

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้บ้าน
ต่อการต้านเชื้อก่อโรคและเชื้อก่อโรคดื้อยาแกรมลบกลุ่ม ESBL
CHEMICAL COMPOSITIONS AND BIOACTIVE COMPOUNDS
OF LEMONGRASS ESSENTIAL OILS AGAINST MICROBIAL
PATHOGEN AND DRUG-RESISTANT EXTENDED SPECTRUM
 β -LACTAMASE (ESBL) PRODUCING GRAM-NEGATIVE

สิริมาภรณ์ วัชรกุล^{1*} ฤทัยทิพ อนอมูณี² และเสาวคนธ์ อินทร์ด้วง³

Sirimaporn Watcharakul^{1*}, Ruethaithip Anomunee² and Saowakon Indoung³

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้บ้านในพื้นที่คาบสมุทรสทิงพระ จังหวัดสงขลา โดยการสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) ซึ่งพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายถึง 260 ชนิดและพบสารสำคัญที่เป็นเอกลักษณ์ทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้กลุ่ม monoterpene ทั้งชนิด terpene aldehyde และ terpene alcohol ในรูปของ citral, neral, geranial, geraniol และสารอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและดื้อยาจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* SP1, *Streptococcus pyogenes* SV1,

¹ศูนย์ทรัพยากรจุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

¹Microbial resources and utilization center, Songkhla Rajabhat University, Muang District, Songkhla Province 90000

²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

²Faculty of Sciences and technology, Songkhla Rajabhat University, Muang District, Songkhla Province 90000

³คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

³Faculty of Veterinary Sciences, Prince of Songkla University, Hatyai District, Songkhla Province 90110

*corresponding author e-mail: Sirimaporn.wa@skru.ac.th

Received: 24 September 2023; Revised: 10 November 2023; Accepted: 17 November 2023

DOI: <https://doi.org/10.14456/lsej.2024.2>

Escherichia coli A3 (ESBLs), *Pseudomonas aeruginosa* A2 (ESBLs), *Klebsiella pneumoniae* A1 (ESBLs) โดยวิธี Disc Diffusion Assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านที่สกัดได้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. pyogenes* ได้ดีที่สุดโดยมีขนาดวงใสการยับยั้งเท่ากับ 34.55 ± 0.25 มิลลิเมตรและมีความสามารถในการต้านเชื้อก่อโรคต่อยาได้ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. coli* A3 (ESBL) ได้ดีที่สุดโดยมีขนาดวงใสการยับยั้ง 11.38 ± 0.99 มิลลิเมตรและมีขนาดวงใสการยับยั้งใกล้เคียงกับเชื้อ *K. pneumoniae* A1 (ESBL) ซึ่งมีขนาด 9.99 ± 0.25 มิลลิเมตร

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อดื้อยา น้ำมันหอมระเหย ตะไคร้

Abstract

The purpose of this study was to investigate and analyze the chemical compositions and major components of essential oils extracted from lemongrass leaves in the Sathing Phra Peninsula, Songkhla Province. Lemongrass was extracted by steam distillation, and its chemical composition was analyzed using Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). It was discovered that the extracted essential oil contained up to 260 different chemical components, with important substances unique to the chemistry of lemongrass essential oil found in the monoterpene group, both terpene aldehyde and terpene alcohol in the form of citral, neral, geranial, geraniol, and others. In addition, there was a study of the effectiveness of lemongrass essential oil against six strains of pathogenic bacteria and drug-resistant bacteria, such as *Escherichia coli* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* SP1, *Streptococcus pyogenes* SV1, *Escherichia coli* A3 (ESBLs), *Pseudomonas aeruginosa* A2 (ESBLs), *Klebsiella pneumoniae* A1 (ESBLs). The disc diffusion assay method discovered that the extracted lemongrass essential oil had antimicrobial properties, with the most effective strain being *S. pyogenes*, which had an zone of inhibition size of 34.55 ± 0.25 millimeters and could against all three strains of drug-resistant pathogens, with the highest efficiency against *E. coli* A3 (ESBLs), which had an inhibition zone size of 11.38 ± 0.99 millimeters and inhibition zone size of Inhibits resemble to *K. pneumoniae* A1 (ESBLs), which has a size of 9.99 ± 0.25 millimeters.

Keywords: antibacterial, drug resistance, essential oils, lemongrass

บทนำ

พื้นที่คาบสมุทรสทิงพระ จังหวัดสงขลาเป็นชุมชนโบราณซึ่งเป็นพื้นที่คาบสมุทรที่เกิดจากการทับถมของตะกอนทะเล (marine sediment) เกิดเป็นแผ่นดินงอกยื่นไปในทะเล มีความสมบูรณ์ของแร่ธาตุและสารอาหารสูงเหมาะแก่การเพาะปลูก (Tanongsak, 2020) พืชในแหล่งนี้จึงมีความอุดมสมบูรณ์ โดยเฉพาะตะไคร้บ้านที่เป็นพืชท้องถิ่นมีอยู่แทบทุกครัวเรือนในพื้นที่นี้ ตะไคร้บ้านเป็นพืชที่มีศักยภาพในการให้น้ำมันหอมระเหยชนิดหนึ่งซึ่งมีรายงานพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เชื้อไวรัส เชื้อราและสามารถลดการอักเสบได้ดี มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรีพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีองค์ประกอบหลายชนิด เช่น β -myrcene 6-methyl-5-hepten-2-ol D-limonene eugenol isopulegol dipentene linalool citronellal citronellol และ geraniol เป็นต้น ซึ่งมีประโยชน์ในด้านอายุรเวทเนื่องจากมีสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือ citronellal citronellol และ geraniol มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามองค์ประกอบทางเคมีของตะไคร้บ้านที่พบมีความแตกต่างกันตามแหล่งเพาะปลูกเนื่องจากสภาพภูมิประเทศ อากาศ และดินทำให้ประสิทธิภาพการเป็นยาแตกต่างกันตามปริมาณสารสำคัญที่พบ (Nitish et al., 2021) ทั้งยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังซึ่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้านสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* *Staphylococcus epidermidis* ได้ (Supharat et al., 2020) และยังสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus agalactiae* และ *E. coli* ได้อีกด้วย (Adcharatt et al., 2012) และพบว่าสามารถลดการสร้างฟิล์มที่ช่วยในการเกาะติดของเชื้อ *S. aureus* ที่ก่อให้เกิดการอักเสบและเกิดหนองได้ (Mehdi et al., 2017)

สถานการณ์โรคติดเชื้อเป็นปัญหาสำคัญซึ่งพบเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของผู้ป่วยในโรงพยาบาลของประเทศไทยทั้งยังพบว่าการติดเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นสาเหตุให้การรักษาดำเนินเวลานานขึ้นและมีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น บางกรณีไม่สามารถรักษาชีวิตผู้ป่วยไว้ได้และพบการแพร่กระจายของเชื้อไปยังบุคคลากรทางการแพทย์อีกด้วย ในการรักษาโรคติดเชื้อมีการใช้ยาปฏิชีวนะ หากมีการใช้ยาที่มากเกินไปจนความจำเป็นทำให้เชื้อพัฒนาเป็นเชื้อดื้อยาและก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อดื้อยามากขึ้น (Phuntip et al., 2023) โดยเฉพาะเชื้อที่พบการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากที่สุด ได้แก่ *E. coli* *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* (Bamrasnaradura infectious diseases institute, 2020) เชื้อกลุ่มนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อดื้อยาในกลุ่ม penicillin และ cephalosporin รุ่นที่ 1 และ 2 โดยมีการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ชนิดใหม่ คือ เอนไซม์ extended spectrum β -lactamases (ESBLs) ที่สามารถทำลายยาปฏิชีวนะกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 ได้ ในปัจจุบันพบว่าเชื้อดื้อยาในกลุ่ม ESBLs ได้แพร่ระบาดไปยังหลายประเทศทั่วโลก (Suwaree, 2016) การศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อกลุ่มนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเนื่องจากสมุนไพรเป็นสารจากธรรมชาติที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน

หลากหลายทำให้กลไกการดื้อยาเกิดขึ้นได้ยากทั้งการนำสมุนไพรที่มีในท้องถิ่นที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคมาใช้ในการรักษาหรือใช้ในการรักษาร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศที่มีราคาแพงและเพิ่มโอกาสในการเข้าถึงยาของผู้ป่วยได้มากขึ้น

ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้บ้านที่สกัดด้วยวิธีกลั่นไอน้ำต่อความสามารถในการต้านเชื้อก่อโรคและเชื้อก่อโรคดื้อยาแกรมลบกลุ่ม ESBLs ซึ่งปัจจุบันพบว่ายังไม่มีรายงานผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้านต่อเชื้อดื้อยา กลุ่ม drug-resistance-ESBLs ทั้งนี้การศึกษาสมุนไพรท้องถิ่นที่หาง่าย เช่นตะไคร้ทำให้ตระหนักถึงคุณค่าของสมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ทางยา หาง่ายและราคาถูก สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ต่อไปได้เพื่อลดต้นทุนการนำเข้ายาที่มีราคาแพงและส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยที่มีอยู่แล้วให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการรักษาโรคและการเข้าถึงการรักษาของผู้ป่วยได้ง่าย

วิธีดำเนินการวิจัย

เตรียมตัวอย่างสมุนไพร

เก็บตัวอย่างใบตะไคร้บ้านสด (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) ในพื้นที่คาบสมุทรสหิงพระ จังหวัดสงขลา (7.4661° N, 100.4172° E) เลือกใบที่สมบูรณ์ล้างและทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2x2 เซนติเมตร ผึ่งลมให้แห้ง

สกัดน้ำมันหอมระเหย

นำใบตะไคร้ไปกลั่นด้วยไอน้ำโดยใช้ชุดกลั่น Clevenger (เครื่องแก้ว Duran, Germany) กลั่นที่อุณหภูมิ 100-150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นแยกน้ำมันด้วยการสกัดกับตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทนอัตราส่วน 1:3 เติม sodium sulphate anhydrous เพื่อดึงน้ำออก นำไประเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนด้วยเครื่อง evaporator (RC600-KNF, Germany) ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและนำไปหาปริมาณร้อยละของผลผลิตของน้ำมันหอมระเหย (% yield)

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้ ด้วย GC-MS (Agilent Technologies 7890 B/MS/MS7000D, USA) คอลัมน์ GC Column J&W VF-WAXms ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ใช้ Helium (He) เป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ฉีด 1 ไมโครลิตร ฉีดตัวอย่างแบบ split ratio 50: 1 และใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิโดยตั้งอุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้น 45 องศาเซลเซียส ให้อุณหภูมิคงที่ 2 นาที โดยเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนกระทั่งอุณหภูมิถึง 250 องศาเซลเซียสให้อุณหภูมิคงที่ 34 นาที อุณหภูมิของส่วน MS Source ใช้ 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุด 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของส่วน MS Quad 150 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุด 200 องศาเซลเซียส ช่วงมวลในการวิเคราะห์ 35-500 amu ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดรวม 100 นาที

หลังจากการแยกแสร้งผสมบริสุทธิ์ จากนั้นบันทึกผลเป็นโครมาโทแกรมและประเมินผลโดยเทียบค่า retention time และ mass spectrum ขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้ แต่ละพีคที่ได้กับค่า retention time และ mass spectrum ของค่ามาตรฐานที่บันทึกไว้ใน library โดยพิจารณาสารประกอบที่มีร้อยละพื้นที่ทั้งหมดมากกว่าร้อยละ 0.01

เตรียมเชื้อทดสอบ

นำเชื้อทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มเชื้อก่อโรคได้แก่ *E. coli* A3 (ESBLs), *P. aeruginosa* A2 (ESBLs) และ *K. pneumoniae* A1 (ESBLs) กลุ่มเชื้อก่อโรคทั่วไป ได้แก่ *S. aureus* SP1, *S. pyogenes* SV1 และ *E. coli* ATCC 29523 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10^8 CFU/mL เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion agar โดยหยดน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ลงบนแผ่น paper disc (จำนวน 3 ซ้ำ) โดยการทดสอบบนอาหาร MHA ที่มีเชื้อทดสอบบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์ บันทึกผลการทดลองและประเมินผลเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Gentamicin (10 µg/disc; OXOID) และ Ceftazidime (30 µg/disc; OXOID)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยค่าเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) โดยทำการทดลองอย่างน้อยสามซ้ำ

ผลการวิจัย

การสกัดน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน

การสกัดน้ำมันหอมระเหยใบตะไคร้บ้านด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำได้น้ำมันหอมระเหยที่มีลักษณะใส สีเหลืองอ่อน ไม่มีตะกอนแขวนลอย (Figure 1) เมื่อหาปริมาณร้อยละของผลผลิต (% yield) ของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดพบว่าใบตะไคร้บ้านให้ปริมาณร้อยละผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยสูงถึงร้อยละ 9.40 โดยน้ำหนัก

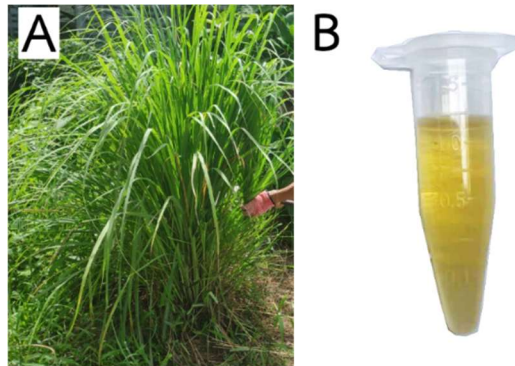


Figure 1 Lemongrass leaf (A) Lemongrass leaf essential oils from steam-distillation extraction techniques (B)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้บ้านที่เพาะปลูกในพื้นที่คาบสมุทรสงทิงพระ ด้วยวิธี GC-MS พบองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 260 ชนิด เมื่อพิจารณาจากค่าร้อยละของปริมาณสารทั้งหมดที่พบที่ค่ามากกว่า 0.01 (% of total ≥ 0.01) ทั้งยังพบสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักโดยพิจารณาจากค่าร้อยละของปริมาณสารทั้งหมดที่พบที่มากกว่า 0.3 ได้แก่ citronellal (0.88%), isoneral (1.16%), isogeranial (1.87%), neral (23.21%), citral (geranial และ neral) (28.69%), geranyl acetate (2.24%), citronellol (0.85%) และ geraniol (8.52%) และสารอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบ เช่น β -pinene (6.14%), linalool (1.55%), caryophyllene (0.52%), epoxy-linalooloxide (0.32%), 7-methyl-3-methylene-6-Octenal (0.64%) และสารอื่น ๆ เช่น D-limonene (0.04%) ที่พบเป็นสารสำคัญแต่มีปริมาณน้อยดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1) นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีและสารสำคัญของตะไคร้บ้านที่พบในพื้นที่อำเภอสงทิงพระมีความหลากหลายสูงอยู่ในกลุ่ม intermediate type grass ที่พบสารสำคัญกลุ่ม monoterpene aldehyde (isoneral และ isogeranial) และ monoterpene alcohol (geraniol และ citronellol) (Mohammad et al., 2022)

Table 1 Chemical composition of lemongrass leaves analyzed by GC/MS

No.	RT	Compounds Name	Match Factor	% of Total
1	8.1737	β -Pinene	97.8	6.14
2	9.1258	D-Limonene	97.8	0.04
3	11.1529	Trans- β -Ocimene	98.7	0.38
4	14.4317	6-methyl-5-Hepten-2-one	98.1	1.45
5	17.3146	Myroxide	86.6	0.42

Table 1 Chemical composition of lemongrass leaves analyzed by GC/MS (cont.)

No.	RT	Compounds Name	Match Factor	% of Total
6	17.7158	3-(4-methyl-3-pentenyl)- Furan	88.2	0.30
7	20.0906	Citronellal	98.6	0.88
8	21.0106	trans-Chrysanthemal	89.3	0.43
9	21.6311	7-methyl-3-methylene-6-Octenal	95.5	0.64
10	22.7115	Isoneral	99.4	1.16
11	22.9789	Linalool	98.3	1.55
12	23.7759	Isogeranial	99.5	1.87
13	24.4177	Caryophyllene	97.0	0.52
14	28.1030	Neral	97.5	23.21
15	30.0767	Citral	97.0	28.69
16	30.7934	Geranyl acetate	99.0	2.24
17	31.1464	Citronellol	99.1	0.85
18	34.0722	Geraniol	98.4	8.52
19	36.9872	Epoxy-linalooloxide	87.4	0.32
20	43.8549	Selin-6-en-4.alpha.-ol	98.1	0.43
21	57.6921	6-Methyl-4,6-bis(4-methylpent-3-en-1-yl) cyclohexa 1,3-dienecarbaldehyde	95.8	5.13

Table 2 Antimicrobial activity of lemongrass essential oil against bacterial pathogen and drug resistant ESBLs

No.	Pathogens	Inhibition zone (mm±SD)		
		Lemongrass EO (10 µg/disc)	Gentamicin (10 µg/disc)	Ceftazidime (30 µg/disc)
1	<i>Escherichia coli</i> A3 (ESBLs)	11.38±0.99	16.07±0.12	20.5±0.39
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC25923	10.22±0.16	15.19±0.74	23.85±0.16
3	<i>Staphylococcus aureus</i> SP1	16.55±0.21	20.12±0.22	23.95±0.51
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A2 (ESBLs)	6.17±1.99	20.52±0.35	26.03±0.68
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> A1 (ESBLs)	9.99±0.25	21.44±0.87	20.65±0.9
6	<i>Streptococcus pyogenes</i> SV1	34.55±0.25	25.28±0.14	32.06±0.19

Remark Disc diffusion assay was performed in triplicate experiment.,“±” mean that the standard deviation (Mean±SD, N=3)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion assay

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและกลุ่มดื้อยา (ESBLs) ทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งกลุ่มเชื้อก่อโรคทั่วไปและเชื้อก่อโรคดื้อยาโดยให้ค่าเฉลี่ยของวงใสการยับยั้งเชื้อ *S. pyogenes* SV1 มากที่สุดถึง 34.55 ± 0.25 มิลลิเมตร รองลงมาเป็น *S. aureus* SP1 ขนาดวงใสการยับยั้งเท่ากับ 16.15 ± 0.21 มิลลิเมตร และเชื้อ *E. coli* ATCC25923 ขนาด 10.22 ± 0.16 มิลลิเมตร ในขณะที่ประสิทธิภาพการต้านเชื้อดื้อยาแกรมลบ (ESBLs) ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* (ESBLs) โดยให้ขนาดของวงใสการยับยั้ง 11.38 ± 0.99 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่า *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25923 และให้ค่าประสิทธิภาพการยับยั้งใกล้เคียงกับเชื้อ *K. pneumoniae* A1 (ESBLs) ซึ่งมีขนาดวงใสการยับยั้งเฉลี่ย 9.99 ± 0.25 มิลลิเมตร ในขณะที่ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* A2 (ESBLs) น้อยสุดที่ขนาดวงใส 6.17 ± 1.99 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 2 (Table 2) และภาพที่ 2 (Figure 2)

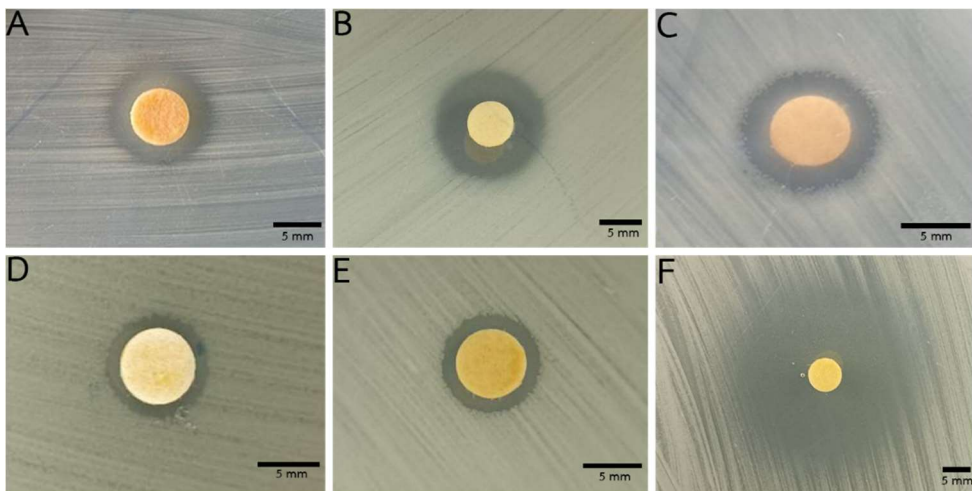


Figure 2 Antibacterial activity of lemongrass essential oil against extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) producer Gram-negative bacteria via disk diffusion method on MHA incubated at 37°C for 18-24 h. (A) *E. coli* A3 -ESBLs, (B) *S. aureus* SP1, (C) *P. aeruginosa* A2 -ESBLs, (D) *E. coli* ATCC 25923, (E) *K. pneumoniae* A2 -ESBLs, (F) *S. pyogenes* SV1

อภิปรายผล

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้เป็นสารที่มีความหลากหลายของชนิดในกลุ่มของ terpenes และ terpenoids ถูกสร้างและสังเคราะห์จากต้นตะไคร้ทั้งส่วนใบ ปลายดอกและเก็บสะสมในเนื้อเยื่อ ซึ่งในแต่ละพื้นที่และแหล่งเพาะปลูกจะให้สารที่เป็นองค์ประกอบหลักและองค์ประกอบย่อยที่แตกต่างกัน (Mohammad et al., 2022) จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านในพื้นที่คาบสมุทรสทิงพระสกัดโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายมากถึง 260 ชนิด โดยมีค่าร้อยละของปริมาณทั้งหมด (% of total) ที่มากกว่าร้อยละ 0.01 และเมื่อพิจารณาที่ค่าร้อยละของปริมาณทั้งหมดที่ค่ามากกว่า 0.3 พบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีจำนวน 21 ชนิด (Table 2) พบสารสำคัญที่เป็นเอกลักษณ์ทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในพื้นที่คาบสมุทรสทิงพระส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม monoterpene ทั้งในรูปของ aldehyde และ alcohol โดยสารสำคัญที่พบเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ citral (neral และ geranial) (28.69%) neral (23.21%) geraniol (8.52%) และ β -pinene (6.14%) โดยโครงสร้างของสารสำคัญที่พบมีทั้งการเรียงตัวแบบวงแหวน (acyclic monoterpene alcohol) ได้แก่ linalool และ epoxy-linalool oxide ซึ่งมักกลิ่นคล้ายดอกไม้และกลุ่มสารสำคัญที่เรียงตัวแบบไม่เป็นวงแหวน (acyclic monoterpene aldehyde) ในรูปของ citral และ citronellal ซึ่งให้กลิ่นคล้ายมะนาวและกลิ่นเย็นสดชื่น (Table 1) (Mohammad et al., 2022) นอกจากนี้ยังพบสารอื่นที่เป็นองค์ประกอบย่อยในกลุ่ม sesquiterpene เช่น caryophyllene อีกด้วย จากผลการวิเคราะห์ GC-MS พบโครงสร้าง cis-citral ในรูปของ geranial และ trans-citral ในรูป neral จากข้อมูลผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีชี้ให้เห็นได้ว่าตะไคร้ที่พบในพื้นที่คาบสมุทรสทิงพระเป็นพืชที่ให้น้ำมันหอมระเหยในกลุ่ม Intermediate type grass ที่พบองค์ประกอบทั้งกลุ่ม terpene aldehyde และ terpene alcohol ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามพบว่าการวิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันตะไคร้ด้วยเทคนิค GC-MS แสดงผลองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันตะไคร้บ้านของพื้นที่คาบสมุทรสทิงพระที่แตกต่างจากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ของประเทศเคนยา พบสารสำคัญที่เป็นเอกลักษณ์ทางเคมี 25 ชนิดโดยพบสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ geranial (39.53%), neral (33.31%), myrcene (11.41%) (Josphat et al., 2011) ในขณะที่น้ำมันตะไคร้บ้านจากประเทศบราซิลมีสารสำคัญเป็น neral (31.5%), citral (26.1%) และ nonan-4-ol-(6.54%) (Bruno et al., 2019)

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและดื้อยาของกลุ่มที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านที่สกัดได้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีในทุกสายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 29523, *E. coli* A3 (ESBLs), *S. aureus* SP1, *P. aeruginosa* (ESBLs), *K. pneumoniae* A1 (ESBLs) และ *S. pyogenes* SV1 เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน (gentamicin 10 μ g/disc และ ceftazidime 30 μ g/disc) โดยแสดงลักษณะของวงใสการยับยั้งที่เกิดขึ้นดังภาพที่ 2 (Figure 2) ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้ง

แบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยมาจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านที่เป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ มีรายงานการศึกษาพบว่า citral ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในรูปของ geranial ที่มีโครงสร้างเป็น cis-isomer aldehyde และ neral ที่มีโครงสร้างแบบ trans-isomer aldehyde มีฤทธิ์รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยไปทำให้สภาวะไอออนบวกของโพแทสเซียมไหลออกนอกเซลล์เกิดภาวะ hyperpolarization ทำให้เซลล์เสียสมดุลในการผ่านเข้าออกของสาร ทำให้ค่า pH ลดลงและสาร ATP ในเซลล์ลดลงด้วยส่งผลให้แบคทีเรียตาย (Chao et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่า citral ที่พบในตะไคร้สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างกลูแคนและการสร้างไบโอฟิล์มที่เป็น virulence factor ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ (Luis et al., 2020) ทั้งยังพบ geraniol ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ Methicillin-resistant *S. aureus* และเพิ่มประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ vancomycin ในระดับหลอดทดลอง (Kexin et al., 2022) และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและต้านการอักเสบได้โดยมีฤทธิ์เทียบเท่ายาปฏิชีวนะและไม่พบผลข้างเคียงต่อแบคทีเรียในลำไส้เมื่อทดสอบกับหนูทดลอง (Wei et al., 2023) นอกจากนี้ยังพบสาร β -pinene ซึ่งเป็นสารสำคัญอีกชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่สกัดได้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีโดยทำงานหลายกลไกร่วมกันในการทำลายเชื้อ เช่น cytoplasm membrane coagulation และทำให้การขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเสียสมดุลทั้งยังทำลายกระบวนการ protein motive force อีกด้วย (Aristides et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตามองค์ประกอบทางเคมีและกลุ่มสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านทั้งสัดส่วนปริมาณและความหลากหลายของชนิดสารองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ พื้นที่และแหล่งเพาะปลูก สภาพภูมิอากาศ ดิน ความชื้นและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมส่งผลให้เกิดเอกลักษณ์ทางเคมีที่แตกต่างกันส่งผลถึงความสามารถในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเชื้อได้แตกต่างกันอีกด้วย

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้บ้าน โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS พบองค์ประกอบทางเคมีมากถึง 260 ชนิดและพบสารสำคัญในกลุ่ม monoterpene เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยา กลุ่มที่สร้างเอนไซม์ ESBL พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบทุกสายพันธุ์โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. pyogenes* ได้ดีที่สุดและสามารถยับยั้งเชื้อดื้อยา กลุ่มที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ได้ทั้งสามสายพันธุ์ ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีความแตกต่างกันไปในแต่ละแหล่งพื้นที่ ดังนั้นข้อมูลองค์ประกอบเอกลักษณ์ทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านที่สกัดจากพื้นที่คาบสมุทรสหิงพระ จังหวัดสงขลา ในงานวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจที่จะนำพืชท้องถิ่นไปใช้ประโยชน์และอาจต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรไทยในท้องถิ่นเป็นไปอย่างเต็มประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาและทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) Fundamental Fund 2566 เลขที่สัญญา 10/2566 และขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้อาณูเคราะห์อุปการะและสถานที่ในการทำวิจัยในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันหอมระเหย ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยงค์ วรวิมลินชัย สำหรับความอนุเคราะห์เชื้อทดสอบ *S. pyogenes* SV1 รวมทั้งขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ในการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยในส่วนของการสกัดและวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย

เอกสารอ้างอิง

- Adcharatt S, Rangsim S, Suparat S. The inhibitory efficiency of the essential oil from lemon grass and citronella grass on the growth of Bovine mastitis pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. Khon Kaen Agriculture Journal 2012;40(2):230-235.
- Aristides L, Edeltrudes L, Evandro Souza, Margareth D, Vinicius Nogueira T, Isac M. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Science 2007;43:121-126.
- Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute. (2020). Guidelines for infection prevention and control in hospital. Ministry of Public Health. Nonthaburi.
- Bruno PB, Luis CM, Angelica PR, Barbara C, Marcus A, Carlos W, et al. Bioactivity of the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoid constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Scientific reports 2019;9(8358):1-8.
- Chao S, Kaikuo S, Xiaorong Z, Yi S, Yue S, Yifei C. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. Plos one 2016;14:1-12.
- Josphat CM, Isabel W, Jesca L.N, Anderson MK. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. African journal of food science 2011;5(3):138-142.
- Kexin G, Ping O, Yuxin H, Yuyun D, Ting T, Changliang H, et al. Geraniol inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and increase the therapeutic effect of vancomycin in vivo. Frontiers microbiology 2022; 1-12.
- Luis R, Melissa G, Irasema V, Gustavo G, Miguel M, Fernando A. Inhibition of Glucosyltransferase Activity and Glucan Production as an Antibiofilm Mechanism of Lemongrass Essential Oil against *Escherichia coli* O157:H7. Antibiotics 2020; 9(102):1-12.
- Mehdi H, Behnouch M, Stephane S, Monique L. Antibacterial activity of cranberry juice concentrate on freshness and sensory quality of ready to eat (RTE) foods. Food Control 2017;75:134-144.

- Mohammad M, Sadaf C, Mo Ahamad K, Palmiro P, Masroor K, Jamin A, et al. Lemongrass essential oil components with antimicrobial and anticancer activities. *Antioxidants* 2022;11(20):1-23.
- Nitish K, Sunil K, Singh SP, Rekha R. Enhanced protective potential of novel citronella essential oil microsphere hydrogel against *Anopheles stephensi* mosquito. *Journal of Asia-Pacific entomology* 2021;24:61-69.
- Phuntip K, Ratchanee T, Suwimol T, Buppha R. Infection Situation, Antimicrobial Susceptibility Trends, and Guidelines for Caring Patients with Drug-Resistant Infections for Nurses at Sikao Hospital, Trang Province. *Journal of Health and Pedagogy* 2023;3(2):62-78.
- Supharat D, Suchada M, Petnumpung R. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from Thai Herbs to microorganisms causing dermatitis. *KKU Science Journal* 2020; 48(1):76-85.
- Suwaree D. The prevalence of extended spectrum -lactamase producing in *K.pneumoniae* and *E.coli* at Phatthalung hospital. *Region 11 Medical Journal* 2016;30(2):97-103.
- Tanongsak L. Sathing Phra ancient community. 2020. Available at <https://archaeology.sac.or.th/archaeology/115>. Accessed September 19, 2023.
- Wei G, Min Q, Zhonghui P, Nana L, Min Y, Ke R, et al. Geraniol-a potential alternative to antibiotics for bovine mastitis treatment without disturbing the host microbial community or causing drug residues and resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2023;1-23.