉพาะในกลุ่มจุลชีพที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือในบริบทที่ต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เช่น ในผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากหรือในอุตสาหกรรมอาหารโดยผลลัพธ์ที่คล้ายกันนี้ถูกพบในการศึกษาวิจัยของ Dai et al. (2023) ที่ทำการทดสอบคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียของ citral ต่อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยค่า MIC ของสาร citral ต่อแบคทีเรีย *S. aureus* อยู่ที่ 0.25 mg/mL และเมื่อใช้ความเข้มข้น 0.5 mg/mL (2×MIC) พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของเซลล์มีความสัมพันธ์กับการรั่วไหลของโมเลกุลภายในเซลล์ และยังพบว่าสาร methyl chavicol มีความสามารถในการฆ่าแบคทีเรีย *S. sobrinus* และ *S. mutans* ได้จากการศึกษาทางานวิจัยของ Wongsariya et al. (2024) ซึ่งได้ทำการศึกษาศักยภาพต้านเชื้อสเตรปโตคอคคัสในช่องปากและการยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเร่วหอม (*Etlingera pavieana* : Eo) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมัน ซึ่งเสนอเป็นทางเลือกสำหรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร พบว่าสาร methyl chavicol (MC) และ trans-anethole (TA) โดยวิธีทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบดิสก์ดิลิวชันพบว่า Eo สามารถยับยั้งเชื้อได้แบบขึ้นกับขนาดยา (dose-dependent) ค่า MIC ของ Eo และ TA มากกว่า 1.6% v/v ส่วนของ MC อยู่ที่ 0.4% v/v ตามลำดับ

4.2 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (Time Killing Assay)

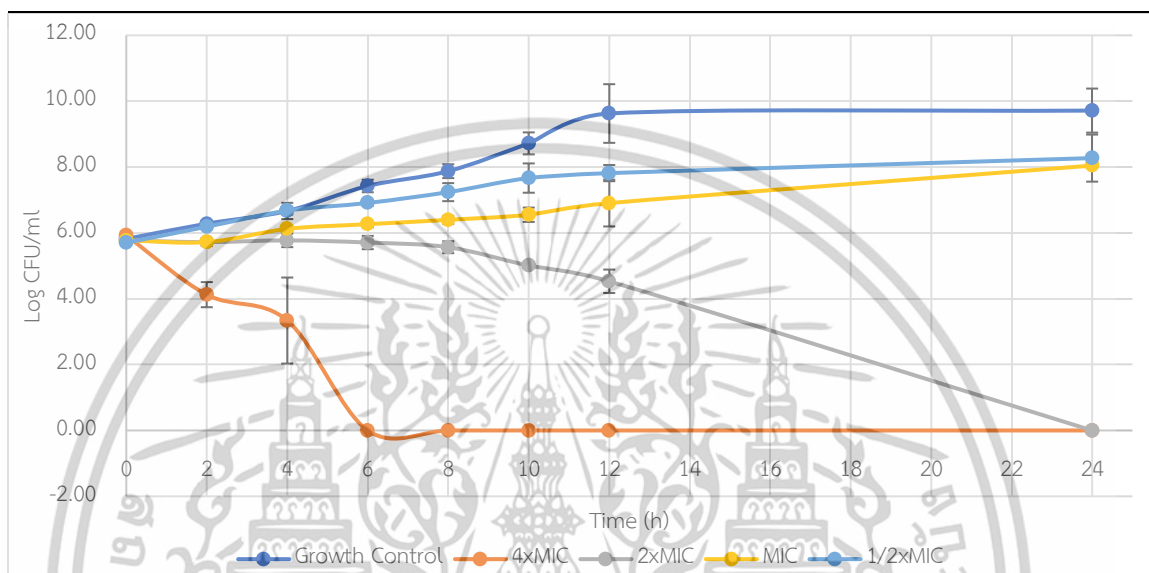
จากการทดสอบหาระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย citral และ methyl chavicol โดยใช้เวลาความเข้มข้นของสาร 4xMIC 2xMIC MIC และ 1/2xMIC โดยทำการเก็บผลทุกๆ 0 2 4 6 8 10 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC และ 2xMIC มีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 3 และกราฟที่ 1 และสามารถฆ่าเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 3 และกราฟที่ 2 สารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC มีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 ที่เวลา 10 ชั่วโมงดังแสดงในตารางที่ 4 และกราฟที่ 3 และสามารถฆ่าเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4 และกราฟที่ 4 โดยแถบความคลาดเคลื่อน(error bar) ได้จากการคำนวณการทดลอง 3 ซ้ำจากผลการทดลองโดยคำนวณให้อยู่ในรูปแบบของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation :SD)

ตารางที่ 3 แสดงค่าปริมาณเชื้อ (Log CFU/ml) *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ลดลง ณ ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อทดสอบกับสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC 2xMIC MIC และ 1/2xMIC

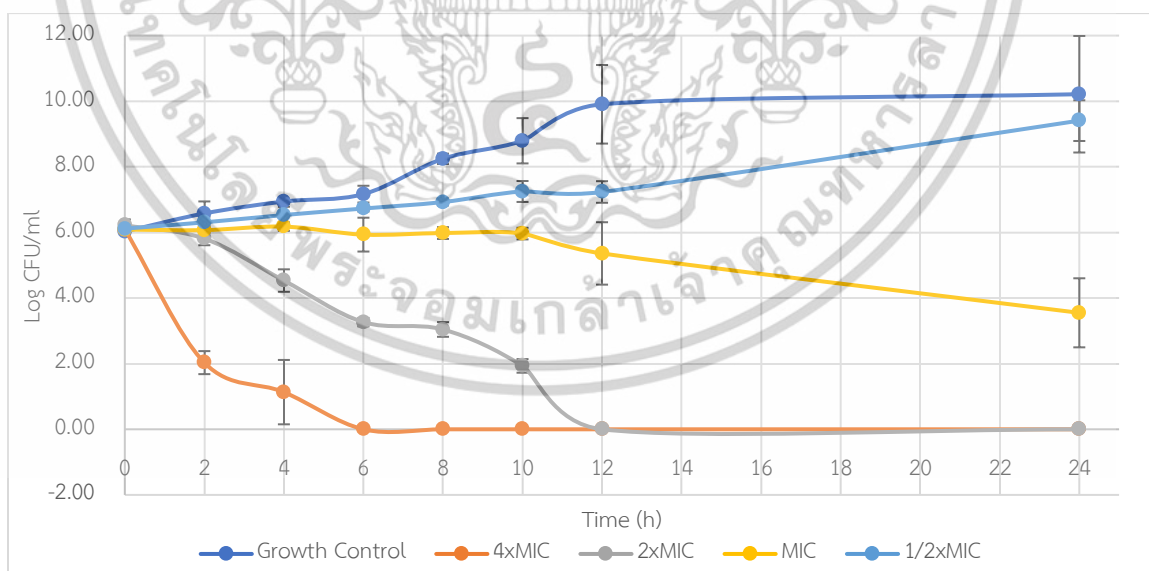
Pathogen	Time (h)	Growth Control	4xMIC	2xMIC	MIC	1/2xMIC
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	0	5.82±0.06 ^{efgh}	5.92±0.09 ^{fgh}	5.77±0.04 ^{efg}	5.77±0.03 ^{efg}	5.70±0.04 ^{efg}
	2	6.28±0.07 ^{fghi}	4.12±0.38 ^c	5.72±0.04 ^{efg}	5.72±0.12 ^{efg}	6.19±0.04 ^{fghi}
	4	6.67±0.25 ^{hijk}	3.34±2.31 ^b	5.77±0.20 ^{efg}	6.12±0.08 ^{fghi}	6.68±0.12 ^{hijk}
	6	7.42±0.19 ^{klmn}	0.00±0.00 ^a	5.71±0.20 ^{efg}	6.26±0.09 ^{fghi}	6.91±0.08 ^{ijkl}
	8	7.87±0.21 ^{mn}	0.00±0.00 ^a	5.56±0.18 ^{ef}	6.40±0.12 ^{fghij}	7.24±0.27 ^{klm}
	10	8.72±0.33 ^o	0.00±0.00 ^a	5.01±0.07 ^{de}	6.55±0.22 ^{ghij}	7.67±0.45 ^{lmn}
	12	9.63±0.89 ^p	0.00±0.00 ^a	4.53±0.36 ^{cd}	6.91±0.71 ^{ijkl}	7.82±0.25 ^{mn}
	24	9.71±0.67 ^p	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	8.04±0.04 ^{mno}	8.27±0.71 ^{no}
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0	6.03±0.02 ^{ghi}	6.09±0.08 ^{ghi}	6.22±0.18 ^{ghij}	6.09±0.16 ^{ghi}	6.12±0.13 ^{ghi}
	2	6.58±0.37 ^{ghijk}	2.03±0.35 ^{bc}	5.81±0.20 ^{gh}	6.07±0.10 ^{ghi}	6.31±0.17 ^{ghi}
	4	6.94±0.07 ^{hijk}	1.13±0.98 ^{ab}	4.53±0.34 ^{ef}	6.18±0.13 ^{ghi}	6.53±0.25 ^{hijk}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6	7.17±0.26 ^{ijkl}	0.00±0.00 ^a	3.27±0.13 ^{cd}	5.93±0.52 ^{ghi}	6.73±0.09 ^{hijk}
8	8.25±0.16 ^{lm}	0.00±0.00 ^a	3.04±0.22 ^{cd}	5.98±0.18 ^{ghij}	6.93±0.10 ^{ijkl}
10	8.79±0.69 ^m	0.00±0.00 ^a	1.93±0.21 ^{bc}	5.96±0.18 ^{ghi}	7.25±0.32 ^{ijkl}
12	9.91±1.20 ^{mn}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	5.36±0.95 ^{fg}	7.23±0.03 ^{kl}
24	10.21±1.78 ⁿ	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	3.55±1.05 ^{de}	9.41±0.62 ^m



กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 (Log CFU/ml) กับเวลาหลังจากการทดสอบกับสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC 2xMIC MIC และ 1/2xMIC

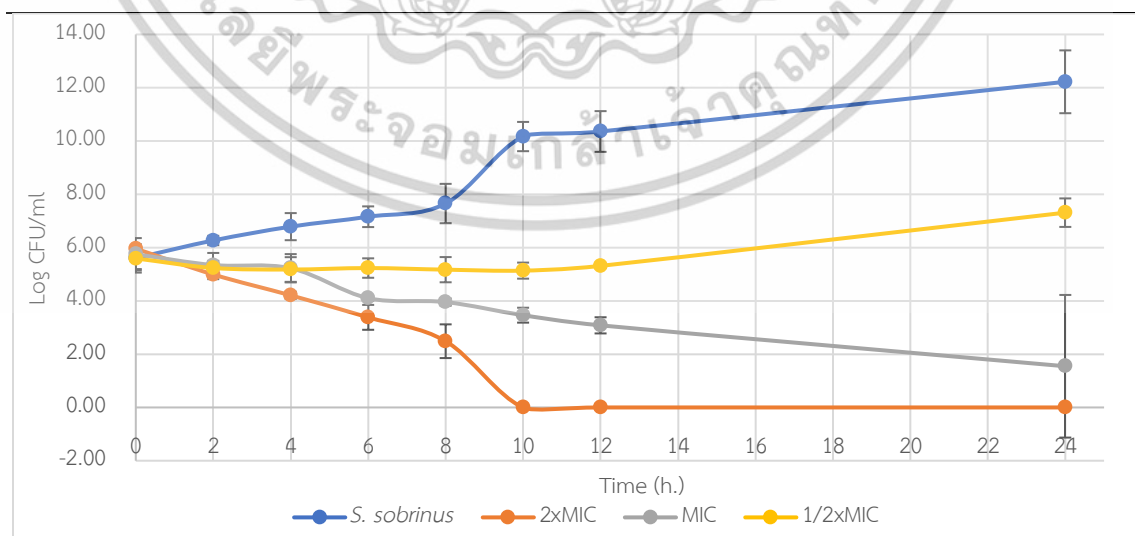


กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 (Log CFU/ml) กับเวลาหลังจากการทดสอบกับสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC 2xMIC MIC และ 1/2xMIC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

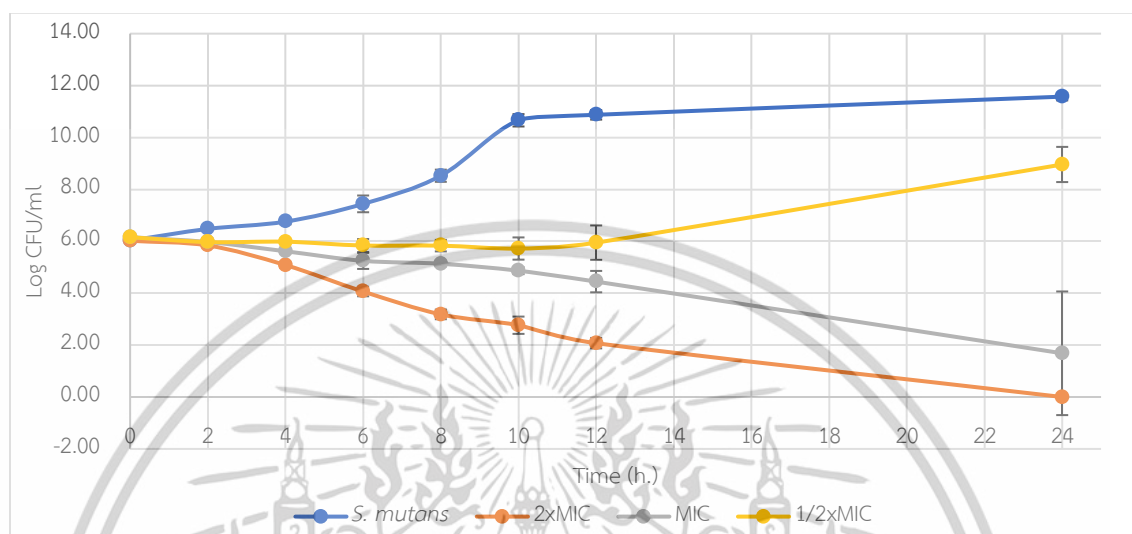
ตารางที่ 4 แสดงค่าปริมาณเชื้อ (Log CFU/ml) *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ลดลง ณ ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อทดสอบกับสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC MIC และ 1/2xMIC

Pathogen	Time(h)	Growth Control	2xMIC	MIC	1/2xMIC
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	0	5.61±0.41 ^{hijkl}	5.96±0.07 ^{ijkl}	5.75±0.61 ^{ghijkl}	5.59±0.53 ^{fghijk}
	2	6.27±0.18 ^{ijklm}	4.99±0.17 ^{efghi}	5.34±0.45 ^{fghij}	5.23±0.27 ^{fghij}
	4	6.79±0.51 ^{ijklm}	4.21±0.13 ^{defgh}	5.22±0.53 ^{fghij}	5.18±0.46 ^{fghij}
	6	7.16±0.39 ^{klm}	3.38±0.47 ^{cd}	4.10±0.09 ^{defg}	5.23±0.36 ^{fghij}
	8	7.65±0.74 ^m	2.49±0.63 ^{bc}	3.95±0.13 ^{cdef}	5.17±0.47 ^{fghij}
	10	10.17±0.55 ⁿ	0.00±0.00 ^a	3.46±0.28 ^{cde}	5.14±0.30 ^{fghij}
	12	10.36±0.76 ⁿ	0.00±0.00 ^a	3.08±0.30 ^{cd}	5.31±0.08 ^{fghij}
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	24	12.22±1.18 ^o	0.00±0.00 ^a	1.55±2.68 ^b	7.31±0.54 ^{lm}
	0	6.03±0.05 ^{ijk}	6.02±0.09 ^{ijk}	6.16±0.05 ^{ijk}	6.16±0.04 ^{ijk}
	2	6.48±0.04 ^{jk}	5.84±0.07 ^{hijk}	5.97±0.07 ^{ijk}	5.97±0.07 ^{ijk}
	4	6.76±0.11 ^{kl}	5.08±0.10 ^{ghi}	5.62±0.07 ^{hij}	5.98±0.05 ^{ijk}
	6	7.44±0.32 ^l	4.06±0.18 ^{ef}	5.25±0.31 ^{ghi}	5.84±0.25 ^{hijk}
	8	8.53±0.24 ^m	3.18±0.19 ^{de}	5.13±0.10 ^{ghi}	5.83±0.22 ^{hijk}
	10	10.66±0.24 ⁿ	2.77±0.33 ^{cd}	4.87±0.13 ^{fgh}	5.72±0.43 ^{hijk}
12	10.87±0.18 ⁿ	2.07±0.20 ^c	4.45±0.41 ^{fg}	5.95±0.66 ^{ijk}	
24	11.57±0.15 ⁿ	0.00±0.00 ^a	1.68±2.38 ^b	8.96±0.68 ^m	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 (Log CFU/ml) กับเวลาหลังจากการทดสอบกับสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC MIC และ 1/2xMIC



กราฟที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 (Log CFU/ml) กับเวลาหลังจากการทดสอบกับสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC MIC และ 1/2xMIC

จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อประสิทธิภาพในการฆ่าแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* ATCC 33478 โดยเฉพาะในกรณีของสารละลาย citral และ methyl chavicol พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารที่สูงกว่าค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 2 เท่า หรือ 4 เท่า จะส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียได้รับความเสียหายอย่างรุนแรง และไม่สามารถเจริญเติบโต หรือเพิ่มจำนวนได้อีกต่อไป ส่งผลให้สามารถฆ่าเชื้อได้ภายในระยะเวลาสั้นลง ในกรณีของสารละลาย citral พบว่า ที่ความเข้มข้น 2 เท่า สามารถฆ่าแบคทีเรีย *S. sobrinus* ATCC 33478 ได้ 100% ภายใน 24 ชั่วโมง และ *S. mutans* ATCC 25175 ภายใน 12 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 4xMIC citral สามารถฆ่าเชื้อได้ 100% ภายในเวลาเพียง 6 ชั่วโมง ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับอัตราเร็วในการฆ่าเชื้อ โดยความเข้มข้นที่สูงขึ้นสามารถลดระยะเวลาในการฆ่าเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับ methyl chavicol (MC) พบว่าสามารถฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 2 เท่า ได้ภายใน 10 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 และ 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 อย่างไรก็ตาม ผลลัพธ์ที่ได้ยังคงแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแปรผันตรงกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารละลาย ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dai et al. (2023) ซึ่งพบว่า citral ที่ความเข้มข้น 2xMIC (0.5 mg/mL) สามารถฆ่าแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ทั้งหมดภายใน 4 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า (MIC และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1/2xMIC) แสดงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อต่ำกว่าชัดเจน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสามารถเร่งการทำลายเซลล์แบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ งานวิจัยของ Wongsariya et al. (2014) ยังแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มเดียวกัน โดยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่ความเข้มข้น 2xMIC และ 4xMIC สามารถลดจำนวนแบคทีเรีย *P. gingivalis*, *S. sanguinis* และ *S. mutans* ได้ในระยะเวลาเพียง 2-8 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาจะสั้นลงเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น สาเหตุที่ความเข้มข้นของสารมีผลต่อระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ เนื่องมาจากกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย เช่น citral และ methyl chavicol เกี่ยวข้องกับการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ การรบกวนกระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์ การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลีอิก การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ oxidative stress (Burt, 2004; Ultee et al., 2002; Kavanaugh & Ribbeck, 2012; Sharifi-Rad et al., 2017)

4.3 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย *S. sobrinus* ATCC 33478 ดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อนำทำการคำนวณค่า Fractional Inhibitory Concentration Index: FICI (ตารางที่ 6) ไม่พบการเสริมฤทธิ์ของสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด เนื่องจากมีค่า FICI ที่สูงกว่า 0.5 จึงเป็นข้อบ่งชี้ให้เห็นว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์กันของสารละลาย citral และ methyl chavicol และจากการศึกษาการต้านการเจริญของแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 25175 (ตารางที่ 7) จากการคำนวณ FICI ดังแสดงในตารางที่ 8 ไม่พบการไม่พบการเสริมฤทธิ์ของสารละลาย citral และ methyl chavicol เนื่องจากมีค่า FICI สูงกว่า 0.5

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของสารละลายผสมระหว่างสาร citral และ methyl chavicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478

methyl chavicol /citral (% v/v)	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125
0.002	+	+	+	-	-	-
0.004	+	+	+	-	-	-
0.008	+	+	+	-	-	-
0.016	+	+	+	-	-	-
0.031	+	+	+	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.063	+	+	+	-	-	-
0.125	+	+	+	-	-	-

+ พบการเจริญของเชื้อ - ไม่พบการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 6 แสดงค่า FICI ของสารละลายผสมระหว่างสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478

methyl chavicol /citral (% v/v)	0.031	0.063	0.125
0.002	1.004	2.004	4.004
0.004	1.008	2.008	4.008
0.008	1.016	2.016	4.016
0.016	1.031	2.031	4.031
0.031	1.063	2.063	4.063
0.063	1.125	2.125	4.125
0.125	1.250	2.250	4.250

ตารางที่ 7 แสดงความเข้มข้นของสารละลายผสมระหว่างสาร citral และ methyl chavicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175

methyl chavicol /citral (% v/v)	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125
0.002	+	+	+	+	-	-
0.004	+	+	+	+	-	-
0.008	+	+	+	+	-	-
0.016	+	+	+	+	-	-
0.031	+	+	+	+	-	-
0.063	+	+	+	+	-	-
0.125	+	+	+	+	-	-

+ พบการเจริญของเชื้อ - ไม่พบการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงค่า FICI ของสารละลายผสมระหว่างสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175

methyl chavicol/citral (% v/v)	0.063	0.125
0.002	1.004	2.004
0.004	1.008	2.008
0.008	1.016	2.016
0.016	1.031	2.031
0.031	1.063	2.063
0.063	1.125	2.125
0.125	1.250	2.250

จากการคำนวณค่า Fractional Inhibitory Concentration Index: FICI ซึ่งจะบอกถึงค่าดัชนีที่ใช้ประเมินศักยภาพการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ของสาร 2 ชนิดในการยับยั้งจุลชีพ พบว่าสาร citral และ methyl chavicol ไม่แสดงฤทธิ์เสริมกัน (no synergistic effect) โดยพิจารณาจากค่า FICI ซึ่งผลจากการทดลองจะเห็นได้ว่าค่า FICI มีค่า มากกว่า 0.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองไม่พบการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน (indifferent interaction) ทั้งนี้การเกิด หรือไม่เกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสองชนิดขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ทั้งในระดับโครงสร้างเคมี กลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากงานวิจัยของ Andrés Martínez et al. (2021) ที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย (essential oils: EOs) 15 ชนิดต่อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* พบว่ากลุ่มน้ำมัน LTC II (*lippia origanoides* thymol–carvacrol II chemotype) และ TV (*thymus vulgaris*) มีแนวโน้มแสดงฤทธิ์เสริมกัน เนื่องจากมีองค์ประกอบรองอย่าง γ -terpinene p -cymene และ trans- β -caryophyllene ซึ่งแม้ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์แบบรายตัวอย่างชัดเจน แต่สารเหล่านี้สามารถช่วยเพิ่มศักยภาพของสารฟีนอลิกหลัก เช่น thymol และ carvacrol อย่างไรก็ตาม ลักษณะของการเสริมฤทธิ์กันในน้ำมันหอมระเหย ไม่ได้เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นเสมอไป ดังที่เห็นได้จากงานวิจัยของ Isabela de Oliveira Carvalho et al. (2020) ที่ทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างน้ำมันหอมระเหย 13 ชนิดกับคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต โดยใช้วิธีเช็ทเกอร์บอร์ด พบว่า เฉพาะน้ำมันหอมระเหยจากไธม์ (thyme) เท่านั้นที่มีฤทธิ์เสริมกัน ส่วนชนิดอื่นไม่แสดงผลเช่นนั้น สอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยปัจจุบัน ซึ่งแสดงว่า citral และ methyl chavicol ไม่ได้เสริมฤทธิ์กันแต่อย่างใด การที่ citral และ methyl chavicol (MC) ไม่แสดงฤทธิ์เสริมกัน อาจเป็นผลจากลักษณะเชิงโครงสร้างเคมีและกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดย citral เป็นแอลดีไฮด์โมโนเทอร์ปีน ซึ่งสามารถแทรกซึมเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับกรดอะมิโนในโปรตีนที่เยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

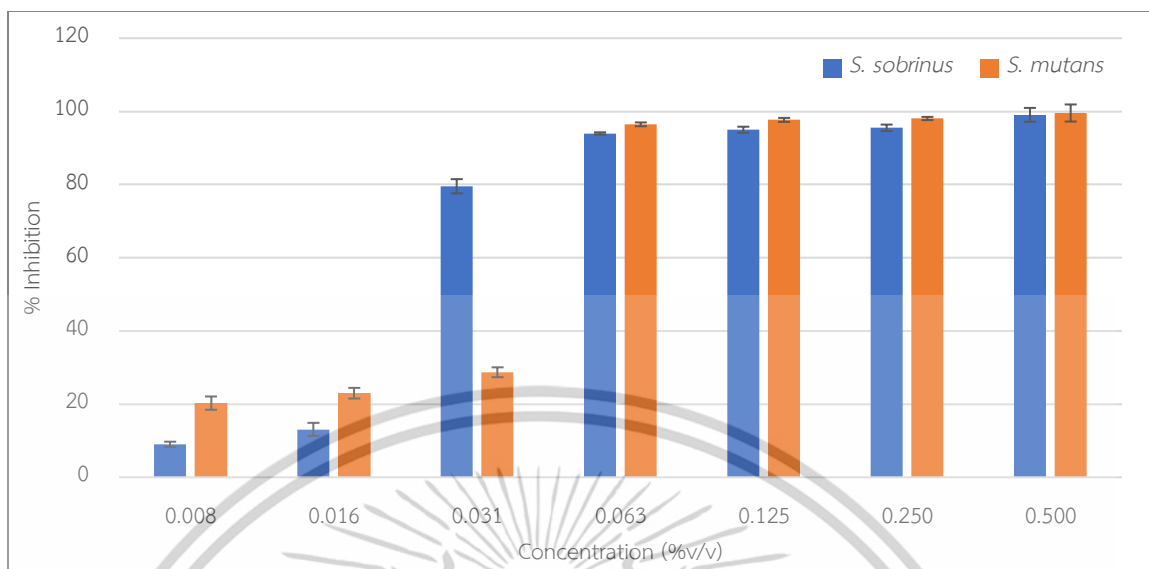
หุ้มได้ (เช่น cysteine) ผ่านกลไก electrophilic addition ทำให้เกิดการรบกวนโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เร็ว (Dai et al., 2023; Gutiérrez-Pacheco et al., 2023) กว่าการใช้สารละลาย MC ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟีนิลโพรพาน มีโครงสร้างที่มีวงเบนซีนเมธอกซี ซึ่งออกฤทธิ์โดยการปิดกั้นการทำงานของ sodium channel และอาจเกี่ยวข้องข้องกับการเหนี่ยวนำการเกิด ROS และการทำลาย DNA (Wongsariya et al., 2024; Chukwuma et al., 2023) ถึงแม้ว่าทั้งสองสารมีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยรวม แต่การออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยสารละลาย citral สามารถทำปฏิกิริยาได้ทุกจุดของเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ MC จะสามารถออกฤทธิ์ได้แค่กับ sodium channel ซึ่งมีปริมาณการเข้าทำปฏิกิริยาน้อยกว่าและช้ากว่าสารละลาย citral จึงอาจเป็นสาเหตุให้ไม่มีการฤทธิ์เสริมกัน

4.4 การทดสอบความสามารถของสารละลายของ citral และ methyl chavicol ในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์ม

จากการทดสอบความสามารถของสารละลาย citral และ methyl chavicol ในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 พบว่าสารละลาย citral มีความสามารถในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ได้มากถึงร้อยละ 93.984 และ 96.464 ตามลำดับ ณ ความเข้มข้นของสารละลายที่ 0.063 % v/v ดังแสดงในตารางที่ 9 (กราฟที่ 5) และพบว่าสารละลาย methyl chavicol มีความสามารถในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ได้มากถึงร้อยละ 94.368 และ 95.641 ตามลำดับ ณ ความเข้มข้นของสารละลายที่ 1 และ 0.250 % v/v ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 (กราฟที่ 6) ตารางที่ 9 แสดงร้อยละการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารละลาย citral

Concentration (%v/v)	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
0.008	9.024±0.704 ^a	20.271±1.817 ^a
0.016	13.102±1.782 ^b	22.984±1.456 ^a
0.031	79.545±1.948 ^c	28.699±1.350 ^b
0.063	93.984±0.306 ^d	96.464±0.524 ^c
0.125	94.987±0.835 ^d	97.675±0.550 ^c
0.250	95.521±0.874 ^d	98.062±0.436 ^c
0.500	99.064±1.895 ^e	99.564±2.336 ^c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

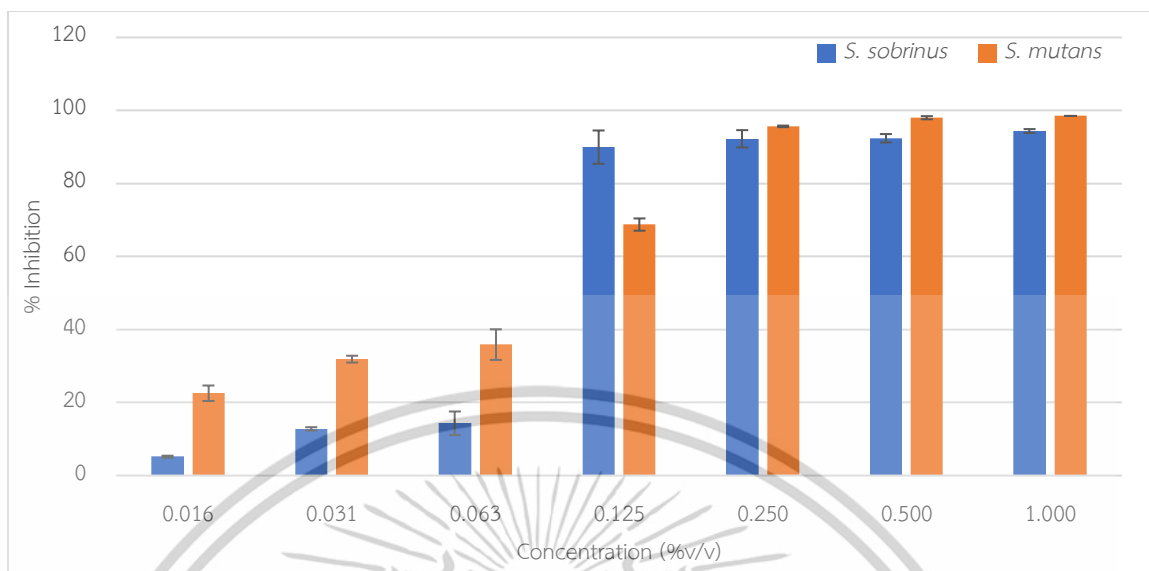


กราฟที่ 5 แสดงร้อยละความสามารถการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย citral

ตารางที่ 10 แสดงร้อยละการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารละลาย methyl chavicol

Concentration (%v/v)	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
0.016	5.175±0.264 ^a	22.540±2.124 ^a
0.031	12.785±0.457 ^b	31.880±0.940 ^b
0.063	14.307±3.240 ^b	35.866±4.199 ^b
0.125	89.954±4.566 ^c	68.742±1.685 ^c
0.250	92.237±2.373 ^c	95.641±0.216 ^d
0.500	92.390±1.149 ^c	98.007±0.431 ^d
1.000	94.368±0.527 ^c	98.506±0.000 ^d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟที่ 6 แสดงร้อยละความสามารถการยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย methyl chavicol

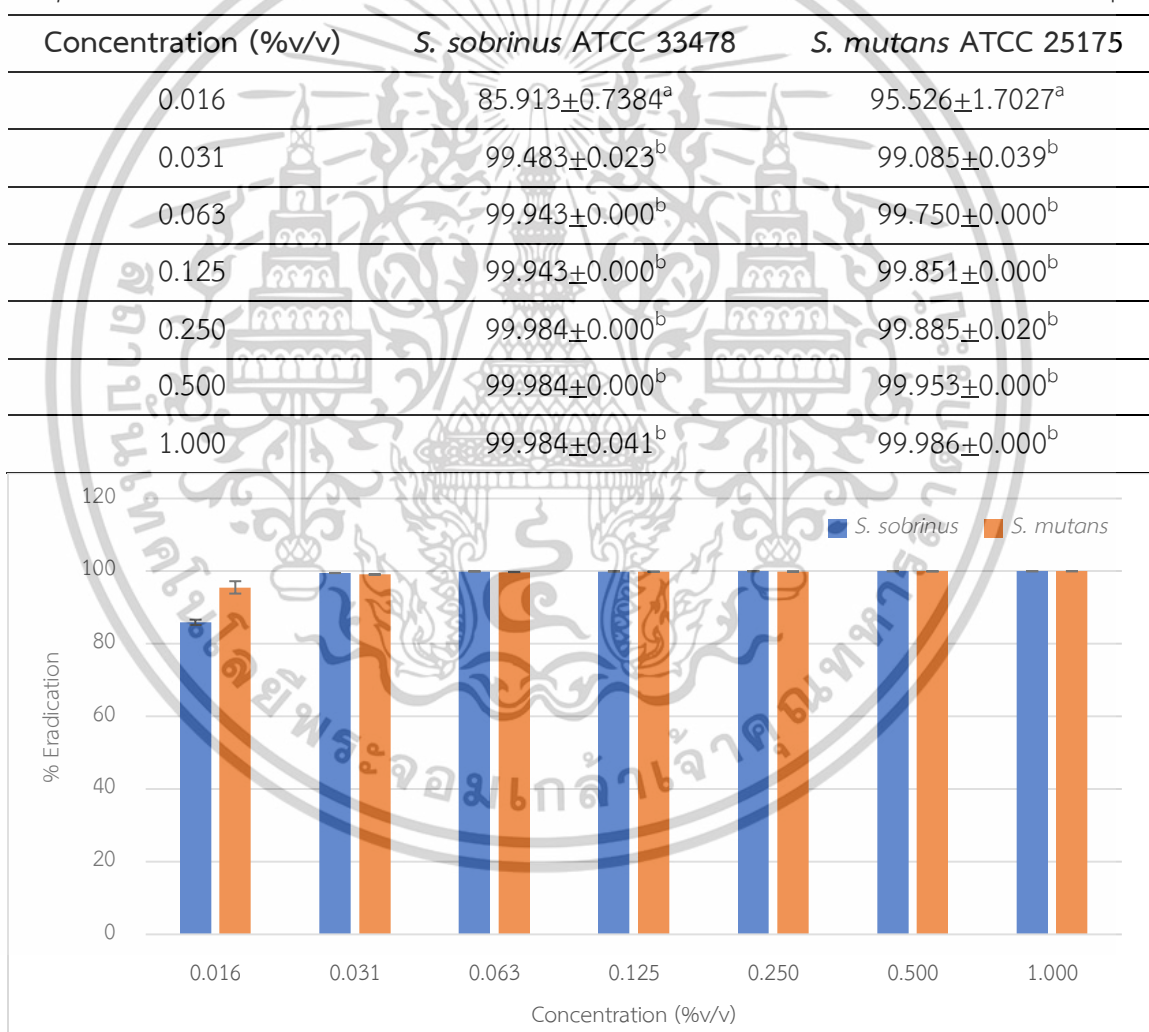
จากการทดสอบพบว่า citral และ methyl chavicol มีประสิทธิภาพสูงในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และ *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะเมื่อใช้ในความเข้มข้นที่ 1xMIC (Minimum Inhibitory Concentration) หรือสูงกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ต้านการก่อตัวของไบโอฟิล์มที่มากขึ้นตามความเข้มข้นของสาร (concentration-dependent manner) ในกรณีของ citral พบว่าที่ความเข้มข้น 1xMIC 2xMIC และ 4xMIC สามารถลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. sobrinus* ATCC 33478 ได้ถึง 79.545% 93.984% และ 94.987% ตามลำดับ และสำหรับแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 25175 สามารถลดได้ถึง 96.464% 97.675% และ 98.062% ตามลำดับ ส่วน methyl chavicol ที่ความเข้มข้น MIC และ 2xMIC ก็แสดงผลการยับยั้งไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. sobrinus* ATCC 33478 ได้ 92.390% และ 94.368% ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 25175 อยู่ที่ 98.007% และ 98.506% ตามลำดับ ซึ่งให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิดมีความสามารถลดการก่อตัวได้เกิน 90% ซึ่งจัดได้ว่ามีศักยภาพสูงในการใช้ควบคุมเชื้อที่ก่อให้เกิดฟันผุ สาเหตุที่สารทั้งสองแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งไบโอฟิล์มได้ดี เนื่องจากกลไกในการทำลายโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย เมื่อความเข้มข้นของสารสูงกว่าความเข้มข้น MIC สารจะมีความสามารถแทรกซึมเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ที่มากกว่าที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้มากกว่า โดยเซลล์ที่ได้รับผลกระทบจะสูญเสียสมดุลภายใน ไม่สามารถผลิตสารชีวโมเลกุลที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต และสร้างไบโอฟิล์มได้ ส่งผลให้ปริมาณไบโอฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์ม

จากการทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์ม ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารละลาย citral มีความสามารถในการฆ่าแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มที่ร้อยละ 99 ที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ร้อยละ 0.031 ดังแสดงในตารางที่ 11 (กราฟที่ 6) และพบว่า methyl chavicol มีความสามารถในการฆ่าแบคทีเรีย *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มที่ร้อยละ 99 ที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ร้อยละ 0.125 ดังแสดงในตารางที่ 12 (กราฟที่ 7)

ตารางที่ 11 แสดงร้อยละการกำจัดแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มของสารละลาย citral ที่ความเข้มข้นต่างๆ



กราฟที่ 7 แสดงร้อยละความสามารถในการกำจัดแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มของสารละลาย citral

ตารางที่ 12 แสดงร้อยละการกำจัดแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มของสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Concentration (%v/v)	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
0.016	64.927±0.416 ^a	68.448±4.325 ^a
0.031	65.709±0.248 ^b	68.956±3.653 ^a
0.063	68.826±0.474 ^c	71.112±0.935 ^a
0.125	99.809±0.030 ^d	99.746±0.016 ^b
0.250	99.896±0.000 ^d	99.909±0.016 ^b
0.500	99.896±0.000 ^d	99.946±0.000 ^b
1.000	100.000±0.000 ^d	99.991±0.016 ^b



กราฟที่ 8 แสดงร้อยละความสามารถในการกำจัดแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ภายใต้ไบโอฟิล์มของสารละลาย methyl chavicol

จากการศึกษาการทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์มพบว่าสาร citral และ methyl chavicol มีความสามารถในการฆ่าเชื้อภายใต้ไบโอฟิล์มได้มากถึง 90% ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 1/2×MIC เนื่องจากสารทั้งสองสามารถแทรกซึมผ่านช่องว่างในไบโอฟิล์มที่แบคทีเรียใช้ในการสื่อสารระหว่างเซลล์ (quorum sensing) ทำให้สามารถเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ภายในได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kavanaugh และ Ribbeck (2012) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อการกำจัดเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginos* ภายใต้สภาวะที่มีการสร้างไบโอฟิล์ม และได้พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

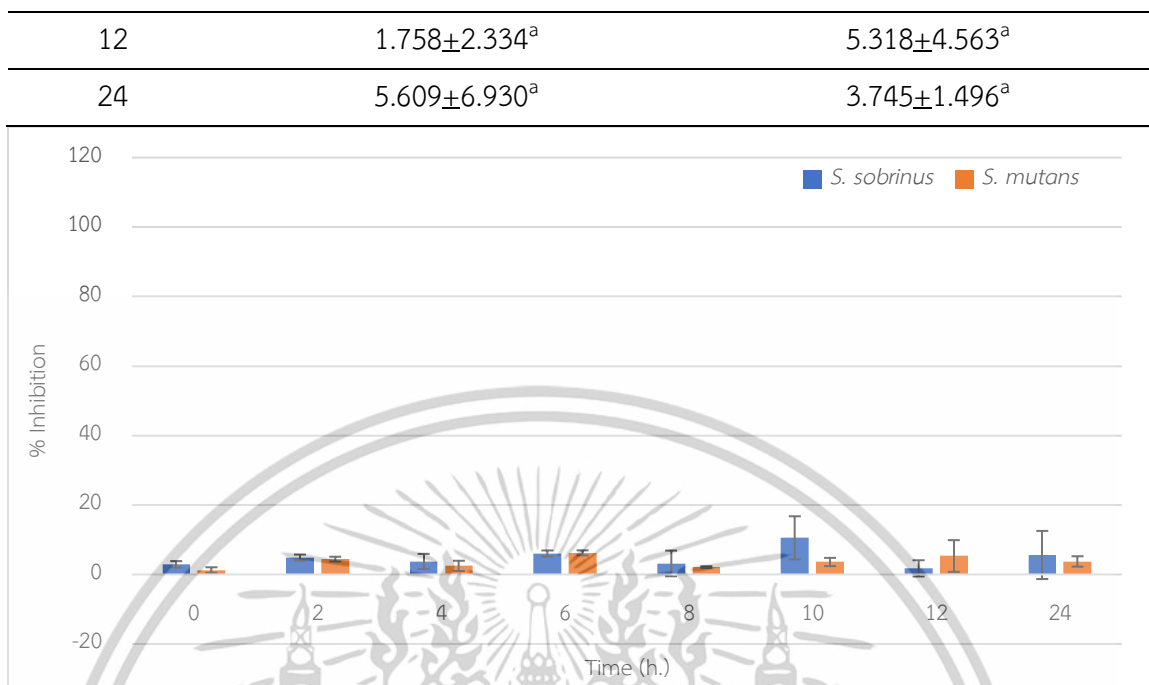
การศึกษาสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียภายใต้ไบโอฟิล์มได้มากกว่า 99% ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง แม้จะ ใช้ในความเข้มข้นต่ำกว่าค่าควบคุม (sub-MIC) โดยกลไกที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ ความสามารถในการซึมผ่านโครงสร้างของไบโอฟิล์ม และการรบกวนกลไกการสื่อสารของเซลล์ (quorum sensing) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างและคงตัวอยู่ภายใต้ไบโอฟิล์มได้ แนวคิดที่ว่าสารที่สามารถซึมผ่านโครงสร้างไบโอฟิล์มได้ จากงานวิจัยนี้บ่งชี้ถึงแนวโน้มที่สารจะสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียภายใต้ไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ใช้ในปริมาณที่ไม่สูงมาก โดยกลไกดังกล่าวที่เป็นสาเหตุสำคัญคือ น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการซึมผ่านโครงสร้างของไบโอฟิล์ม ซึ่งปกติจะทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันแบคทีเรีย ทำให้สามารถเข้าถึงและทำลายเซลล์ที่ฝังตัวอยู่ภายในไบโอฟิล์มได้ ซึ่งผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับการค้นพบของ Wongsariya et al. (2014) ที่ศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดและสาร methyl chavicol โดยพบว่าสามารถฆ่าเซลล์ในไบโอฟิล์มได้ถึง 80% และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* ATCC 33478 ได้อย่างชัดเจนในระดับ MIC MBC และแม้แต่ sub-MIC ด้วย

4.6 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการชะไบโอฟิล์ม

จากทดสอบเพื่อหาระยะเวลาใช้ในการชะไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 พบว่าสารละลาย citral และ methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 4xMIC และ 2xMIC ตามลำดับ ไม่พบความสามารถในการกำจัดไบโอฟิล์ม เนื่องจากร้อยละการลดลงของไบโอฟิล์มที่คำนวณได้จากค่าที่วัดได้ที่เวลา 0 2 4 6 8 10 12 และ 24 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของการลดลงของไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. sobrinus* ATCC 33478 และ *S. mutans* ATCC 25175 แสดงในตารางที่ 13 (กราฟที่ 9) ดังแสดงในตารางที่ 14 (กราฟที่ 10) ตารางที่ 13 แสดงร้อยละความสามารถในการชะไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC

Time (h.)	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
0	2.930±0.906 ^a	1.273±0.789 ^a
2	4.856±0.882 ^a	4.419±0.687 ^a
4	3.767±2.165 ^a	2.472±1.474 ^a
6	6.028±0.882 ^a	6.217±0.722 ^a
8	3.181±3.700 ^a	2.097±0.259 ^a
10	10.548±6.200 ^a	3.596±1.189 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

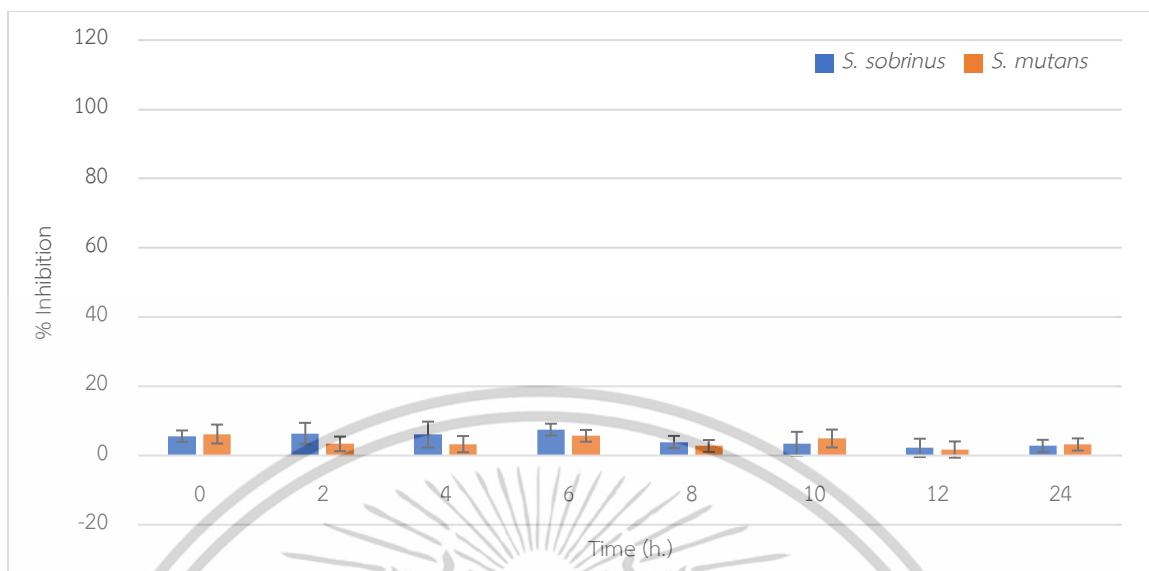


กราฟที่ 9 แสดงร้อยละความสามารถในการชะไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย citral ที่ความเข้มข้น 4xMIC

ตารางที่ 14 แสดงร้อยละความสามารถในการชะไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 2xMIC

Time (h.)	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
0	5.590±1.662 ^a	6.207±2.737 ^a
2	6.355±3.090 ^a	3.362±2.117 ^a
4	6.049±3.742 ^a	3.276±2.347 ^a
6	7.504±1.693 ^a	5.690±1.696 ^a
8	3.905±1.754 ^a	2.759±1.722 ^a
10	3.369±3.476 ^a	4.914±2.586 ^a
12	2.221±2.649 ^a	0.172±0.538 ^a
24	2.757±1.784 ^a	0.690±0.979 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟที่ 10 แสดงร้อยละความสามารถในการชะไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 และ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสารละลาย methyl chavicol ที่ความเข้มข้น $2 \times \text{MIC}$

จากการทดสอบความสามารถในการลดไปโอฟิล์มของสาร citral และ methyl chavicol พบว่าสารทั้งสองชนิดไม่มีศักยภาพในการลดคราบไปโอฟิล์มที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น แม้จะใช้ในความเข้มข้นสูงสุดของแต่ละสาร เนื่องจากสารทั้งสองไม่มีคุณสมบัติในการสลายโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดกลูแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเมทริกซ์ EPS ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตจากน้ำตาลซูโครส โดยไม่สามารถทำลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างกลูแคนแต่ละโมเลกุลได้ จึงไม่ก่อให้เกิดการลดลงของมวลไปโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ แม้สารทั้งสองชนิดจะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียภายในไปโอฟิล์มได้บางส่วน และอาจส่งผลให้โครงสร้างไปโอฟิล์ม "หลุดร่อน" หรือ "บางลง" ได้ในบางกรณี แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่าสามารถทำลายโครงสร้าง EPS ได้อย่างสมบูรณ์แบบ เทียบเท่ากับการใช้เอนไซม์เฉพาะทางที่ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ได้โดยตรง แต่อย่างไรก็ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wongsariya et al. (2024) ที่มีการศึกษาน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากจาก *Etilingera pavieana* พบว่ามีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. mutans* และ *S. sobrinus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพในระยะ planktonic cell แต่กลับไม่สามารถลดมวลชีวภาพของไปโอฟิล์มที่สร้างเสร็จแล้วได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า EO นี้ อาจเหมาะสมกับการยับยั้งการเริ่มต้นของไปโอฟิล์ม (anti-biofilm formation) มากกว่าการทำลายไปโอฟิล์มที่ก่อตัวแล้ว (biofilm eradication) แต่ยังมีรายงานวิจัยที่สนับสนุนศักยภาพของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดในการทำลายคราบไปโอฟิล์ม ไม่เพียงแต่การยับยั้งการก่อตัวเท่านั้น โดยงานวิจัยของ Ranaldi et al. (2025) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจาก *Cinnamomum verum* (อบเชย) *Origanum vulgare* (ออริกาโน) และ *Thymus vulgaris* (ไธม์) ต่อไปโอฟิล์มที่เก็บได้จากพื้นผิวจริงของกำแพงหินโบราณในห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใต้ดินของโคลอสเซียม ประเทศอิตาลี โดยใช้เทคนิค confocal laser scanning microscopy (CLSM) และการย้อมสีแบบ live/dead staining เพื่อประเมินความหนาและโครงสร้างของไบโอฟิล์ม พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 5% (v/v) สามารถลดความหนาของไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ และส่งผลให้โครงสร้างของ extracellular polymeric substances (EPS) ถูกทำลายและกระจายตัวอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงการสลายตัวของเมทริกซ์ EPS อย่างสมบูรณ์ในระดับโมเลกุล เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์ที่ย่อยพันธะเฉพาะในกลูแคนโดยตรง น้ำมันหอมระเหยเหล่านี้จึงถือเป็นทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีศักยภาพในการควบคุมการเจริญของไบโอฟิล์มในสถานที่มรดกทางวัฒนธรรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญ และการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อในกลุ่ม Oral Streptococci พบว่าสารละลาย citral มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารละลาย methyl chavicol ในด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม oral streptococci โดยสามารถออกฤทธิ์ได้ด้วยความเข้มข้นต่ำกว่าหลายเท่า ทั้งในแง่ของค่า MIC และ MBC รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ซึ่ง citral สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ในเวลาสั้นกว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่าอย่างชัดเจน ในส่วนการศึกษาฤทธิ์การต้านการก่อตัวของไบโอฟิล์ม พบว่าสารละลาย citral และสารละลาย methyl chavicol ต่างสามารถลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสารละลาย citral แสดงผลในลักษณะ dose-dependent และให้ผลดีกว่าที่ความเข้มข้นที่เท่ากันของสารทั้งสองตัว นอกจากนี้ ยังพบว่าสารทั้งสองสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มได้บางส่วน แม้ไม่สามารถทำลายโครงสร้าง EPS ได้โดยตรง เนื่องจากไม่มีฤทธิ์ย่อยพันธะกลูโคซิดิกในกลูแคน และจากการทดสอบการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารละลาย citral และสารละลาย methyl chavicol พบว่าไม่มีการเสริมฤทธิ์กัน (FICI > 0.5) โดยเป็นลักษณะของการออกฤทธิ์แยกจากกัน (indifferent interaction) สะท้อนให้เห็นว่าสารทั้งสองไม่ได้ส่งผลเสริมกันอย่างมีนัยสำคัญในการยับยั้งหรือทำลายไบโอฟิล์ม

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ citral และ methyl chavicol ในระดับโมเลกุลเพิ่มเติม เพื่อให้เข้าใจถึงวิธีที่สารเหล่านี้ยับยั้งการเจริญของเชื้อและการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างชัดเจน
2. ควรทดสอบฤทธิ์ของ citral และ methyl chavicol กับแบคทีเรียก่อโรคในช่องปากชนิดอื่น เพื่อประเมินศักยภาพของสารเหล่านี้ในมิติที่กว้างขึ้น รวมถึงการสร้างไบโอฟิล์มแบบหลายชนิด (multispecies biofilm) ซึ่งพบได้จริงในช่องปากมนุษย์
3. ควรศึกษาความเป็นพิษของสาร citral และ methyl chavicol ต่อเซลล์ของมนุษย์ในช่องปาก เพื่อประเมินความปลอดภัยในการนำไปใช้จริงในผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553. **ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้: น้ำมันหอมระเหยและสுகุณธำบัต.** กรุงเทพฯ: สำนักงานหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- กระทรวงสาธารณสุข. 2560. **รายงานผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ประเทศไทย.** นนทบุรี: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.
- กลุ่มวิจัยนวัตกรรมตรวจวินิจฉัยเชื้อดีดื้อยา. 2561. **ไบโอฟิล์ม: ผลกระทบต่อการสาธารณสุข.** วารสารสมาคมเทคโนโลยีการแพทย์แห่งประเทศไทย. 46(2): 123-130. กรุงเทพฯ: คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวิมล ทองแกมแก้ว, พิทักษ์ อยู่มี, อรวรรณ เตียรหม์พงษ์, และ อนุสรรา สีหนาท. (2559). **องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของใบกระตูดักไถ่ดำ.** มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม, มหาวิทยาลัยรังสิต และมหาวิทยาลัยนเรศวร.
- หาชัย, รัตนฎิยากรณ์. (2558). **ผลการเสริมน้ำมันหอมระเหยต่อประสิทธิภาพการผลิตของโคนม.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., & Burne, R. A. (2018). **Biology of oral streptococci.** *Microbiology Spectrum*, 6(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018>
- Adusei, E. B. A., Adosraku, R. K., Oppong-Kyekyeku, J., Amengor, C. D. K., & Jibira, Y. (2019). **Resistance modulation action, time-kill kinetics assay, and inhibition of biofilm formation effects of plumbagin from *Plumbago zeylanica* Linn.** *Journal of Tropical Medicine*, 2019, Article ID 1250645. <https://doi.org/10.1155/2019/1250645>
- Andrés Martínez, M., et al. (2021). **Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from fifteen plant species against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Synergistic interactions of minor components.** *Microorganisms*, 9(4), 682. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040682>
- Badr, M. M., Badawy, M. E. I., & Taktak, N. E. M. (2021). **Characterization, antimicrobial activity, and antioxidant activity of the nanoemulsions of *Lavandula spica* essential oil and its main monoterpenes.** *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 65, 102732. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102732>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). **Biological effects of essential oils—A review.** *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). **Essential oils in combination and their antimicrobial properties.** *Molecules*, 17(4), 3989–4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Bowen, W. H., & Koo, H. (2011). **Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms.** *Caries Research*, 45(1), 69–86. <https://doi.org/10.1159/000324598>
- Burt, S. (2004). **Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review.** *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Carvalho, I. de O., Purgato, G. A., Píccolo, M. S., Pizziolo, V. R., Coelho, R. R., Diaz-Muñoz, G., & Nogueira Diaz, M. A. (2020). **In vitro anticariogenic and biofilm activities of toothpastes formulated with essential oils.** *Journal of Applied Oral Science*, 28, e20200471. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2020-0471>
- Chiu, K.-C., Shih, Y.-H., Wang, T.-H., Lan, W.-C., Li, P.-J., Jhuang, H.-S., Hsia, S.-M., Shen, Y.-W., Chen, M. Y.-C., & Shieh, T.-M. (2021). **In vitro antimicrobial and anti-proinflammation potential of honokiol and magnolol against oral pathogens and macrophages.** *Journal of the Formosan Medical Association*, 120(2), 827–837. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.09.002>
- Dai, J., Bai, M., Li, C., Cheang, W. S., Cui, H., & Lin, L. (2023). **Antibacterial properties of citral against *Staphylococcus aureus*: From membrane damage to metabolic inhibition.** *Food Bioscience*, 53, Article 102770. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102770>
- Dai, J., Liu, W., Sun, Y., & Zhang, H. (2023). **Citral as a promising natural antimicrobial agent: Mechanisms and applications.** *Journal of Applied Microbiology*, 134(2), 345–358.

- Diaz, M. A. N., Carvalho, I. O., & Diaz, G. (2015). **Herbal dentifrices for children**. In M. Viridi (Ed.), *Emerging trends in oral health sciences and dentistry* (pp. 593–608). InTech. <https://doi.org/10.5772/59812>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). **The biofilm matrix**. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). **Biofilms: An emergent form of bacterial life**. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Firmino, N. C. S., Alexandre, F. S. O., Vasconcelos, M. A. de, Pinheiro, A. A., Arruda, F. V. S., Guedes, M. L. S., Silveira, E. R., & Teixeira, E. H. (2019). **Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral Streptococci biofilms**. *Industrial Crops and Products*, 132, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.062>
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). **Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics**. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 1–9.
- Gutiérrez-Pacheco, M. M., et al. (2023). **Citral: Biological activities and molecular mechanisms**. *Journal of Ethnopharmacology*, 310, 116539. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.116539>
- Gutiérrez-Pacheco, M. M., Torres-Moreno, H., Flores-Lopez, M. L., Velázquez Guadarrama, N., Ayala-Zavala, J. F., Ortega-Ramírez, L. A., & López-Romero, J. C. (2023). **Mechanisms and applications of citral's antimicrobial properties in food preservation and pharmaceuticals formulations**. *Antibiotics*, 12(11), 1608. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111608>
- Graves, D. T., Corrêa, J. D., & Silva, T. A. (2019). **The oral microbiota is modified by systemic diseases**. *Journal of Dental Research*, 98(2), 148–156. <https://doi.org/10.1177/0022034518805739>
- Han, Y. W., & Wang, X. (2013). **Mobile microbiome: Oral bacteria in extra-oral infections and inflammation**. *Journal of Dental Research*, 92(6), 485–491. <https://doi.org/10.1177/0022034513487559>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hajishengallis, G. (2014). **Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response.** *Journal of Dental Research*, 93(11), 1182–1191. <https://doi.org/10.1177/0022034514555802>
- Helander, I. M., et al. (1998). **Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595.
- Ifeoma Felicia Chukwuma, I. F., et al. (2023). **Mechanisms of action of plant essential oils against pathogens: A review.** *Phytotherapy Research*, 37(4), 1865–1882. <https://doi.org/10.1002/ptr.7672>
- Isabela de Oliveira Carvalho, et al. (2020). **Anticaries and antibiofilm in vitro activity of toothpaste containing essential oils.** *Archives of Oral Biology*, 118, 104860. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104860>
- Kaplan, J. B. (2010). **Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses.** *Journal of Dental Research*, 89(3), 205–218. <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
- Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). **Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms.** *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4057–4061.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). **Periodontal diseases.** *Nature Reviews Disease Primers*, 3, Article 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- Klein, M. I., et al. (2022). **Oral streptococci: Modulators of health and disease.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1357631. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1357631>
- Kolenbrander, P. E., et al. (2010). **Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance.** *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 471–480. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
- Koo, H., Xiao, J., Klein, M. I., & Jeon, J. G. (2013). **Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms.** *Journal of Bacteriology*, 195(13), 3020–3030. <https://doi.org/10.1128/JB.00079-13>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kuramitsu, H. K., et al. (2018). **Interspecies interactions within oral microbial communities**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(4), e00020-18. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-18>
- Lambert, R. J. W., et al. (2001). **A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol**. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462.
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). **The oral microbiota: dynamic communities and host interactions**. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
- Lemos, J. A., et al. (2019). **The biology of *Streptococcus mutans***. *Microbiology Spectrum*, 7(1), GPP3-0051-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiotspec.GPP3-0051-2018>
- Loesche, W. J. (1986). **Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay**. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353–380.
- Lu, M., Xuan, S., & Wang, Z. (2019). **Oral microbiota: A new view of body health**. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.12.001>
- Muñoz-González, C., et al. (2015). **Oral microflora changes in young adults with orthodontic appliances**. *International Journal of Dental Hygiene*, 13(4), 257–263.
- National Center for Biotechnology Information. (2024). **Limonene**. *PubChem Compound Summary for CID 440917*. Retrieved May 26, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440917>
- National Center for Biotechnology Information. (2024). **Linalool**. *PubChem Compound Summary for CID 6549*. Retrieved May 26, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6549>
- National Center for Biotechnology Information. (2024). **β -Caryophyllene**. *PubChem Compound Summary for CID 5281515*. Retrieved May 26, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281515>
- National Center for Biotechnology Information. (2024). **Zingiberene**. *PubChem Compound Summary for CID 92774*. Retrieved May 26, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92774>

- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). **Eugenol. PubChem Compound Summary for CID 3314.** Retrieved May 26, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3314>
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). **Anethole. PubChem Compound Summary for CID 637563.** Retrieved May 26, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637563>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). **Effect of essential oils on pathogenic bacteria.** *Pharmaceuticals*, 6 (1 2) , 1 4 5 1 –1 4 7 4 . <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). **Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria.** *Food Control*, 2 0 (2) , 1 5 7 –1 6 0 . <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.007>
- Nobbs, A. H., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2009). ***Streptococcus* adherence and colonization.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3), 407–450. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-09>
- Nogueira Diaz, M. A., Carvalho, I. O., & Diaz, G. (2015). **Herbal dentifrices for children.** In *Emerging Trends in Oral Health Sciences and Dentistry.* IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/59812>
- Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). **Sociomicrobiology: The connections between quorum sensing and biofilms.** *Trends in Microbiology*, 13(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007>
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). **Periodontal diseases.** *The Lancet*, 366(9499), 1809–1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)
- Ranaldi, R., Rugnini, L., Migliore, G., Tasso, F., Gabriele, F., Spreti, N., Scuderi, F., Braglia, R., Di Martino, P., Pujia, A., & Canini, A. (2025). **The role of essential oils as eco-friendly strategy to control biofilm collected in the Colosseum (Rome, Italy).** *Applied Microbiology and Biotechnology.* <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13433-1>
- Raja Mazlan, R. N. A., Zakaria, M. P. M., & Rukayadi, Y. (2016). **Antimicrobial activity of fingerroot (*Boesenbergia rotunda* [L.] Mansf. A.) extract against *Streptococcus***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Journal of Pure and Applied Microbiology, 10(3), 1755–1761.
- Sánchez, C., Aznar, R., & Martínez, A. (2010). **The effectiveness of natural antimicrobials in the control of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats: A review.** Food Control, 21(7), 845–852.
- Sato, Y., Okamoto-Shibayama, K., & Azuma, T. (2013). **Distinctive biofilm formation and gene expression of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*.** Applied and Environmental Microbiology, 79(8), 2460–2467. <https://doi.org/10.1128/AEM.03680-12>
- Sharifi-Rad, J., et al. (2017). **Biological activities of essential oils: From plant chemocology to traditional healing systems.** Molecules, 22(1), 70.
- Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). **The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives.** Journal of Dental Research, 90(3), 294–303. <https://doi.org/10.1177/0022034510379602>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). **A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens.** Microbial Pathogenesis, 134, Article 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tonetti, M. S., & Van Dyke, T. E. (2013). **Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop.** Journal of Clinical Periodontology, 40(Suppl 14), S24–S29. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12047>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). **The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*.** Applied and Environmental Microbiology, 68(4), 1561–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>
- Wongsariya, K., Phanthong, P., Bunyapraphatsara, N., Srisukh, V., & Traidej Chomnawang, M. (2014). **Synergistic interaction and mode of action of Citrus hystrix essential oil against bacteria causing periodontal diseases.** Pharmaceutical Biology, 52(3), 273–280. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.833948>

- Wongsariya, K., Lapirattanakul, J., Chewchinda, S., & Kanchanadumkerng, P. (2024). **Anti-oral streptococci and anti-biofilm properties of *Etilingera pavieana* essential oil and its bioactive compounds proposed for an alternative herbal mouthwash.** *Heliyon*, 10(10), Article e31136. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31136>
- Whitmore, S. E., & Lamont, R. J. (2011). **Oral bacteria and cancer.** *PLoS Pathogens*, 7(3), e1001253. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001253>
- Xi, Y., Sullivan, G. A., Jackson, A. L., Zhou, G. H., & Sebranek, J. G. (2011). **Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system.** *Meat Science*, 88(3), 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.036>
- Zhu, L., Kreth, J., Cross, S. E., Gimzewski, J. K., Shi, W., & Qi, F. (2006). **Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in *Streptococcus mutans*.** *Microbiology*, 152(8), 2395–2404. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28883-0>

ประวัติผู้เขียน

นายเกษมชาติ พรหมสอน เกิดเมื่อวันที่ 24 เมษายน พุทธศักราช 2541 ณ จังหวัดอำนาจเจริญ จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนในจังหวัดอำนาจเจริญ ต่อมาเข้าศึกษาระดับปริญญาตรีที่ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาวิชาจุลอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ และสำเร็จการศึกษาในปี พุทธศักราช 2564

หลังจากสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยทำวิทยานิพนธ์เรื่อง “ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญและการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อกลุ่ม Oral Streptococci” ภายใต้การดูแลของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กานต์ วงศาริยะ

ผู้เขียนมีความสนใจในด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้สารจากธรรมชาติในการควบคุมจุลชีพก่อโรคในช่องปาก และมีโอกาสนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ IAMBEST ครั้งที่ 9 (The 9th National Conference on Informatics, Agriculture, Management, Business Administration, Engineering, Science and Technology) ในหัวข้อเรื่อง “ผลของ Citral ต่อการเจริญและการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อกลุ่ม Oral Streptococci” โดยมีชื่อผู้ร่วมวิจัย ได้แก่ เกษมชาติ พรหมสอน พิมพิกา กาญจนดำเกิง และ กานต์ วงศาริยะ

ผู้เขียนมีความตั้งใจที่จะนำความรู้ความสามารถที่ได้รับไปพัฒนาต่อในสายงานด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ และการวิจัยเพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตของประชาชนในอนาคต