ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์กะเพราบางชนิดต่อเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์
Antibacterial Activity of Some *Lamiaceae* Essential Oil Against *Streptococcus mutans*

เพลินพิศ ยะสินธิ์[1] เยี่ยมศิริ มณีพิศมัย[1] และเพชรรัตน์ ไกรวพันธุ์[2]
Yasin, P.[1], Maneepisamai, Y.[1] and Kraivaphan, P.[2]

Abstract

The research was aimed to study the inhibitory effect of essential oil from some plants in Lamiaceae against oral bacteria. The plants used in this research were *Ocimum bacillicum* Linn. and *Ocimum americanum* Linn. Essential oil was isolated by water distillation method and steam distillation method. The cytotoxicity was tested by MTT method. The antibacterial activity of the oils was evaluated using disc diffusion method against *Streptococcus mutans*, which causing dental caries development. The cytotoxic effect of all 4 kinds of essential oils was not found. The antibacterial activities showed that all the oils had activity against *S. mutans*. Among these, the oil of *O. americanum* L. obtained from steam distillation which had the highest potential to inhibit *S. mutans*,

Keywords: Antibacterial Activity, Lamiaceae, *Streptococcus mutans*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในช่องปากของน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์กะเพราบางชนิด โดยพืชที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ใบโหระพา และใบแมงลัก สกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการกลั่นด้วยน้ำและการกลั่นด้วยไอน้ำ แล้วทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion method แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคือ *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสำคัญ ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดฟันผุ ผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยน้ำมันหอมระเหยจากใบแมงลักกลั่นด้วยไอน้ำ มีฤทธิ์ดีที่สุด

คำสำคัญ: ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พืชวงศ์กะเพรา สเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์

คำนำ

โรคฟันผุ เป็นโรคที่พบบ่อยในช่องปากซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญของประเทศ โดยเฉพาะประชากรในวัยเด็ก (Nathawut ,2013) โรคฟันผุ มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในช่องปาก โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* เป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญ ก่อให้เกิดการรวมตัวกับเศษอาหารและน้ำลายสะสมกันจนเป็นคราบ คราบฟัน หรือคราบแบคทีเรีย ซึ่งจะเกาะอยู่บนผิวของฟันแบคทีเรียเหล่านี้จะเปลี่ยนน้ำตาลและแป้งให้เป็นกรด ทำลายผิวฟัน จนกระทั่งเกิดฟันผุตามมา (Nobuhiro และ Bente, 2010) ซึ่งผลกระทบจากการเกิดฟันผุนอกจากส่งผลทำ ให้เกิดกลิ่นปาก อาการเสียวและปวดฟัน ยังส่งผลกระทบต่อการพัฒนาด้านสติปัญญา บุคลิกภาพ และปัญหาทางโภชนาการตามมา ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องหาวิธีป้องกันและผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ ราคาไม่แพง ซึ่งผลิตภัณฑ์จากพืชจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

พืชวงศ์ Lamiaceae (วงศ์กะเพรา) เป็นพืชหอมของไทยที่มีกลิ่นหอมฉุน ทำให้ลมหายใจหอมสดชื่นใช้ปรุงอาหารทำให้มีกลิ่นหอม มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยาหลากหลาย ซึ่งพืชในวงศ์กระเพราประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เช่น eugenal, β-caryophyllene linalool, และ limonene (Wannu และคณะ, 2010) โดยพบว่า limonene เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์และระงับกลิ่นปาก (Aripin และคณะ, 2015) ฉะนั้นพืชในวงศ์กะเพรา จึงน่าจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในช่องปากที่ทำให้ฟันผุ ดังนั้นผู้วิจัยและคณะจึงมีแนวคิดที่จะทำการศึกษาโดยสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการกลั่นด้วยน้ำและกลั่นด้วยไอน้ำ พืชที่ใช้ศึกษาคือโหระพา และแมงลัก และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดฟันผุ และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้

[1] สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพ 10900
Department of Chemistry, Faculty of Science Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok 10900, Thailand
[2] สาขาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ 10400
Pharmacology Faculty of Dentistry Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

อย่างปลอดภัย ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปาก เช่น น้ำยาบ้วนปาก สเปรย์ระงับกลิ่นปาก หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพาและใบแมงลักด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำ และกลั่นด้วยไอน้ำ (อุไรวรรณ, 2549) โดยนำส่วนใบสดล้างและ หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวน 1,500 กรัม และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร โดยกลั่นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Human gingival fibroblast) โดยวิธี MTT Assay (Mosmann, 1983) เป็นการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหย เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางครั้งละ 2 เท่า ด้วย 1% DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งมีเซลล์แขวนลอยในอาหาร DMEM ปริมาณ $1x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำยา MTT เข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม**และ**นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ล้างน้ำยา MTT ออก แล้วเติม DMSO ก่อนนำไปแล้วนำไปวัดค่า A_{540} และคำนวณค่าร้อยละเซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) ดังนี้

% cell viability = 100 x (ค่าเฉลี่ย A_{540}ของน้ำมัน/ค่าเฉลี่ยของ A_{540} ของ Blank) เมื่อ Blank คือ อาหารเลี้ยงเซลล์

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี agar disc diffusion (Suparat และคณะ, 2010) โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหยเข้มข้น และกลุ่มควบคุม โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นชุดควบคุมเชิงลบ และ 0.2% chlohexidine เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ปริมาตรอย่างละ 15 ไมโครลิตรลงใน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตรปล่อยให้แห้งประมาณ 30 นาที จากนั้นวาง paper disc ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งที่ใช้เตรียมไว้ โดยใช้ *S. mutans* ที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (Inhibition Zone) รอบ paper disc ซึ่งมีลักษณะเป็นวงใสเกิดขึ้นบนอาหารแข็งหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibition Concentration; MIC) ของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้าน *S. mutans* ให้มีความเข้มข้นลดลงครั้งละ 2 เท่า แล้วทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อได้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพาสดและใบแมงลักสด ด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำและกลั่นด้วยไอน้ำนั้น พบว่าใบโหระพาสดให้เปอร์เซนต์ผลผลิตสูงกว่าใบแมงลักทั้งวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และการกลั่นด้วยไอน้ำโดยมีค่าเท่ากับ 0.36 กรัม/100 กรัม และ 0.27 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1 ซึ่งการกลั่นด้วยน้ำจะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของน้ำมันใบโหระพาสูงกว่าการกลั่นด้วยไอน้ำคิดเป็น 1.3 เท่า และความหนาแน่นของน้ำมันใบโหระพาจากวิธีการกลั่นด้วยน้ำจะสูงกว่าวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำโดยมีค่าเท่า 0.96 กรัม/มิลลิลิตร และ 0.94 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยต่อเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า น้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตเฉลี่ยอยู่ในช่วง 94.060-98.011% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ 1% DMSO มีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต 100.227% ดังแสดงใน Table 2 ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิด ที่สกัดได้จากใบโหระพา และใบแมงลัก โดยการกลั่นด้วยน้ำ และไอน้ำนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน *S. mutans* ดังแสดงใน Table 3 พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ ใบแมงลักกลั่นด้วยไอน้ำ รองลงมาคือ ใบแมงลักกลั่นด้วยน้ำ ใบโหระพากลั่นด้วยไอน้ำ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 54.3 mg/ml และใบโหระพากลั่นด้วยน้ำตามลำดับ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบแมงลัก จากรายงานของ Belong และคณะ (2013) พบว่า สารองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากใบแมงลักที่วิเคราะห์ด้วย GC/MS นั้นประกอบด้วย linalool (53.8%), limonene (22.2%), eugenol (9.5%) และ α-cardinol (2.4%) ซึ่งสอดคล้องกับ Hanada และคณะ (2005) ที่พบว่า limonene มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในช่องปากและระงับกลิ่นปาก และรายงานของ Moon และคณะ (2011) ที่พบว่า eugenol มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในช่องปากที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดฟันผุด้วย

สรุปผล

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพาสดและใบแมงลักสด ด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำและกลั่นด้วยไอน้ำนั้น ใบโหระพาสดให้เปอร์เซนต์ผลผลิตสูงกว่าใบแมงลักทั้งวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และการกลั่นด้วยไอน้ำ น้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิด ที่สกัดได้จากใบโหระพา และใบแมงลัก โดยการกลั่นด้วยน้ำ และไอน้ำนั้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT น้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ ใบแมงลักกลั่นด้วยไอน้ำ รองลงมาคือ ใบแมงลักกลั่นด้วยน้ำ ใบโหระพากลั่นด้วยไอน้ำ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 54.3 mg/ml และใบโหระพากลั่นด้วยน้ำตามลำดับ

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษมในการสนับสนุนงบประมาณการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, 2549, การสกัดแยกสาร และน้ำมันหอมระเหยจากพืชขั้นพื้นฐาน. สถาบัน ค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aripin, D., Julaeha, E., Dardjan, M. and Cahyanto, A., 2015, Chemical Composition of *Citrus spp.* and Oral Antimicrobial Effect of *Citrus spp.* Peels Essential Oils Against *Streptococcus mutans*, Padjadjaran Journal of Dentistry, 27(1): 1-11.

Moon, S.E., Kim, H.Y. and Cha, J.D., 2011, Synergistic Effect between Clove Oil and Its Major Compounds and Antibiotics Against Oral Bacteria, Archives of Oral Biology, 56(9): 907-916.

Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay, Journal of Immunological Methods, 65: 55-63.

Nathawut, K., Thananat, B., Kongvuth, L., Chavarot, M. and Jarinya, C., 2013, The Prevalence and Physical Factors Related to Dental Caries in Children-Patients at the Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University. Srinakharinwirot University Dental Journal, 6(2): 35-47.

Nobuhiro, T. and Bente, N., 2010, The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives, Journal of Dental Research, 90(3): 294-303.

Suparat, C., Sayomphol, A., Wate, S. and Noppawat, P., 2010, Antimicrobial Activity of *Alpinia conchigera* Extract on *Enterococcus faecalis* Biofilm, Thai Pharmaceutical and Health Science Journal, 5(4): 279-285.

Wannu, D., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., and Tungsangprateep, S., 2010, Chemical Composition and Antibacterial Activity of five Essential Oils. Agricultural Science Journal, 41(3/1)(Suppl.): 633-636.

Table 1 Extraction yield of essential oil

plants	Weight of leaves (kg)	Volume of oil (ml)	Weight of oil (g)	Densityof oil (g/ml)	% Yield (g/100 g)
Basil (water distillation)	4.725	17.80	17.09	0.96	0.36
Hairy Basil (water distillation)	5.913	7.10	6.11	0.86	0.12
Basil (steam distillation)	4.20	12.50	11.75	0.94	0.27
Hairy Basil (steam distillation)	3.40	3.00	2.61	0.87	0.02

หมายเหตุ สภาวะในการกลั่น: กลั่นด้วยไอน้ำภายใต้ความดันที่ 1.5 kg/cm^3 (20 psi)

Table 2 % cell viability of essential oil concentration 0-1 mg/ml of MTT assay

Essential oil	% cell viability
Basil (Water Distillation)	97.155
Basil (Steam Distillation)	94.060
Hairy Basil (Water Distillation)	98.011
Hairy Basil (Steam Distillation)	96.505
1% DMSO	100.277

Table 3 Antibacterial activity of Essential against *S. mutans*

Essential oil	Inhibition zone (diameter-mm)						MIC
	Conc	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	(mg/ml)
Basil (Water Distillation)	12	12	9	-	-	-	238.8 (1:4 v/v)
Basil (Steam Distillation)	> 30	> 30	23	11	-	--	107.9 (1:8 v/v)
HairyBasil (Water Distillation)	15	14	13	12	12	--	58.7 (1:16 v/v)
Hairy Basil (Steam Distillation)	> 30	> 30	> 30	18	8	-	54.3 (1:16 v/v)

Remark: - Inhibition zone (IZ) does not occur, IZ ≤ 8 mm indicates low antifungal activity, IZ from 9-11 mm indicates intermediate activity, and IZ ≥ 12 indicates strong activity