



การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *CYMBOPOGON CITRATUS* ESSENTIAL
OIL AGAINST GRAM - NEGATIVE BACTERIA

ชนกานต์	แสงหาญ
ณิชาดา	เอี่ยมสุกใส
นิตารัตน์	ใจเที่ยง
บัณฑิตา	แจ่มศรี
พัฒนิตา	แจ่มศรี
ภัทรภร	ชเนศภัทรกุล

ภาคนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยรังสิต

พ.ศ. 2567



**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *CYMBOPOGON CITRATUS* ESSENTIAL
OIL AGAINST GRAM - NEGATIVE BACTERIA**

CHANAKAN

SANGHAN

NICHADA

EAMSUKSAI

NISARAT

JAITHIENG

BANTITA

JAMSRI

PHANNITA

JAMSRI

PATTARAPON

TANESPATTARAKUL

**A TERM PAPER SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR
OF SCIENCE IN MEDICAL TECHNOLOGY**

MEDICAL TECHNOLOGY

RANGSIT UNIVERSITY

2024

ภาคินพนธ์เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้

โดย

ชนกานต์	แสงหาญ
ณิชาดา	เอี่ยมสุกใส
นิตารัตน์	ใจเที่ยง
บัณฑิตา	แจ่มศรี
พัฒนิตา	แจ่มศรี
ภัทรภร	ธเนศภัทรกุล

ได้รับพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

เมื่อวันที่ 18 ตุลาคม 2568

อัมย์ ฝรั่ง

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชัย ศรีเพียร)

ประธานกรรมการภาคินพนธ์

นฤศักดิ์ โพธิ์พฤกษ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุกัลลักษ์ โพธิ์พฤกษ์)

กรรมการ

ค. ๒

(รองศาสตราจารย์ เขียวลักษณ์ พิมายนอก)

คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์

ป. ๑๕

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริยาภรณ์ โมนะตระกูล ศรีเพียร)

กรรมการและที่ปรึกษาร่วมภาคินพนธ์

กฤษณ์ พุทธิผดุงวิพล

(ดร.กฤษณ์ พุทธิผดุงวิพล)

หัวหน้าสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และการสนับสนุนเป็นอย่างดีจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชัย ศรีเพียร ประธานกรรมการปริญญานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยชี้แนะแนวทางต่าง ๆ รวมถึงปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่อง จนทำให้การทำวิจัยในครั้งนี้เป็นไปอย่างราบรื่น

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียากรณ์ โมนะตระกูล ศรีเพียร คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต และรองศาสตราจารย์ ดร.สุกัลกัญ โพธิ์พฤกษ์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำและคำปรึกษาที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนางานวิจัยครั้งนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต สำหรับความรู้ และคำแนะนำต่าง ๆ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

ชนกานต์	แสงหาญ
ณิชาดา	เอี่ยมสุกใส
นิศารัตน์	ใจเที่ยง
บัณฑิตา	แจ่มศรี
พัฒน์ธิดา	แจ่มศรี
ภัทรภร	ธเนศภัทรกุล

บทคัดย่อ

6502499, 6506731, 6506733, 6506735,

: สาขาวิชา: เทคนิคการแพทย์

6506739, 6506745

วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

คำสำคัญ :ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้, *ESCHERICHIA COLI*, *VIBRIO CHOLERAE*, *SALMONELLA TYPHI*

ชนกานต์ แสงหาญ, ณิชดา เอี่ยมสุกใส, นิศารัตน์ ใจเที่ยง, บัณฑิตา แจ่มศรี, พณณิตา แจ่มศรี, ภัทรภร ธเนศภัทรกุล

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้

(ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *CYMBOPOGON CITRATUS* ESSENTIAL OIL AGAINST GRAM - NEGATIVE BACTERIA)

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.อภิชัย ศรีเพียร, 59 หน้า

Cymbopogon citratus หรือที่รู้จักทั่วไปว่าตะไคร้บ้าน เป็นพืชในวงศ์หญ้า (*Poaceae*) ที่พบได้ทั่วไปในเขตร้อน ซึ่งมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายเพื่อนำมาประกอบอาหารและใช้เป็นยาสมุนไพร ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้บ้าน (CCEO) ด้วยวิธี disk diffusion และ broth microdilution ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้บ้านมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone อยู่ที่ 26.0 ± 1.0 มิลลิเมตร ซึ่งจัดอยู่ในระดับ strong activity ในขณะที่ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Acinetobacter baumannii* จัดอยู่ในระดับ weak activity โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone อยู่ที่ 9.3 ± 0.6 , 9.3 ± 1.2 , 7.0 ± 0.0 และ 8.7 ± 0.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้บ้านไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone อยู่ที่ 6 มิลลิเมตร ซึ่งจัดอยู่ในระดับ no activity เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่าเชื้อที่ไวต่อน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้บ้านมากที่สุดคือ *Vibrio cholerae* (MIC และ MBC เท่ากับ 1.0 ± 0.0 mg/mL) ในขณะที่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อที่ไวต่อน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้บ้านน้อยที่สุด (MIC เท่ากับ 21.3 ± 9.2 mg/mL และ MBC เท่ากับ 26.7 ± 9.2 mg/mL) โดยมีค่า MIC index ของเชื้อทั้งหมดอยู่ที่ ≤ 4 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้บ้านมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา

ABSTRACT

6502499, 6506731, 6506733, 6506735, : MAJOR: MEDICAL TECHNOLOGY

6506739, 6506745 B.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

KEY WORD : ANTIBACTERIAL ACTIVITY, *CYMBOPOGON CITRATUS*,
ESCHERICHIA COLI, *VIBRIO CHOLERA*E, *SALMONELLA* TYPHI

CHANAKAN SANGHAN, NICHADA EAMSUKSAI, NISARAT JAITHIENG, BANTITA
JAMSRI, PHANNITA JAMSRI, PATTARAPON TANESPATTARAKUL

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *CYMBOPOGON CITRATUS* ESSENTIAL OIL
AGAINST GRAM - NEGATIVE BACTERIA

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. APICHA SREEPIAN, Ph.D., 59 p.

Cymbopogon citratus, commonly known as lemongrass, is a tropical plant belonging to the *Poaceae* family. It is widely cultivated for its culinary and medicinal uses. This study aimed to investigate the antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil (CCEO) by disk diffusion and broth microdilution methods against Gram – negative bacteria. The results showed that CCEO exhibited the strongest inhibitory effect on *Vibrio cholerae*, with an average inhibition zone of 26.0 ± 1.0 mm, classified as strong antibacterial activity. In comparison, the inhibitory effects on *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii* were weak activity, with average inhibition zones of 9.3 ± 0.6 mm, 9.3 ± 1.2 mm, 7.0 ± 0.0 mm, and 8.7 ± 0.6 mm, respectively. However, CCEO was unable to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* with an average inhibition zone of 6 mm, classified as no antibacterial activity. By broth microdilution, the most sensitive organism to CCEO was *Vibrio cholerae* (MIC and MBC were 1.0 ± 0.0 mg/mL), while *Pseudomonas aeruginosa* was the least sensitive organism. The MIC indexes of all organisms were ≤ 4 . This study showed that CCEO exhibited bactericidal effect against Gram – negative bacteria tested in this study.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูปภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 สมมติฐานการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	4
2.1 แบบที่เรียกรวมลบ	4
2.2 ตะไคร้บ้าน	11
2.3 การทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ	13
2.4 ยาด้านจุลชีพ	16
2.5 กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพ	18
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	22
3.1 การออกแบบการวิจัย	22
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	22
3.3 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ	23
3.4 วิธีทดลอง	23
3.5 การรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	28
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ของ <i>Cymbopogon citratus</i> essential oil	28
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดสอบ	34
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	34
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก ก	41
ภาคผนวก ข	44
ประวัติผู้วิจัย	54

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 การเจือจางน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ เพื่อทดสอบ Minimum Inhibitory Concentration ด้วยวิธี broth microdilution	26
4.1 Inhibition zone และการแปลผลของ <i>Cymbopogon citratus</i> essential oil (CCEO) ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	30
4.2 Inhibition zone และการแปลผลของยา gentamicin ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	31
4.3 Inhibition zone และการแปลผลของยา ciprofloxacin ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	32
4.4 MIC และ MBC ของ <i>Cymbopogon citratus</i> essential oil (CCEO) ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	33

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบ	4
2.2 <i>Escherichia coli</i>	5
2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i> ด้วยวิธีการ streak complex หลังการเจริญเติบโตข้ามคืนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria - Bertani agar ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	8
2.5 การย้อมแกรมของเซลล์ <i>Acinetobacter baumannii</i>	8
2.6 Culture colony morphology and Gram staining microscopic image of <i>K. pneumoniae</i> . (A) Colony morphology on TSA. (B) Colony morphology on blood agar. (C) Colony morphology on MacConkey agar. (D) <i>K. pneumoniae</i> Gram staining microscopic morphology, 100×	9
2.7 <i>Vibrio cholerae</i>	10
2.8 <i>Salmonella Typhi</i>	11
2.9 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ citral	12

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC	=	American Type Culture Collection
CAHMB	=	Cation adjusted Mueller - Hinton broth
CCEO	=	<i>Cymbopogon citratus</i> essential oil
CFU/mL	=	Colony Forming Units per milliliter
CLSI	=	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
LPS	=	Lipopolysaccharides
MBC	=	Minimum Bactericidal Concentration
mg/mL	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
MIC	=	Minimum Inhibitory Concentration
mL	=	มิลลิลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
PBP	=	Penicillin - binding protein
PBP2a	=	Penicillin - binding protein 2a
SD	=	Standard deviation
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
μg	=	ไมโครกรัม
μL	=	ไมโครลิตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหา

แบคทีเรียแกรมลบ (Gram - negative bacteria) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างผนังเซลล์ซับซ้อน โดยเฉพาะชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกที่มี lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่รุนแรงในมนุษย์ ทำให้แบคทีเรียแกรมลบสามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่ร้ายแรง เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด, การติดเชื้อทางระบบหายใจ, การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ ความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียแกรมลบเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลกในปัจจุบัน เนื่องจากการดื้อยาต้านจุลชีพสูงเมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมบวก ขณะนี้ปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียในประเทศไทยค่อนข้างน่าเป็นห่วง โดยในประเทศไทยมีผู้ป่วยติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพปีละมากกว่า 100,000 ราย เป็นผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 30,000 ราย และสูญเสียทรัพยากรจากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 40,000 ล้านบาท (วิศัลย์ มูลศาสตร์, 2565) นอกจากนี้ยังพบว่าการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. และ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในโรงพยาบาลและชุมชน (สุพรรณิ ยิ่งขจร, 2564) มีแนวโน้มดื้อยาต้านจุลชีพในแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเหล่านี้ เป็นสิ่งที่น่ากังวล เนื่องจากมีทางเลือกในการรักษาที่จำกัด อีกทั้งยังเพิ่มภาระค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาสุขภาพ รวมถึงความจำเป็นในการพัฒนายาต้านจุลชีพ ซึ่งใช้เวลาและทรัพยากรอย่างมหาศาล ส่งผลให้เกิดการค้นหาและพัฒนาสารต้านเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ

ในปัจจุบันการพึ่งพาต้านจุลชีพอย่างต่อเนื่องรวมทั้งการใช้ยาที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้ปัญหาเชื้อดื้อยามีความรุนแรงมากขึ้น การพัฒนายาต้านจุลชีพชนิดใหม่แม้จะมีความสำคัญ แต่กระบวนการพัฒนายาต้องใช้เวลาและทรัพยากรจำนวนมาก ทำให้การค้นหาสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพ ตะไคร้เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่หาได้ง่าย มีการใช้อย่าง

แพร่หลายและมักนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ รวมถึงรักษาอาการเจ็บป่วย เพื่อเป็นทางเลือกอีกทาง นอกจากการรักษาโดยใช้ยาแผนปัจจุบัน ซึ่งตะไคร้มีสรรพคุณที่หลากหลาย เช่น ลดอาการปวดศีรษะ ช่วยแก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้ประกอบด้วยสารที่สำคัญ เช่น citral ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะชั้น lipid A ที่เป็นส่วนสำคัญของโครงสร้าง lipopolysaccharides (LPS) (รัช กิตติปัญญากุล, 2558) เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายความสามารถในการรักษาความคงตัวของเซลล์ (homeostasis) จะลดลงส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้บ้าน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* รองลงมาเป็น *Pseudomonas aeruginosa* และจากการหาลองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC - MS) พบว่าองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน คือ citral (ทิพย์รัตน์ ขาหอมชื่น, 2561)

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสำคัญของการแก้ปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพ ซึ่งเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญของระบบสาธารณสุขปัจจุบัน การศึกษาครั้งนี้จึงมีเป้าหมายในการค้นหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยมุ่งเน้นศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียแกรมลบ เพื่อลดการพึ่งพายาต้านจุลชีพและบรรเทาปัญหาการดื้อยา การนำพืชสมุนไพร เช่น ตะไคร้ ซึ่งหาได้ง่ายและมีศักยภาพสูงมาประยุกต์ใช้จะช่วยสร้างแนวทางใหม่ในการรักษาการติดเชื้อที่ปลอดภัยและยั่งยืน อีกทั้งยังเป็นการสนับสนุนการพัฒนาตัวยาต้านจุลชีพจากทรัพยากรธรรมชาติ ซึ่งอาจนำไปสู่การลดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลและเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดการกับปัญหาสุขภาพในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี disk diffusion และ broth microdilution โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

1.4 สมมติฐานการวิจัย

1.4.1 น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้

1.4.2 น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.5.1 ทราบถึงฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

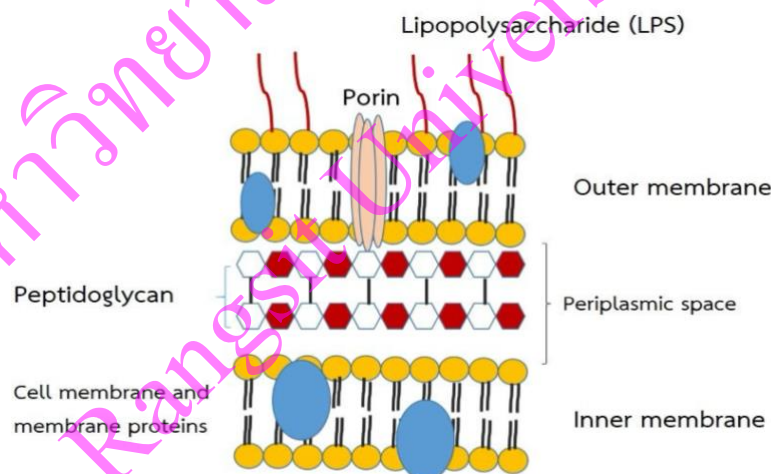
1.5.2 สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 แบคทีเรียแกรมลบ (Gram - negative bacteria)

ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างที่แตกต่างจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะค่อนข้างซับซ้อนกว่า โดยชั้น peptidoglycan ที่บางกว่าในแบคทีเรียแกรมบวก และมีชั้นของ lipopolysaccharide (LPS) เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งโครงสร้างและลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรียที่แตกต่างกัน มีผลต่อการออกฤทธิ์ ของยาต้านจุลชีพและการดื้อยา (อารยา ข้อคำ, 2563)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบ (พจมาน ผู้มีสัตย์, 2565)

แบคทีเรียแกรมลบ (Gram - negative bacteria) เป็นแบคทีเรียที่ย้อมด้วยสีซาฟรานิน (Safranin) แล้วติดสีแดงและแบคทีเรียแกรมลบที่รูปร่างเป็นแท่ง (bacillus) มักทำให้เกิดโรคที่ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ ไต และถุงน้ำดี โดยการรักษาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะทำได้ยากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเพราะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมักดื้อต่อยาต้านจุลชีพและมีโอกาสที่เชื้อจะแพร่ไปในกระแสเลือด (พนัส เฉลิมแสนยากร, 2562)

2.1.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

Escherichia coli สายพันธุ์ ATCC 25922 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มักใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุมคุณภาพ ถูกแยกได้ครั้งแรกจากตัวอย่างทางคลินิกในซีแอตเทิล รัฐวอชิงตัน (1946) โดยเป็นเซโรไทป์ (serotype) O6 และไบโอไทป์ (biotype) 1 จีโนม (genome) ของสายพันธุ์นี้ได้รับการประกอบอย่างสมบูรณ์ โดยมีขนาด 5.20 Mbp (ปริมาณ G + C 50.4%) ประกอบด้วยโครโมโซม (chromosome) 1 ชุด (5,130,767 bp) และพลาสมิด (plasmids) 2 ชิ้น (48,488 และ 24,185 bp) ข้อมูลลำดับเบสได้มาจากเทคโนโลยี Illumina และ Roche 454 และผ่านกระบวนการประกอบจีโนมโดยใช้ซอฟต์แวร์ Newbler, Velvet, Allpaths และ parallel phrap พร้อมการแก้ไขด้วยมือในโปรแกรม Consed การวิเคราะห์พบลำดับการเข้ารหัส 4,840 รายการ, rRNAs 21 รายการ และ tRNAs 85 รายการ จีโนมที่มีคำอธิบายสมบูรณ์สามารถเข้าถึงได้ใน GenBank ภายใต้หมายเลขการเข้าถึง CP009072 (Minogue et al., 2014)

2.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram - negative) รูปร่างเป็นแท่งสั้น (rod - shaped) มีความยาวประมาณ 1 - 3 ไมโครเมตร และกว้าง 0.4 - 0.7 ไมโครเมตร สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแบบ facultative anaerobes เชื้อ *E. coli* มีแฟลกเจลลา (flagella) ช่วยในการเคลื่อนที่และบางสายพันธุ์มีแคปซูลที่ช่วยป้องกันเชื้อจากระบบภูมิคุ้มกัน (Pallen, 2022)



รูปที่ 2.2 *Escherichia coli* (Barr, 2018)

Escherichia coli (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์เลื้อยคลาน เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศของร่างกาย โดยช่วยย่อยอาหารบางชนิด รวมถึงการสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็น เช่น วิตามินเค นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคได้และเป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ในหลายด้าน (Collins et al., 2024)

2.1.2.1 สายพันธุ์ของ *E. coli*

สายพันธุ์ของ *E. coli* แบ่งออกได้เป็นกลุ่มที่ก่อโรคและกลุ่มที่ไม่ก่อโรค โดยสายพันธุ์ที่ก่อโรคสามารถทำให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย สามารถจำแนกได้ดังนี้ (Ullah et al., 2022)

- 1) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เชื้อจะยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้และทำลายโครงสร้างส่วนของ microvilli ทำให้การดูดซึมสารอาหารลดลง ก่อให้เกิดโรคท้องเสียในเด็ก โดยเฉพาะในเด็กเล็กที่อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา
- 2) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เชื้อสร้างสารพิษ 2 ชนิด คือ heat-labile toxin (LT) และ heat-stable toxin (ST) ซึ่งสามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำภายในลำไส้ ก่อให้เกิดอาการท้องเสียเฉียบพลัน
- 3) Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) โดยเฉพาะ serotype O157: H7 ที่สร้าง shiga toxin ที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่งจะทำลายผนังหลอดเลือดและไต อาจทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน (Hemolytic uremic syndrome)
- 4) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เชื้อสามารถบุกรุกและทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทำให้เกิดการอักเสบและเกิดการติดเชื้อภายในลำไส้ใหญ่ มีอาการคล้ายโรคบิด
- 5) Enteroadherent *E. coli* (EAEC) เชื้อจะยึดติดกับเยื่อบุลำไส้และสร้าง biofilm ทำให้ท้องเสียเรื้อรัง โดยเฉพาะในเด็กเล็กและผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง
- 6) Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) เชื้อสามารถเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุลำไส้แบบกระจายตัว อาจมีบทบาทในการพัฒนาการของมะเร็งลำไส้และ Crohn's disease (CD) แต่ยังไม่พบว่าก่อโรคท้องร่วงในผู้ใหญ่
- 7) Adherent invasive *E. coli* (AIEC) เชื้อสามารถเกาะติด บุกกรุกเซลล์เยื่อบุลำไส้ และเพิ่มจำนวนในแมคโครฟาจมีความเชื่อมโยงกับ Crohn's disease (CD)

นอกจากการเป็นเชื้อก่อโรค ปัจจุบัน *E. coli* ยังเป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพอย่างรุนแรง การดื้อยาของ *E. coli* ส่งผลกระทบต่อการรักษาผู้ป่วย ทำให้อัตราการเสียชีวิต และค่าใช้จ่ายด้านการรักษาเพิ่มขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้ *E. coli* ยังเป็นแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจในงานวิจัยหลากหลายด้าน เนื่องจากมีความสำคัญในการศึกษาทั้งในด้านคุณสมบัติกลไกการก่อโรค โดยเฉพาะการพัฒนาสารต้านเชื้อใหม่ ๆ เช่น สารสกัดจากพืชสมุนไพร ซึ่งช่วยลดผลกระทบจากปัญหาการดื้อยาและช่วยควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาในอนาคต

2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและแหล่งน้ำต่าง ๆ เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการป่วย การเสียชีวิตในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และโรคเรื้อรัง การติดเชื้อ *P. aeruginosa* รักษาได้ยาก เนื่องจากเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดและมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม เชื้อมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod - shaped) มีความยาว 1 – 5 ไมโครเมตร และกว้าง 0.5 – 1.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้และเป็นเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic) เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพใช้ออกซิเจน (aerobic) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic) โดยใช้ไนเตรตหรืออาร์จินีนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนสุดท้าย เชื้อสามารถใช้สารอินทรีย์กว่า 100 ชนิดเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน สามารถเจริญในอุณหภูมิตั้งแต่ 4 – 42 องศาเซลเซียส (Diggle et al., 2019)



รูปที่ 2.3 *Pseudomonas aeruginosa* (Julian, 2020)

2.1.4 *Acinetobacter baumannii*

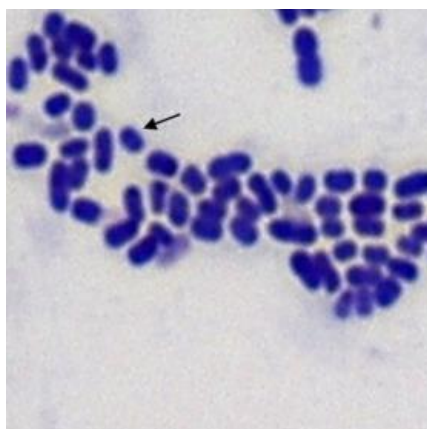
Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง (rod - shaped) ที่ใช้ออกซิเจน (aerobic) มีรูปร่างหลากหลาย (pleomorphic) และไม่เคลื่อนที่

(non - motile) เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นเวลานานกว่า 90 วัน เชื้อ *A. baumannii* มักเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำ สามารถพบได้ทั้งบนผิวหนัง สารคัดหลั่งจากทางเดินหายใจ หรือคอหอยของผู้ป่วยติดเชื้อ (Howard et al., 2012)

A. baumannii ได้รับการจัดให้อยู่ในกลุ่ม “เชื้อก่อโรคที่ต้องเฝ้าระวังระดับสูง” (red alert human pathogen) ซึ่งสร้างความกังวลอย่างมากในวงการแพทย์ สาเหตุหลักมาจากความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพหลากหลายชนิด ปรากฏการณ์การดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistance; MDR) นี้ได้กลายเป็นปัญหาที่น่าวิตกอย่างยิ่ง ทั้งในแง่ของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infections) และการติดเชื้อในชุมชน (community – acquired infections) องค์การอนามัยโลก (WHO) ยังได้ระบุว่าการดื้อยาต้านจุลชีพเป็นหนึ่งในสามปัญหาสำคัญที่สุดที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ในปัจจุบัน (Howard et al., 2012)



รูปที่ 2.4 การเพาะเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ด้วยวิธีการ streak complex หลังการเจริญเติบโตข้ามคืนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria - Bertani agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Howard et al., 2012)

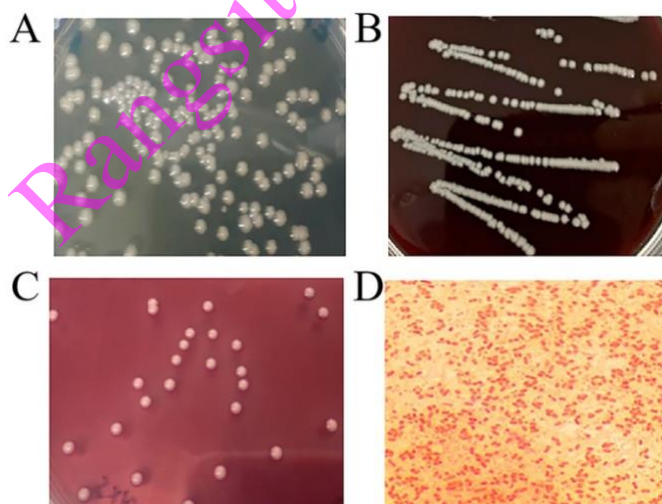


รูปที่ 2.5 การย้อมแกรมของเซลล์ *A. baumannii* (Howard et al., 2012)

2.1.5 *Klebsiella pneumoniae*

เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ใน genus *Klebsiella* มีขนาดกว้างประมาณ 0.3 - 1.0 ไมโครเมตร และยาว 0.6 - 6.0 ไมโครเมตร มีรูปร่างแบบแท่ง (rod - shaped) และไม่เคลื่อนที่ (non - motile) เป็นแบคทีเรียที่จัดเป็น facultative anaerobic มีแคปซูล (encapsulated) เมื่อย้อม Gram stain จึงเห็นเป็นวงใสรอบตัวเชื้อ โคโลนิที่มีลักษณะใหญ่ เข้ม และเหนียว *K. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดินหรือผิวน้ำ อีกทั้งยังสามารถพบได้ในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ลำไส้ ทางเดินปัสสาวะ ทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังพบได้ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดหรือมีบาดแผลจากการอักเสบ รวมถึงบริเวณผิวหนัง อีกทั้งยังพบได้ในอุจจาระอีกด้วย (วรภรณ์ ขุนเพชร, 2558)

K. pneumoniae เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่มีการดื้อยาหลายชนิด จึงเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคปอดบวม โดยมักพบในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ โรคทางเดินปัสสาวะ รวมไปถึงการติดเชื้อในระบบอื่น ๆ ของร่างกาย เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อจากแผลผ่าตัด ซึ่งแคปซูลของเชื้อเป็นปัจจัยในการก่อโรคโดยแคปซูลจะเป็นชั้นหนาเพื่อต้านกระบวนการจับกินของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis) และยังต้านกระบวนการ opsonization (พรนภา ขาวประเสริฐ, 2561)



รูปที่ 2.6 Culture colony morphology and Gram staining microscopic image of *K. pneumoniae*. (A) Colony morphology on TSA. (B) Colony morphology on blood agar. (C) Colony morphology on MacConkey agar. (D) *K. pneumoniae* Gram staining microscopic morphology, 100× (He et al., 2022)

2.1.6 *Vibrio cholerae*

เชื้อ *Vibrio cholerae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถพบได้ตามชายฝั่ง มีรูปร่างเป็นแท่งงอมี flagellum 1 เส้นที่ปลาย ไม่สร้างสปอร์ และมีหลาย serogroup โดยจำแนกได้จาก O (somatic) antigen ที่ lipopolysaccharide (LPS) โดยเชื้อ *V. cholerae* serogroup O1 และ O139 สามารถผลิตสารพิษที่เรียกว่า cholera toxin และก่อให้เกิดโรคอหิวาตกโรค ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่ทางเดินอาหารจากแบคทีเรียชนิดเฉียบพลัน ทำให้มีอาการถ่ายอุจจาระเป็นน้ำอย่างมาก บางรายอาจมีอาการถ่ายอุจจาระสีชาขุ่นเหมือนน้ำข้าวขาว มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน สูญเสียน้ำอย่างรวดเร็ว จนทำให้เลือดมีภาวะเป็นกรดและการไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจนอาจทำให้เสียชีวิตได้ ส่วนเชื้อ *V. cholerae* non - O1/non - O139 บาง serogroup ก็อาจก่อให้เกิดอาการคล้ายโรคอุจจาระร่วงได้เช่นกัน (Montero et al., 2023)



รูปที่ 2.7 *Vibrio cholerae* (The University of Texas at Austin, 2024)

2.1.7 *Salmonella Typhi*

Salmonella Typhi (*S. Typhi*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้ทั่วไปทั้งในสัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลักษณะของเชื้อมีรูปร่างเป็นแท่ง (bacillus) ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้ flagella ที่อยู่รอบเซลล์ ขนาดประมาณ 0.7 - 1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0 - 5.0 ไมโครเมตร เชื้อเจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 37 - 45 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส และเชื้อไม่ทนต่อความร้อนจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 - 20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที หรือ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ในขณะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ สามารถสร้างชีวพิษภายในตัว (endotoxin) ซึ่งก่อให้เกิดพิษต่อระบบทางเดินอาหาร

เชื้อ *Salmonella Typhi* จะทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ โดยเชื้อจะพบได้บ่อยในหลายประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีระบบบำบัดน้ำเสีย และเชื้อทำให้เกิดอาการท้องผูก, ท้องเสีย, ไข้สูง, อาการปวดหัว, เมื่อยล้า, เบื่ออาหาร, วิงเวียนศีรษะ, ไอ และผื่นบนลำตัวโดยอาการเริ่มต้นโดยเฉลี่ย 1 ถึง 2 สัปดาห์ (ช่วง 3 ถึง 60 วันหรือนานกว่านั้น) หลังจากสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรีย (BC Centre for Disease Control, 2012)



รูปที่ 2.8 *Salmonella Typhi* (Liu, 2022)

2.2 ตะไคร้บ้าน

ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus*) เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์หญ้า (*Poaceae*) ที่พบได้ทั่วไปในเขตร้อน โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นพืชล้มลุกที่เจริญเติบโตเป็นกอ มีลำต้นสูงประมาณ 1 - 2 เมตร ใบเรียวยาว สีเขียวอ่อน และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวที่มาจากน้ำมันหอมระเหยในลำต้นและใบ ซึ่งเป็นที่มาของการใช้งานตะไคร้ในหลากหลายด้าน ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยาสมุนไพร และเครื่องสำอาง

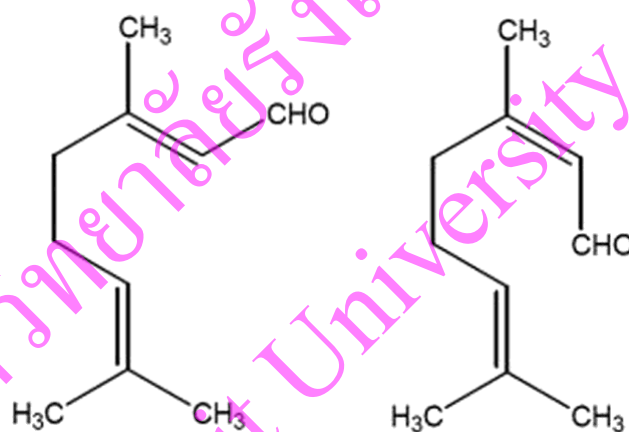
น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้านมีสารสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะ citral ซึ่งเป็นสารที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดถึง 70 - 80% นอกจากนี้ยังพบสาร Geranial, Neral, Citronellol และ Limonene สารเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ด้านจุลชีพ ด้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และด้านมะเร็ง (Mukarran et al., 2022)

ในด้านการประยุกต์ใช้ ตะไคร้บ้านถูกนำมาใช้ทั้งในรูปแบบสด เช่น การใช้ลำต้นและใบในการปรุงอาหาร รวมถึงการผลิตน้ำมันหอมระเหยสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง

เช่น สบู่ ยาสีฟัน และผลิตภัณฑ์โล่แมลง ยิ่งไปกว่านั้น น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ยังสามารถนำไปใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่โดดเด่น

2.2.1 จิทรัล (Cital)

จิทรัล (Cital) ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิด เช่น *Cymbopogon citratus* (ตะไคร้หอม) และ *Litsea cubeba* (ตะไคร้จีน) โดยมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมถึงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียและการป้องกันการสร้าง biofilm ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในมนุษย์และสัตว์



รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ citral (Alam, 2018)

2.2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของจิทรัล

- 1) ชื่อเคมีทั่วไป : Citral
- 2) ชื่อ IUPAC : 3,7-Dimethyl-2,6-octadienal
- 3) สูตรโมเลกุล : $C_{10}H_{16}O$
- 4) จุดเดือด : 226 - 228 องศาเซลเซียส
- 5) ปริมาตรเชิงโมล : 152.24 กรัม/โมล
- 6) ความหนาแน่น : 0.893 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร
- 7) ประเภท : สารประกอบอินทรีย์ประเภทเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid)

หรืออัลดีไฮด์เทอร์พีนิค (Terpenic Aldehyde)

8) ความสามารถละลายได้ในน้ำ : ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่สามารถละลายได้ในน้ำมัน

2.2.1.2 กลไกการออกฤทธิ์ของซิทรัล (Citral)

1) ซิทรัล (Citral) รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่ช่วยรักษาสมดุลของเซลล์ ซิทรัลสามารถแทรกซึมเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดความเสียหาย ส่งผลให้สารสำคัญภายในเซลล์รั่วไหลออกมา เช่น ไอออน โปรตีน และ ATP ทำให้เซลล์จุลชีพอ่อนแอลงและตายในที่สุด

2) ซิทรัล (Citral) ยับยั้งเอนไซม์ที่สำคัญของเซลล์ โดยไปจับกับหมู่ thiol ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ทำงานผิดปกติ รบกวนกระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์ ส่งผลให้ระดับ ATP ลดลง ทำให้เซลล์ขาดพลังงานและไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ อีกทั้งซิทรัลยังสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ และ โปรตีนภายในเซลล์จุลชีพ ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายรุนแรงและนำไปสู่การตายของจุลชีพ

3) ซิทรัล (Citral) มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นโครงสร้างป้องกันของแบคทีเรีย ทำให้เชื้อมีความไวต่อการต้านจุลชีพมากขึ้นและลดโอกาสในการพัฒนาความสามารถในการดื้อยา (Gutiérrez - Pacheco, 2023)

2.3 การทดสอบหาความไวของเชื้อต่อการต้านจุลชีพ

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ คือ ความสามารถของสารหรือยาที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ เช่น แบคทีเรีย, ไวรัส, เชื้อรา, หรือโปรโตซัว ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อหรือโรคต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพสามารถพบได้ทั้งในยารักษาโรคที่ใช้ในมนุษย์ เช่น ยาต้านจุลชีพ (antibiotics) ยาต้านไวรัส (antiviral drugs) หรือยาด้านเชื้อรา (antifungal drugs) รวมถึงสารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เช่น น้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดหรือสารสกัดจากสมุนไพร

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ได้กำหนดขั้นตอนและมาตรฐานที่ชัดเจนสำหรับการทดสอบความไวของเชื้อต่อการต้านจุลชีพ (Antimicrobial Susceptibility Testing, AST) เพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือและสามารถแปลผลได้อย่างถูกต้อง ซึ่งประกอบด้วย การกำหนดมาตรฐานในหลาย ๆ ด้าน เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย CLSI กำหนดชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการทดสอบ โดยต้องคำนึงถึงประเภทของเชื้อที่ทดสอบ เช่น agar plate หรือ broth ที่ใช้ในวิธีต่าง ๆ , ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการกำหนดความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมกับวิธีการทดสอบ เช่น ในการใช้ disk diffusion ต้องมีความหนาของ agar ที่เหมาะสม (ประมาณ 4 mm) , การเตรียมเชื้อในการทดสอบ โดยต้องใช้เชื้อที่ได้มาตรฐาน เช่น การเตรียมสเปกตรัมของเชื้อเพื่อให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งอาจต้องปรับให้เชื้อมีความหนาแน่น (density) อยู่ในระดับที่เหมาะสม, อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการบ่มเพาะ โดย CLSI

กำหนดอุณหภูมิที่ต้องใช้ในการบ่มเพาะเชื้อ (โดยปกติคือ 35 – 37 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาในการบ่มเพาะ (ทั่วไปคือ 16 - 18 ชั่วโมง) เพื่อให้การเจริญเติบโตของเชื้อเหมาะสม, สภาพในการบ่มเพาะ โดยในบางครั้งอาจมีการควบคุมสภาวะของการบ่มเพาะ เช่น ความชื้น อากาศที่มีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมตามชนิดของเชื้อ การอ่านผล และการแปลผล โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในวิธี disk diffusion หรือการวัดค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ในวิธี broth microdilution และการตีความผลการทดสอบตามค่ามาตรฐานที่กำหนดเช่น susceptible, intermediate และ resistant (มาลัย วรจิตร, 2561)

2.3.1 วิธีทดสอบความไวของเชื้อต่อยามีหลายวิธี ได้แก่

1) Disk diffusion เป็นการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งสามารถเปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัด โดยมีขั้นตอนหลัก ๆ ดังต่อไปนี้ คือ มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller – Hinton agar และนำเชื้อ swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อที่ใช้ต้องมีความเข้มข้นประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการวางแผ่น paper disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บน Mueller – Hinton agar จากนั้นหยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 10 ไมโครลิตร ลงบน paper disk ในแต่ละตำแหน่ง รวมทั้งหยดตัวทำละลาย เพื่อเป็น control จากนั้นนำจานไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส โดยทิ้งไว้ 16 - 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดเส้นศูนย์กลางของบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร ซึ่งจะสามารถเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดได้ (อมรรัตน์ สีสุทอง, 2559)

2) Broth microdilution เทคนิคนี้ใช้เมื่อทดสอบแบคทีเรียที่มีจำนวนไม่มาก ซึ่งจะใช้ 96 - well microplates โดยจะเจือเชื้อจาก stock culture แล้วเพาะเลี้ยงบน Mueller - Hinton broth แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำแบคทีเรียมาปรับ bacterial suspension ให้ได้ประมาณ 1×10^8 CFU/mL ซึ่งใช้ค่าการดูดกลืนแสงในการเปรียบเทียบกับ bacterial suspension standard curve หลังจากนั้นเตรียมความเข้มข้นของ separated fractions โดยให้คอลัมน์แรกของ 96 - well plates มีความเข้มข้นสูงสุดและอาหาร cation - adjusted Mueller - Hinton broth (CAMHB) เจือจางให้ความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพลดลงทีละสองเท่า (two - fold dilution) ในแต่ละหลุม (well) หลังจากนั้นเติมเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^5 CFU/mL หลังจากนั้นนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงมาทำการหาค่า MIC และ MBC (เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ, 2557)

3) Broth macrodilution เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อต้านจุลชีพ โดยวิธีการเจือจางยา (dilution) เป็นลำดับให้มีความเข้มข้นต่างกัน โดยทั่วไปจะเจือจางยาให้มีความเข้มข้นลดลง 2 เท่าตามลำดับ (two - fold dilution) (จเร จรวัสชญพงศ์, 2559) โดยวิธี broth macrodilution มีขั้นตอนหลัก ๆ คือ เตรียมหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller - Hinton broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 8 หลอด เตรียมยาความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 1 ผสมให้เท่ากัน จากนั้นทำการเจือจางแบบลดลงทีละสองเท่า (Two - fold serial dilution) ตั้งแต่หลอดที่ 1 - 6 เมื่อทำจนถึงหลอดที่ 6 ให้ดูดสารละลาย ในหลอดที่ 6 ทิ้งไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมความเข้มข้นเท่ากับ 5.0×10^5 CFU/mL ใส่ลงในหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 7 หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยหลอดที่ 7 เป็นการควบคุมการเจริญ (growth control) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller - Hinton broth และมีเชื้อส่วนหลอดที่ 8 เป็นการควบคุมที่ไม่มีเชื้อ (blank control) โดยจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาเท่ากับ 10, 5, 2.50, 1.25, 0.625 และ 0.312 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยความเข้มข้นที่เลือกใช้อาจตามความเหมาะสมที่คิดว่าน่าจะ สามารถยับยั้งเชื้อได้ จากนั้นนำมาเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่านผลด้วยตาเปล่า (เชิดชาย แซ่ฮ่วน, 2565)

4) Agar well dilution เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดซิทรัล (Citral) และ น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ (CCEO) โดยนำเชื้อที่ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland มาเกลี่ย (swab) ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นเจาะหลุมด้วยชุดทิปให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เติมสารสกัดซิทรัลและน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดสอบ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper) ในหน่วยมิลลิเมตร บันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ยาต้านจุลชีพ gentamicin และ ciprofloxacin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม เป็นชุดควบคุม (อรอนงค์ สมทรัพย์, 2562)

5) Epsilometer test (E - test) เป็นวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ตรวจหาความไวของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราต่อสารต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ โดยอาศัยหลักการของ agar diffusion method ใช้แถบที่เป็น rectangular strip ซึ่งมีสารต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบเคลือบอยู่ในปริมาณที่ลดเป็นสัดส่วนกับตำแหน่งบนแถบยา เมื่อวางแถบยาทดสอบบน agar plate ที่ป้ายเชื้อที่ทดสอบไว้ ยาในแถบทดสอบจะแผ่กระจาย (diffuse out) ไปในเนื้อวุ้นเกิดเป็น exponential gradient

ที่แถบยาทดสอบมีตัวเลขบอกปริมาณสารต้านจุลชีพในแต่ละตำแหน่ง หลังจากเพาะไว้ 24 ชั่วโมง จะเกิด inhibition zone ลักษณะเป็นวงรี (elliptical inhibitory concentration) (มาลัย วรจิตร, 2561)

2.3.2 MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

ความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้ โดยหน่วยที่นิยมใช้ คือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) หรือหน่วยสากลต่อมิลลิลิตร (IU/mL, International Unit per milliliter) ซึ่งค่า MIC ใช้เพื่อเปรียบเทียบความไวของเชื้อหนึ่งชนิดต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด หรือความไวของเชื้อหลายชนิดต่อยาชนิดเดียว

2.3.3 MBC (Minimum Bactericidal Concentration)

ความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยทั่วไปแล้ว MBC คือ ความเข้มข้นที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง 99.9% หรือมากกว่านั้นจากจำนวนเริ่มต้นการทดสอบ MBC มักจะทำหลังจากการทดสอบ MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ซึ่งหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ ส่วน MBC จะมองที่การฆ่าเชื้อจริง ๆ ในกระบวนการทดสอบ MBC จะทำการเพาะเชื้อในหลอดทดลองที่มีการใช้ยาต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำเชื้อที่เพาะได้มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาต้านจุลชีพ หากเชื้อไม่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาต้านจุลชีพ แสดงว่าค่าความเข้มข้นนั้นมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจริง

2.4 ยาต้านจุลชีพ

ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อของแบคทีเรีย จะใช้ยาต้านจุลชีพ (antibiotic) ในการรักษา ซึ่งยาต้านจุลชีพจะมีทั้งที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (bacteria static) ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะทำการกำจัดแบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง การเจริญเติบโตแล้วในภายหลัง โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรีย แบ่งออกได้เป็น 3 กลไกหลัก ได้แก่

- 1) ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และผนังของแบคทีเรีย
- 2) ยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เช่น ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ
- 3) ยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรีย โดยเป้าหมาย (target sites) ในการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพจะมีผลต่อเซลล์แบคทีเรียและสิ่งแวดล้อมรอบแบคทีเรียเท่านั้น (specific for bacteria) ไม่มีผลต่อเซลล์ของมนุษย์

2.4.1 กลไกของยาต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพ แบ่งตามกลไกได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

1) ยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (cell wall synthesis inhibitors) เป็นกลุ่มยาที่รบกวนกระบวนการสร้างโครงสร้างผนังเซลล์ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ penicillin - binding protein (PBPs) ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้าง peptidoglycan ที่เป็นส่วนสำคัญของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์และนำไปสู่การตายของแบคทีเรีย ตัวอย่างยากลุ่มนี้ ได้แก่ penicillin, cephalosporins, carbapenems, monobactams และ glycopeptides (Kapoor G., 2017)

2) ยาต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งการทำหน้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (inhibitors of membrane function) เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) เป็นส่วนที่ล้อมรอบไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ หากเยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือสูญเสียการทำงาน จะทำให้สารสำคัญไหลออกจากเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียตาย ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์รบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ กลุ่ม polymyxins ซึ่งนิยมใช้ในกรณีการติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยา

3) ยาต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย (protein synthesis inhibitors) กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรียเป็นกระบวนการที่สำคัญ เช่น เซลล์มนุษย์ ซึ่งไรโบโซมจะทำหน้าที่สร้างโปรตีนในแบคทีเรียจะพบไรโบโซมชนิด 70S ประกอบด้วยหน่วยย่อย 30S และ 50S ซึ่งหน่วยย่อยทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นเป้าหมายหลักของยา (สิริมา สิตะรุ โน, 2561) ยาต้านจุลชีพที่ยับยั้งไรโบโซมหน่วยย่อยชนิด 30S ได้แก่ aminoglycoside และ tetracycline ยาต้านจุลชีพที่ยับยั้งไรโบโซมหน่วยย่อยชนิด 50S ได้แก่ macrolides, clindamycin, linezolid, streptogramins และ chloramphenicol

4) ยาต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid synthesis inhibitors) กรดนิวคลีอิกในเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ซึ่งยาต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ทำให้กระบวนการ transcription ถูกรบกวน ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ ส่งผลให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ mRNA ส่งผลให้ไม่มีการสร้างโปรตีนเกิดขึ้นในลำดับถัดไป ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ rifampin ส่วนยาต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ มีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของเกลียวดีเอ็นเอ ในกระบวนการจำลองตัวของดีเอ็นเอ เมื่อเอนไซม์ DNA gyrase ถูกยับยั้ง ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดภายในในเซลล์และเซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ quinolones หรือยาบางชนิดมีผล

ต่อดีเอ็นเอ โดยตรง เช่น metronidazole ซึ่งยาจะอยู่ในรูปที่ไม่ออกฤทธิ์ (prodrug) เมื่อยาเข้าสู่เซลล์ แบคทีเรียจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไนโตร (nitro anionic radical) ไปจับกับสายดีเอ็นเอส่งผลให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอในแบคทีเรีย

5) ยาด้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งกรดโฟลิก (folic acid metabolism inhibitors) กรดโฟลิกในแบคทีเรียมีหน้าที่ที่สำคัญ คือ เป็น cofactor ในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อยาด้านจุลชีพไปยับยั้งการสร้างและการทำงานของกรดโฟลิก ส่งผลให้เกิดการรบกวนกระบวนการสร้างสารพันธุกรรมของแบคทีเรียเซลล์แบคทีเรียจึงหยุดการเจริญเติบโต ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ sulfonamides และ trimethoprim (อารยา ข้อคำ, 2563)

2.5 กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพ

การดื้อยาด้านจุลชีพของแบคทีเรียเกิดจากแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยาด้านจุลชีพที่ได้รับ เพื่อความอยู่รอดด้วยกลไกต่าง ๆ ดังนี้

1) Intrinsic resistance คือ การที่ยาด้านจุลชีพบางชนิดไม่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้ เนื่องจากธรรมชาติของแบคทีเรียชนิดนั้นไม่มี target sites สำหรับยาด้านจุลชีพ

2) Acquired resistance เมื่อได้รับยาด้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสม ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีกลไกการปรับตัวต่อยาด้านจุลชีพที่ได้รับ เพื่อการมีชีวิตรอดส่งผลให้เกิดการดื้อยาตามมาและการใช้ยาด้านจุลชีพต่อเชื้อที่ดื้อจึงไม่ได้ผล โดยแบคทีเรียบางชนิดอาจใช้หลายกลไกร่วมกัน ในการดื้อยาซึ่งแบ่งออกเป็นกลไกย่อย ดังนี้

2.1) แบคทีเรียสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (drug inactivation / modification) เช่น แบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli สร้าง beta - lactamase มาทำลายพันธะที่เชื่อมเป็น beta - lactam ring ของยา penicillin

2.2) ลดการนำยาเข้าสู่ภายในเชื้อแบคทีเรียและมีการสร้าง efflux pumps เพื่อขับยาออกจากแบคทีเรีย ทำให้ปริมาณยาในแบคทีเรียลดลง จึงเกิดการดื้อยาตามมา

2.3) แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเป้าหมายยา (alteration of target site) เช่น การดื้อต่อยา methicillin ใน MRSA มีกลไกการดื้อยาจาก PBP ถูกสร้างขึ้นใหม่เป็น PBP2a ซึ่งมีโครงสร้างต่างจาก PBP โดยการสร้าง PBP2a ถูกกำหนดโดยยีน *mecA* ที่อยู่บน staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) ของ MRSA ทำให้ยาด้านจุลชีพไม่สามารถไปจับกับ PBP ได้ หรือจับได้น้อยลง จึงออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียไม่ได้ ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา (อารยา ข้อคำ, 2563)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ธวัช กิตติบัญญัติ และคณะ (พ.ศ. 2558) ศึกษาประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ปีก โดยทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้แดงและตะไคร้ขาวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ปีก 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp. ที่ความเข้มข้น 1 - 100% (v/v) ทดสอบด้วยวิธี disk diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ ที่ความเข้มข้น 10 - 100% (v/v) และการทดสอบเพื่อหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี micro - well dilution ที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 0.25 - 100% (v/v) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ขาวให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp. ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้แดงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 - 100% (v/v) และหาค่า MIC ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 - 100% (v/v) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้แดงและตะไคร้ขาวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus* spp. ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5% ตามลำดับ

กาญจนา ศรีช่วย และคณะ (พ.ศ. 2564) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดจากต้นตะไคร้บ้าน โดยสกัดสารสำคัญจากต้นตะไคร้บ้านด้วย 95% เอทานอล โดยศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นตะไคร้บ้าน ด้วยเทคนิค disk diffusion โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 1.5×10^8 CFU/mL และใช้สารสกัดจากต้นตะไคร้บ้านเข้มข้น 20 µg/disk ตรวจสอบผลการต้านเชื้อก่อโรคของสารสกัดต้นตะไคร้บ้าน โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดยับยั้งจากต้นตะไคร้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ 5 สายพันธุ์จากทั้งหมด 7 สายพันธุ์ โดยพบว่าสารสกัดต้นตะไคร้บ้านสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ได้ดีที่สุดโดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง 3.24 ± 0.42 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.08 ± 0.62 , 2.50 ± 0.25 และ 1.37 ± 0.14 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* พบได้เพียงเล็กน้อยโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 0.080 ± 0.1 มิลลิเมตร และพบว่าสารสกัดยับยั้งจากต้นตะไคร้ไม่สามารถต้าน

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ เนื่องจากไม่พบวงใส การยับยั้งเกิดขึ้นบนจานอาหารทดสอบ

อัจฉรินทร์ สุวรรณภักดี และคณะ (พ.ศ.2562) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจาก ตะไคร้หอยวกและตะไคร้หอมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* และ *Escherichia coli* สกัดน้ำมันหอมระเหยจาก ตะไคร้หอยวกและตะไคร้หอมด้วยวิธีการกลั่นไอน้ำได้ปริมาณ 1.76% และ 1.28% นำมาทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด โดยใช้วิธี broth dilution ทำการ เจือจางน้ำมันหอมระเหยใน 10 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.3906 – 200 µg/mL พบว่าน้ำมันหอม ระเหยจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *S. agalactiae* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *E. coli* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.125, 3.125 และ 12.5 µg/mL และค่า MBC เท่ากับ 6.25, 25.0 และ 25.0 µg/mL ตามลำดับ

ทิพย์รัตน์ ขาหอมชื่น และวิมลรัตน์ อินสวร (พ.ศ.2561) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมัน หอมระเหยทางการค้า ได้แก่ กานพลู ตะไคร้ และอบเชย ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี broth dilution พบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีค่า MIC ต่อ *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* เท่ากับร้อยละ 0.125, 0.25, 0.25 และ 1.0 ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากับ ร้อยละ 0.5, 1.0, 0.5 และ 2.0 ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีที่สุด ส่วน *B. subtilis*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* รองลงมา โดยมีค่า MIC เท่ากับร้อยละ 0.062, 0.125, 0.125 และ 2.0 ตามลำดับ และค่า MBC ต่อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับ ร้อยละ 0.25 เท่ากัน ส่วนน้ำมันหอมระเหยอบเชยมีค่า MIC ต่อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ร้อยละ 1.0 ต่อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ร้อยละ 2.0 และค่า MBC ต่อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับร้อยละ 2.0 เท่ากัน แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด และจากการหาองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC - MS) พบว่าองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหย กานพลู คือ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน คือ citral และในน้ำมันหอมระเหยอบเชย คือ eugenol และ cinnamaldehyde

Alsakhawy และคณะ (พ.ศ.2567) ศึกษาการเพิ่มความเสถียรทางกายภาพและฤทธิ์ต้านเชื้อ แบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (Lemongrass essential oil, LEO) โดยการห่อหุ้ม ในอนุภาคนาโนที่ทำจาก zein - sodium caseinate nanoparticles (Z - NaCAS NPs) เนื่องจากน้ำมัน หอมระเหยมักมีปัญหาความไม่เสถียรและการดูดซึมต่ำ ทำให้ยากต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา

นักวิจัยได้ใช้เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) , Fourier - Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) และ Transmission Electron Microscopy (TEM) ในการวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาคนาโน พบว่าอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็ก 243 นาโนเมตร ศักย์ไฟฟ้าพื้นผิว - 32 mV และมีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสูงถึง 84.7% นอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มช่วยเพิ่มความเสถียรทางความร้อนของน้ำมันตะไคร้ ทำให้การปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เป็นไปอย่างต่อเนื่อง ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนที่บรรจุน้ำมันตะไคร้ถูกทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* พบว่าอนุภาคนาโนที่มีน้ำมันตะไคร้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสูงกว่าน้ำมันตะไคร้แบบอิสระถึง 2 - 4 เท่า โดยมีผลทำให้เชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีการซึมผ่านเพิ่มขึ้นและเกิดการรั่วไหลของเอนไซม์ภายในเซลล์ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า nanoencapsulation สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ทั้งในแง่ของความเสถียรและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะเชื้อแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งสามารถนำไปใช้ต่อยอดในอุตสาหกรรมยาและเวชสำอาง เช่น ระบบนำส่งยา (drug delivery systems) ได้ในอนาคต

de Oliveira Alencar และคณะ (พ.ศ.2565) ศึกษาการทำไมโครเอนแคปซูลชั้น (microencapsulation) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้าน (CCEO) โดยทำแบบระเหยแห้ง (spray drying) โดยไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้าน แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ซึ่งมีค่าความเข้มข้นยับยั้งต่ำสุด (MIC) อยู่ในช่วง 10 – 20%

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การออกแบบงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยประยุกต์ในสาขาจุลชีววิทยาคลินิก โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเชิงทดลอง เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งของตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี disk diffusion และ broth microdilution ทำการทดสอบ ณ ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือ

- 1) Hot air oven รุ่น B50/ Memmert/ Germany
- 2) Autoclave รุ่น E - 315 ASTELL/ UK Tomyseilo CO., LTE/ Japan
- 3) Incubator รุ่น SPAX/ PATANAISULITE/ Thailand
- 4) เครื่องชั่งสาร digital 2 ตำแหน่ง Scout Pro/ OHAUS/ America
- 5) Vortex mixer genie 2
- 6) Densitometer รุ่น DEN - 1B/ Biosan/ England

3.2.2 อุปกรณ์

- 1) Steriled tube ขนาด 16 x 100 mL
- 2) Steriled seropipette ขนาด 1 mL, 5 mL และ 10 mL
- 3) Autopipette ขนาด 200 μ L และ 1,000 μ L
- 4) Tip ขนาด 200 μ L
- 5) Multichannel micropipette
- 6) 96 – well microtiter plate

- 7) Loop
- 8) Petri dish
- 9) ลูกยาง
- 10) Rack
- 11) Forcep
- 12) Whatman paper disk ขนาด 6 mm GE Healthcare, UK
- 13) Sterile swab

3.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

3.3.1 สารเคมีในการทดสอบ

- 1) น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้
- 2) Gentamicin disk (10 µg) OXOID, UK
- 3) Ciprofloxacin disk (5 µg) OXOID, UK
- 4) Citral
- 5) Resazurin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 6) Dimethyl sulfoxide (DMSO) Merck, Japan

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 1) Mueller - Hinton agar OXOID, UK
- 2) Mueller - Hinton broth OXOID, UK
- 3) Blood agar

3.4 วิธีทดลอง

3.4.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

ผลของพืช *Cymbopogon citratus* หรือตะไคร้บ้านสด ถูกเก็บจากพื้นที่ในจังหวัด เชียงราย ทางภาคเหนือของประเทศไทย ตัวอย่างพืชได้รับการระบุชนิดโดยเจ้าหน้าที่จากคณะ วิทยาศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (hydrodistillation)

- 1) ผลของพืช *Cymbopogon citratus* จำนวน 1 กิโลกรัม ถูกทำความสะอาด และหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำตัวอย่างพืชแช่ในน้ำกลั่น 2.2 ลิตร
- 2) ตัวอย่างพืชที่ถูกหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาวางบนตะแกรงในหม้อกลั่น ซึ่งไม่มี น้ำอยู่เลย ใส่น้ำภายนอกอาจเป็นไอน้ำอ้อมตัวหรือไอน้ำร้อนจัดที่ความดันสูงกว่าความดันบรรยากาศ ส่งไปตามท่อไต้ตะแกรงให้ไอน้ำผ่านไปถูกกับตัวอย่างพืชบนตะแกรง ไอน้ำร้อนจะพาน้ำมันหอมระเหยออกมาจากตัวอย่างพืช โดยไอน้ำจะแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืช ความร้อนจะทำให้ น้ำมันหอมระเหยกลายเป็นไอน้ำมากับไอน้ำและส่งไปตามท่อผ่านระบบ หล่อเย็น จากนั้นน้ำมันหอมระเหยและไอน้ำจะควบแน่นกลายเป็นของเหลว
- 3) ของเหลวที่ได้สามารถแยกชั้นเป็นสามส่วน คือน้ำมันหอมระเหยอยู่ส่วนบน น้ำมันหอมระเหยและน้ำ (hydrosol) อยู่ส่วนกลาง และน้ำจะอยู่ส่วนล่าง
- 4) กรองเฉพาะส่วนของน้ำมันหอมระเหยที่บริสุทธิ์มาใช้ แก๊บที่ภาชนะสะอาด ปิดสนิท และเก็บในที่เย็นจะช่วยรักษาคุณภาพของสารให้คงที่มากขึ้น น้ำมันที่ได้จะใสสะอาด ไม่มีกลิ่นหืน และยังคงสภาพวิตามินต่าง ๆ ตามธรรมชาติไว้อย่างครบถ้วนและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการทดสอบ

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษานี้ใช้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* และแบคทีเรีย สายพันธุ์ มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ จุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบน blood agar แล้ว incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารประกอบด้วยวิธี disk diffusion

ในการศึกษานี้จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของน้ำมันหอมระเหยสกัดจาก ตะไคร้ ด้วยวิธี disk diffusion โดยมีขั้นตอน ดังนี้

- 1) เตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยนำเชื้อมาปรับความขุ่นใน sterilized normal saline ให้ความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) ด้วยเครื่อง densitometer
- 2) จากนั้น streak เชื้อด้วย sterilized swab 3 ทิศทางให้ทั่วทั้ง Mueller - Hinton agar

- 3) หยด citral ปริมาตร 10 μL ลงบน Whatman paper disk ขนาด 6 mm รอ 15 นาที
- 4) หยดน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ (CCEO) ปริมาตร 10 μL ลงบน Whatman paper disk ขนาด 6 mm รอ 15 นาที
- 5) ใช้ gentamicin และ ciprofloxacin เป็น reference antibiotic วาง disk ยา gentamicin, ciprofloxacin และ disk ที่มีน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ (CCEO) ลงบน Mueller - Hinton agar ที่มีเชื้อ
- 6) วาง disk ที่หยด citral ลงบน Mueller – Hinton agar ที่มีเชื้อ
- 7) นำไปเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แล้ววัด inhibition zone มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm)
- 8) แปลผล inhibition zone ของ gentamicin และ ciprofloxacin กับตาราง CLSI 2025 และแปลผล inhibition zone ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ โดยแบ่งผลเป็น 4 ระดับ คือ no activity เมื่อ inhibition zone = 6 mm, weak activity เมื่อ $6\text{ mm} < \text{inhibition zone} \leq 12\text{ mm}$, moderate activity เมื่อ $12\text{ mm} < \text{inhibition zone} < 20\text{ mm}$ และ strong activity เมื่อ inhibition zone $\geq 20\text{ mm}$ (LV et al., 2011)

3.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารประกอบด้วยวิธี broth microdilution

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ ด้วยวิธี broth microdilution โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารละลาย น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 400 mg/mL
2. ปรับความขุ่นเชื้อด้วย steriled normal saline ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) ด้วยเครื่อง densitometer
3. ทำการเจือจางเชื้อทดสอบใน steriled normal saline ให้ได้ความเข้มข้น 5×10^5 CFU/mL
4. เจือจางน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ใน 96 – well microtiter plate ด้วย serial 2 fold dilution ใน cation adjusted Mueller - Hinton broth ตั้งแต่ 32 mg/mL ถึง 0.25 mg/mL ในหลุมที่ A ถึง H โดยเติม cation adjusted Mueller Hinton broth และ oil และเชื้อทดสอบ ดังตารางที่ 3.1 และในการทดสอบจะมีหลุมควบคุม ได้แก่ หลุม bacterial control ซึ่งประกอบด้วย cation adjusted Mueller - Hinton broth และเชื้อ (ทำเพื่อดูว่าเชื้อที่ใช้ทดสอบสามารถเจริญได้)

จากนั้นวิเคราะห์หาค่า MIC index (MBC/MIC ratio) และแปลผลการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเกณฑ์ : bactericidal; MIC index ≤ 4 , bacteriostatic; MIC index > 4 และ resistance; MIC index ≥ 32 (Gatsing et al., 2009)

3.5 การรวบรวมข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูล

นำเสนอข้อมูลในรูปแบบสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ค่าเฉลี่ยของขนาด inhibition zone, ค่า MIC, ค่า MBC และค่า MIC index ของน้ำมันหอมระเหยสกัดจาก ตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ด้วยวิธี disk diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยขนาดของวงยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) อยู่ในช่วงระหว่าง 10.6 ± 6.9 มิลลิเมตร โดย CCEO สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด ได้แก่ *V. cholerae* ซึ่งมีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 26.0 ± 1.0 มิลลิเมตร ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ คือ *P. aeruginosa* ซึ่งมีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 6.0 ± 0.0 มิลลิเมตร ส่วนเชื้อ *S. Typhi*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ATCC 25922 และ *A. baumannii* มีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 9.3 ± 0.6 , 9.3 ± 1.2 , 8.0 ± 0.0 , 8.7 ± 0.6 และ 7.0 ± 0.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* ของ gentamicin พบว่า gentamicin สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 19.0 ± 0.0 มิลลิเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 19.0 ± 0.0 , 20.3 ± 0.6 , 17.0 ± 0.0 , 20.0 ± 1.0 , 22.3 ± 0.6 และ 31.0 ± 0.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* ของ ciprofloxacin พบว่า ciprofloxacin สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 30.7 ± 1.2 มิลลิเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi*

โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 30.0 ± 0.0 , 25.7 ± 0.6 , 22.0 ± 0.0 , 23.3 ± 0.6 , 33.0 ± 1.7 และ 37.3 ± 0.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ พบว่าน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้สามารถยับยั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* ในการควบคุมคุณภาพของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ด้วยวิธี broth microdilution สำหรับหลุม DMSO control ซึ่งมีความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5 % (v/v) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ที่ใช้ในการเจือจางน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบสามารถเจริญได้ แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ความเข้มข้นดังกล่าวนี้ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ สามารถยับยั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 โดยมีค่าเฉลี่ย MIC เท่ากับ 16.0 ± 0.0 mg/mL และมีค่าเฉลี่ย MBC เท่ากับ 16.0 ± 0.0 mg/mL นอกจากนี้ CCEO สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* โดยมีค่าเฉลี่ย MIC เท่ากับ 9.3 ± 6.1 , 21.3 ± 9.2 , 4.7 ± 3.1 , 16.0 ± 0.0 , 1.0 ± 0.0 และ 4.0 ± 0.0 mg/mL ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ย MBC เท่ากับ 10.7 ± 4.6 , 26.7 ± 9.2 , 4.7 ± 3.1 , 21.3 ± 9.2 , 1.0 ± 0.0 และ 5.3 ± 2.3 mg/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ทั้งนี้ค่า MIC index (MBC/MIC ratio) ของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* อยู่ในช่วง 1.0 – 1.3 แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. Typhi* เป็นแบบ bactericidal effect

ตารางที่ 4.1 Inhibition zone และการแปลผลของ *Cymbopogon citratus* essential oil (CCEO) ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

Organism	CCEO		
	Inhibition zone diameter (mm)	Mean $\pm$ SD	Interpretation
Reference strain (n=1)			
<i>E.coli</i> ATCC 25922	8, 8, 8	8.0 $\pm$ 0.0	weak activity
Clinical strains (n=6)			
<i>E. coli</i>	10, 8, 10	9.3 $\pm$ 1.2	weak activity
<i>P. aeruginosa</i>	6, 6, 6	6.0 $\pm$ 0.0	no activity
<i>A. baumannii</i>	8, 9, 9	8.7 $\pm$ 0.6	weak activity
<i>K. pneumoniae</i>	7, 7, 7	7.0 $\pm$ 0.0	weak activity
<i>V. cholerae</i>	27, 25, 26	26.0 $\pm$ 1.0	strong activity
<i>S. Typhi</i>	10, 9, 9	9.3 $\pm$ 0.6	weak activity

หมายเหตุ

CCEO คือ น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้

inhibition zone ของ CCEO แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ no activity เมื่อ inhibition zone = 6 mm, weak activity เมื่อ inhibition zone $\leq$ 12 mm, moderate activity เมื่อ 12 mm < inhibition zone < 20 mm และ strong activity เมื่อ inhibition zone $\geq$ 20 mm (LV et al., 2011)

ตารางที่ 4.2 Inhibition zone และการแปลผลของยา gentamicin ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

Organism	Gentamicin		
	Inhibition zone diameter (mm)	Mean $\pm$ SD	Interpretation
Reference strain (n=1)			
<i>E.coli</i> ATCC 25922	19, 19, 19	19.0 $\pm$ 0.0	Within QC range
Clinical strains (n=6)			
<i>E. coli</i>	19, 19, 19	19.0 $\pm$ 0.0	Susceptible (≥ 18 mm)
<i>P. aeruginosa</i>	21, 20, 20	20.3 $\pm$ 0.6	No interpretation
<i>A. baumannii</i>	17, 17, 17	17.0 $\pm$ 0.0	Susceptible (≥ 15 mm)
<i>K. pneumoniae</i>	21, 20, 19	20.0 $\pm$ 1.0	Susceptible (≥ 18 mm)
<i>V. cholerae</i>	23, 22, 22	22.3 $\pm$ 0.6	Susceptible (≥ 15 mm)
<i>S. Typhi</i>	31, 31, 31	31.0 $\pm$ 0.0	No interpretation

หมายเหตุ

QC range ของ gentamicin ต่อ *E. coli* ATCC 25922 ตาม CLSI 2025 มีค่า inhibition zone (IZD) = 19 - 26 mm

การแปลผล IZD ของ gentamicin ต่อ *E. coli* ตาม CLSI 2025 เมื่อ inhibition zone ≤ 14 mm แสดงว่า resistant, เมื่อ IZD = 15 - 17 mm แสดงว่า intermediate และเมื่อ IZD ≥ 18 mm แสดงว่า susceptible

การแปลผล IZD ของ gentamicin ต่อ *A. baumannii* เมื่อ IZD ≤ 12 mm แสดงว่า resistant, เมื่อ $13 \text{ mm} \leq \text{IZD} \leq 14 \text{ mm}$ แสดงว่า intermediate และเมื่อ IZD $\geq 15 \text{ mm}$ แสดงว่า susceptible

การแปลผล IZD ของ gentamicin ต่อ *K. pneumoniae* เมื่อ IZD $\leq 14 \text{ mm}$ แสดงว่า resistant, เมื่อ IZD = 15 - 17 mm แสดงว่า intermediate และเมื่อ IZD $\geq 18 \text{ mm}$ แสดงว่า susceptible

การแปลผล IZD ของ gentamicin ต่อ *V. cholerae* เมื่อ IZD $\leq 12 \text{ mm}$ แสดงว่า resistant, เมื่อ IZD = 13 - 14 mm แสดงว่า intermediate และเมื่อ IZD $\geq 15 \text{ mm}$ แสดงว่า susceptible

No interpretation ไม่มี zone diameter breakpoint ในการแปลผล

ตารางที่ 4.3 Inhibition zone และการแปลผลของยา ciprofloxacin ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

Organism	Ciprofloxacin		
	Inhibition zone diameter (mm)	Mean $\pm$ SD	Interpretation
Reference strain (n=1)			
<i>E.coli</i> ATCC 25922	30, 30, 32	30.7 $\pm$ 1.2	Within QC range
Clinical strains (n=6)			
<i>E. coli</i>	30, 30, 30	30.0 $\pm$ 0.0	Susceptible (≥ 26 mm)
<i>P. aeruginosa</i>	25, 26, 26	25.7 $\pm$ 0.6	Susceptible (≥ 25 mm)
<i>A. baumannii</i>	22, 22, 22	22.0 $\pm$ 0.0	Susceptible (≥ 21 mm)
<i>K. pneumoniae</i>	23, 24, 23	23.3 $\pm$ 0.6	Intermediate (22 - 25 mm)
<i>V. cholerae</i>	34, 31, 34	33.0 $\pm$ 1.7	Susceptible (≥ 21 mm)
<i>S. Typhi</i>	37, 38, 37	37.3 $\pm$ 0.6	Susceptible (≥ 31 mm)

หมายเหตุ

QC range ของ ciprofloxacin ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ตาม CLSI 2025 มีค่า IZD = 29 - 38 mm การแปลผล IZD ของ ciprofloxacin ต่อ *E. coli* เมื่อ IZD ≤ 21 mm แสดงว่า resistance, เมื่อ IZD = 22 - 25 mm แสดงว่า intermediate และ เมื่อ IZD ≥ 26 mm แสดงว่า susceptible การแปลผล IZD ของ ciprofloxacin ต่อ *P. aeruginosa* เมื่อ IZD ≤ 18 mm แสดงว่า resistance, เมื่อ IZD = 19 - 24 mm แสดงว่า intermediate และ เมื่อ IZD ≥ 25 mm แสดงว่า susceptible การแปลผล IZD ของ ciprofloxacin ต่อ *A. baumannii* เมื่อ IZD ≤ 15 mm แสดงว่า resistance, เมื่อ IZD = 16 - 20 mm แสดงว่า intermediate และ เมื่อ IZD ≥ 21 mm แสดงว่า susceptible การแปลผล IZD ของ ciprofloxacin ต่อ *K. pneumoniae* เมื่อ IZD ≤ 21 mm แสดงว่า resistance, เมื่อ IZD = 22 - 25 mm แสดงว่า intermediate และ เมื่อ IZD ≥ 26 mm แสดงว่า susceptible การแปลผล IZD ของ ciprofloxacin ต่อ *V. cholerae* เมื่อ IZD ≤ 15 mm แสดงว่า resistance, เมื่อ IZD = 16 - 20 mm แสดงว่า intermediate และ เมื่อ IZD ≥ 21 mm แสดงว่า susceptible

การแปลผล IZD ของ ciprofloxacin ต่อ *S. Typhi* เมื่อ $IZD \leq 20$ mm แสดงว่า resistance, เมื่อ $IZD = 22 - 30$ mm แสดงว่า intermediate และ เมื่อ $IZD \geq 31$ mm แสดงว่า susceptible

ตารางที่ 4.4 MIC และ MBC ของ *Cymbopogon citratus* essential oil (CCEO) ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

Organism	CCEO		
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC index
Reference strain (n=1)			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16.0 ± 0.0	16.0 ± 0.0	1.0
Clinical strains (n=6)			
<i>E. coli</i>	9.3 ± 6.1	10.7 ± 4.6	1.2
<i>P. aeruginosa</i>	21.3 ± 9.2	26.7 ± 9.2	1.3
<i>A. baumannii</i>	4.7 ± 3.1	4.7 ± 3.1	1.0
<i>K. pneumoniae</i>	16.0 ± 0.0	21.3 ± 9.2	1.3
<i>V. cholerae</i>	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0
<i>S. Typhi</i>	4.0 ± 0.0	5.3 ± 2.3	1.3

MIC index คือ MBC/MIC ratio ซึ่งถ้ามีค่า $MIC\ index \leq 4$ แสดงว่า มีคุณสมบัติเป็น bactericidal ถ้ามีค่า $MIC\ index > 4$ แสดงว่า มีคุณสมบัติเป็น bacteriostatic และถ้ามีค่า $MIC\ index \geq 32$ จะมีคุณสมบัติเป็น resistance (Gatsing et al., 2009)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ตะไคร้บ้านเป็นสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในเขตร้อน โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ผลของตะไคร้บ้านสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ได้มากมาย โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ (CCEO) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์มาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 และแบคทีเรียแกรมลบ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae* และ *S. Typhi*

จากการศึกษาในครั้งนี้ด้วยวิธี disk diffusion พบว่า CCEO สามารถยับยั้งเชื้อ *V. cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า inhibition zone เฉลี่ยอยู่ที่ 26.0 ± 1.0 มิลลิเมตร ซึ่งจัดอยู่ในระดับ strong activity รองลงมาเป็น *S. Typhi*, *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *A. baumannii* โดยมีค่าเฉลี่ย inhibition zone เฉลี่ยเท่ากับ 9.3 ± 0.6 , 9.3 ± 1.2 , 7.0 ± 0.0 และ 8.7 ± 0.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งจัดอยู่ในระดับ weak activity นอกจากนี้พบว่า CCEO ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ เนื่องจาก inhibition zone เท่ากับ 6 มิลลิเมตร ซึ่งจัดอยู่ในระดับ no activity

จากการศึกษาด้วยวิธี broth microdilution พบว่า CCEO สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดย *V. cholerae*, *S. Typhi*, *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 1.0 ± 0.0 , 4.0 ± 0.0 , 4.7 ± 3.1 , 9.3 ± 6.1 , 16.0 ± 0.0 และ 21.3 ± 9.2 mg/mL ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า MIC index (MBC/MIC ratio) พบว่ามีค่า ≤ 4 แสดงให้เห็นว่า CCEO มีฤทธิ์เป็น bactericidal ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา โดยเชื้อที่ไวต่อ CCEO มากที่สุดคือ *V. cholerae* (MIC และ MBC เท่ากับ 1.0 ± 0.0 mg/mL) ในขณะที่เชื้อที่ไวต่อ CCEO น้อยที่สุดคือ *P. aeruginosa* (MIC เท่ากับ 21.3 ± 9.2 mg/mL และ MBC เท่ากับ 26.7 ± 9.2 mg/mL)

การศึกษานี้คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่ร้ายแรงหลายระบบ เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด, การติดเชื้อทางระบบหายใจ, การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีการดื้อยาต้านจุลชีพสูง ส่งผลให้ทางเลือกในการใช้ยาต้านจุลชีพลดลง จึงทำให้การรักษาผู้ป่วยมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น โดยใช้น้ำมันหอมระเหย

สกัดจากตะไคร้ ทั้งนี้เพื่อเป็นทางเลือกในการลดการใช้ยาต้านจุลชีพ ซึ่งการใช้ยาต้านจุลชีพมากเกินไปจนเกินความจำเป็นจะส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียแกรมลบเกิดการดื้อยา

กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของซิทรัล (Citral) ในน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ (CCEO) จะยับยั้งโดยรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยแทรกซึมเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดความเสียหาย ทำให้เซลล์แบคทีเรียอ่อนแอลงและตายในที่สุด และซิทรัลยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่สำคัญของเซลล์ที่ใช้สร้างพลังงาน จึงทำให้เซลล์ขาดพลังงานและไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างของ DNA และโปรตีนภายในเซลล์ ทำให้เซลล์จุลชีพเกิดความเสียหายรุนแรง และนำไปสู่การตายของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ซิทรัลยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้เชื้อมีความไวต่อการต้านจุลชีพมากขึ้น และลดโอกาสในการพัฒนาความสามารถในการดื้อยา (Gutiérrez - Pacheco, 2023)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาของรัช กิตติบัญญัติกุล และคณะ ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้แดงและตะไคร้ขาวในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ปีก ได้แก่ *E. coli*, *Streptococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp. โดยใช้วิธี disk diffusion และ micro - well dilution test พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี อย่างไรก็ตาม งานวิจัยดังกล่าวใช้ตะไคร้คนละสายพันธุ์กับการศึกษานี้ โดยตะไคร้ที่ใช้ในงานวิจัยของรัชและคณะเป็นตะไคร้ขาวและตะไคร้แดง ขณะที่ในการศึกษารั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้ตะไคร้บ้าน ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกัน และอาจส่งผลต่อฤทธิ์ด้านจุลชีพที่แตกต่างกันด้วย อีกทั้งงานวิจัยเดิมยังเน้นศึกษาต่อเชื้อแบคทีเรียเพียง 3 สายพันธุ์ ในขณะที่งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 6 สายพันธุ์และสายพันธุ์มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ เพื่อให้ครอบคลุมเชื้อก่อโรคที่หลากหลายมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม น้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์หลากหลายชนิดที่สามารถต้านทานการเจริญของแบคทีเรีย จึงมีศักยภาพต่อการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อเสริมประสิทธิภาพการต้านเชื้อ เช่น แคลปซูลรับประทาน สเปรย์พ่นจมูกและปาก น้ำยาล้างมือ และผลิตภัณฑ์ในครัวเรือน เป็นต้น นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity), การเสริมฤทธิ์กับยาต้านจุลชีพหรือสารออกฤทธิ์อื่น ด้วยวิธี checkerboard assay และการกำหนดปริมาณหรืออัตราส่วนที่เหมาะสม ก่อนการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อย่างปลอดภัย

บรรณานุกรม

- กาญจนา ศรีช่วย, โคมศรี ชูช่วย, และสิริมาภรณ์ วัชรกุล. (2564).ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากต้นตะไคร้บ้านในจังหวัดสงขลาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค.
- เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ, และนิตยา โรจน์ทินกร. (2557). การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพลาสมาจากกระชังพันธุ์ไทยต่อแบคทีเรียค้อยา.
- จเร จรัสจรรณพงศ์, และอุมาพร ทาโรสง. การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole.
- เชิดชาย แซ่ฮ่วน, ซาลิสา พินิจจันทร์, และปติ ยิ้มศิริ. (2565). ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของกรดแมนเดิลิกต่อเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*. วารสารการพยาบาลและสุขภาพ, 16(2), 55–65.
- ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น, และวิมลรัตน์ อินทวร. (2561). ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยทางการค้าต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้, 9(2), 227-236.
- ธวัช กิตติบัญญัติกุล, ชัยภูมิ บัญชาศักดิ์, จำเริญ เทียงธรรม, สุพัตร ฟ้ารุ่งแสง, และปราโมทย์ สฤษดิ์นิรันดร์. (2558). ประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ปีก. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53, 859-864.
- พจมาน ผู้มีสัตย์. (2565). เอนโดทอกซิน (Endotoxin). <https://medium.com/@potjaman.pu/เอนโดทอกซิน-endotoxin-cd86ebe0348b>
- พนัส เกลิมแสนยากร, (2562). โรคจากแบคทีเรีย. หามมอ แนะนำทุกโรค แนะนำทุกโรค. https://haamor.com/แบคทีเรีย#google_vignette
- พรนภา ขาวประเสริฐ. (2561). ประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของ 3-Acetyl aleuritolic acid จากต้นดีหมี (*Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) และยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- มาลัย วรจิตร, วันทนา ปวิณกิตติพร, สุวรรณ ตระกูลสมบุญ, และสุรางค์ เดชศิริเลิศ. (2561). การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ. คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป, 3, 215-26.

- วิภาวรรณ นิละพงษ์, บุญบา ผลโยธิน, และวันแข็ง สิทธิกิจโยธิน, (2561). การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรไทย: การสกัดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลาย. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, 28(4).
- วารกรณ์ ขุนเพชร. (2558). ลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็งในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์[วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต].
<http://kb.psu.ac.th/psukb/handle/2016/10559>
- วิศัลย์ มูลศาสตร์ และวีรวัฒน์ มโนสุทธิ. (2565). ความสำคัญของการดื้อยาด้านจุลชีพ. *แนวทางการเฝ้าระวังและสอบสวนเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ*, 1, 2-7.
- สุพรรณิ ยิงขจร, สดา สุทธิโชติ, นิธิกุล หงส์ทอง, ติ่ม บุญรอด, วิชาดา สิมลา, และศิริรัตน์ ศรีรักษา, (2564). การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในโรงพยาบาล: การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและการวิเคราะห์เชิงอภิธาน. *วารสารวิชาการสาธารณสุข*, 30(5), 916-927.
- สิริมา สิตะรุโน, และวิชัย สันติมาลีวรกุล. (2561). ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของการใช้โคลิสตินในทางปฏิบัติ. *วารสารเภสัชกรรมไทย*, 10(2), 506-51.
- อัจฉรินทร์ สุวรรณภักดี, รังสิมา สายศรีทิพย์, และสุภารัตน์ สุทธิมุสิก. (2562). ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้านนมอักเสบในโคนม: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* และ *Escherichia coli*. *แก่นเกษตร*, 40(2), 230-235.
- อัญชนา ชัดติยะวงศ์, และศิริรัตน์ พานิช. (2563). การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบฝรั่งและการเตรียมเจลล้างมือจากสารสกัดใบฝรั่ง.
- อมรรัตน์ สีสุทอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, และศรีสุดา หาญภาคภูมิ. (2559). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชพื้นบ้านชนิด. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 11(1), 69-82.
- อรอนงค์ สมทรัพย์, กรกนก พิบูลย์ผล, คอลิฟ ปะหยังหลี่, และจากรวรรณ แดงโรจน์. (2562). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะเปรียง. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*, 11(2), 156-167.
- อารยา ข้อคำ. (2563). ยาปฏิชีวนะและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. *วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*, 27(2), 125-137.
- Alam, M. F., Varshney, S., Khan, M. A., Laskar, A. A., & Younus, H. (2018). In vitro DNA binding studies of therapeutic and prophylactic drug citral. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 300-308.

- Alsakhawy, S. A., Baghdadi, H. H., El-Shenawy, M. A., & El-Hosseiny, L. S. (2024). Enhancement of lemongrass essential oil physicochemical properties and antibacterial activity by encapsulation in zein-caseinate nanocomposite. *Scientific Reports*, 14(1), 17278.
- Barr, S. (2018). *E coli: What is the bacteria and what are the symptoms of infection?*. Independent. <https://www.independent.co.uk/life-style/health-and-families/e-coli-bacteria-syptoms-infection-egypt-outbreak-treatment-explained-a8525486.html>
- Collins, J., Tack, D., Pindyck, T., & Griffin, P. (2024). Escherichia coli, Diarrheagenic. Centre for Disease Control and Prevention. Available online: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/escherichia-coli-diarrheagenic> (accessed on 17 June 2023).
- de Oliveira Alencar, D. D., de Souza, E. L., da Cruz Almeida, E. T., da Silva, A. L., Oliveira, H. M. L., & Cavalcanti, M. T. (2022). Microencapsulation of Cymbopogon citratus DC Stapf essential oil with spray drying: Development, characterization, and antioxidant and antibacterial activities. *Foods*, 11(8), 1111.
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30-33.
- Foster-Nyarko, E., & Pallen, M. J. (2022). The microbial ecology of Escherichia coli in the vertebrate gut. *FEMS microbiology reviews*, 46(3), fuac008.
- Gatsing D., Tchakoute V., Ngamga D. In vitro antibacterial activity of Crinum purpurascens herb leaf extract against the Salmonella species causing typhoid fever and its toxicological evaluation. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2009;34:126-136.
- Gustavo, M., Laisa, C., Francisco, J. (2021). Main laboratory methods used for the isolation and identification one tube osmotic fragility test *Staphylococcus* spp.
- 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.
- He, M., Li, H., Zhang, Z., Jiang, J., Li, H., Yang, W., ... & Wang, F. (2022). Microbiological characteristics and pathogenesis of Klebsiella pneumoniae isolated from hainan black goat. *Veterinary sciences*, 9(9), 471.

- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 243-250.
- Julian, F. M. (2020). *How does Pseudomonas aeruginosa affect the pharma industry?*. BioMérieux industrial microbiology. <https://www.biomerieux-industry.com/es/farmacia-y-salud/recursos/biblioteca-de-microorganismos-farmaceuticos/2020-05-12-how-does>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300-305.
- Khan, S., Abdo, A. A., Shu, Y., Zhang, Z., & Liang, T. (2023). The extraction and impact of essential oils on bioactive films and food preservation, with emphasis on antioxidant and antibacterial activities a review. *Foods*, 12(22), 4169.
- Liu, L. (2022). *Samonella typhi*. Medbullets. <https://step1.medbullets.com/microbiology/104188/salmonella-typhi>
- Ly, F., Liang, H., Yuan, O and Q., & Li C., C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057-3064.
- Minogue, T. D., Daligault, H. A., Davenport, K. W., Bishop-Lilly, K. A., Broomall, S. M., Bruce, D. C., & Johnson, S. L. (2014). Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. *Genome announcements*, 2(5), 10-1128.
- Montero, D. A., Vidal, R. M., Velasco, J., George, S., Lucero, Y., Gómez, L. A., ... & O'Ryan, M. (2023). *Vibrio cholerae*, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development. *Frontiers in medicine*, 10, 1155751.
- Mukarram, M., Choudhary, S., Khan, M. A., Poltronieri, P., Khan, M. M. A., Ali, J., ... & Shahid, M. (2021). Lemongrass essential oil components with antimicrobial and anticancer activities. *Antioxidants*, 11(1), 20.
- PHSA staff. (2012). Typhoid Fever (*Salmonella Typhi*). BC Centre for Disease control. <http://www.bccdc.ca/health-info/diseases-conditions/typhoid-fever-salmonella-typhi>
- The University of Texas at Austin. (2014). *Persistent Strain of Cholera Defends Itself Against Forces of Change, Scientists Find*. <https://news.utexas.edu/2024/05/14/persistent-strain-of-cholera-defends-itself-against-forces-of-change-scientists-find-2/>

Ullah, M. A. and Lee, L. (2023). Escherichia coli. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/colonecoli.html>

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ภาคผนวก ก
รายละเอียดการเตรียมสารเคมี

วิธีการเตรียมสาร

Blood agar

TSA	32	g
Agar	4	g
Blood	25	mL
DW	800	mL

ชั่งส่วนผสมทั้งหมด นำไปต้ม ระหว่างต้มต้องมีการคนบ่อย ๆ พอเดือดเทใส่ขวด ปิดจุกสำลี หุ้มกระดาษ รัดหนังยาง นำไป autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที พอเย็นเติมเลือดลงไป 25 mL ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

สารละลาย Sterile normal saline

NaCl	8.5	g
DW	1,000	mL

ชั่ง NaCl 8.5 g ละลายในน้ำกลั่น 1,000 mL คนให้ละลาย นำไป autoclave ที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Mueller Hinton agar

Mueller Hinton agar	38	g
DW	800	mL

ชั่ง Mueller Hinton agar 38 g ละลายในน้ำกลั่น 800 mL ต้มให้ละลาย นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาเขย่าผ่านน้ำให้อุณหภูมิ ลดลงเหลือประมาณ 50°C จึงเทใส่จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

Mueller Hinton broth

Mueller Hinton broth	21	g
DW	1,000	mL
Ca ²⁺	650	μL
Mg ²⁺	1,550	μL

ซึ่ง Mueller Hinton broth 21 g ละลายในน้ำกลั่น 1,000 mL ต้มให้ละลาย นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 50°C แล้วจึงผสม Ca^{2+} 650 μL และ Mg^{2+} 1,550 μL ลงไป

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ภาคผนวก ข
รายละเอียดภาพประกอบ

รูปภาพเชื้อและสารเคมีในการทดสอบ



รูปภาพเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922



รูปภาพเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa*



รูปภาพเชื้อ *A. baumannii* และ *K. pneumoniae*



รูปภาพเชื้อ *V. cholerae* และ *S. Typhi*

รูปภาพเชื้อและสารเคมีในการทดสอบ (ต่อ)



รูปภาพ Gentamicin disk และ Ciprofloxacin disk

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

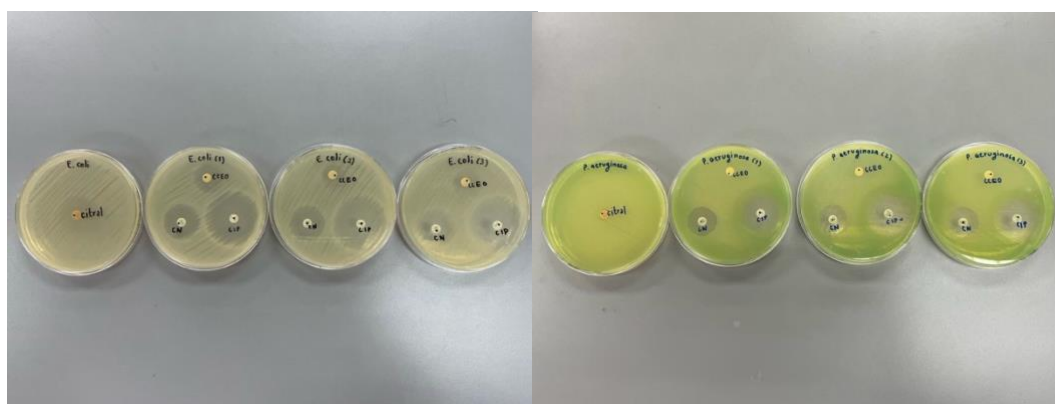
รูปภาพการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion



รูปภาพประกอบการทำ disk diffusion

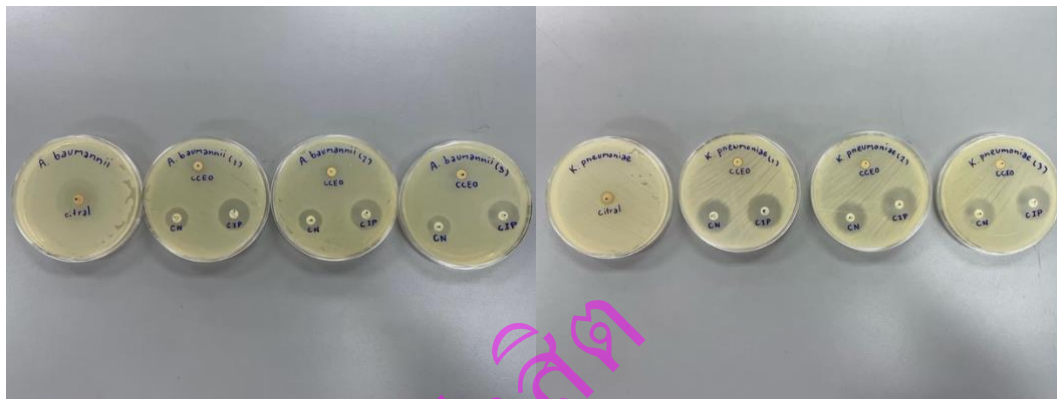


รูปภาพผล Inhibition zone ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922

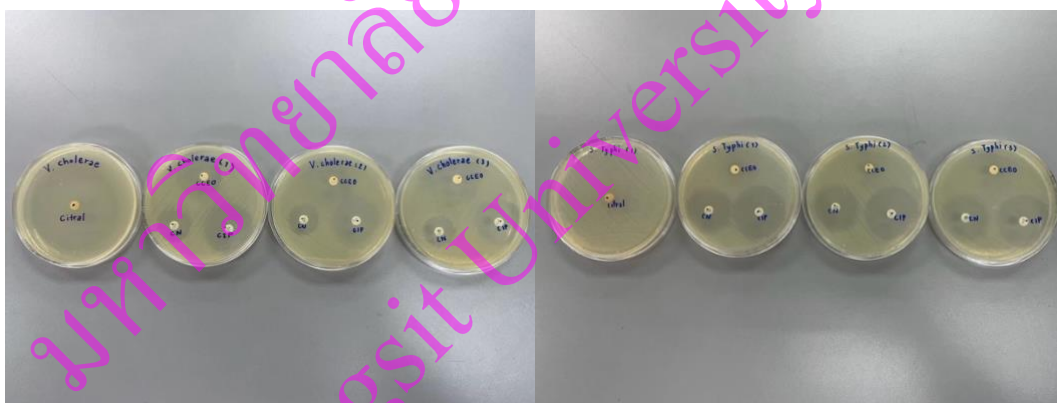


รูปภาพผล Inhibition zone ของเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa*

รูปภาพการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion (ต่อ)

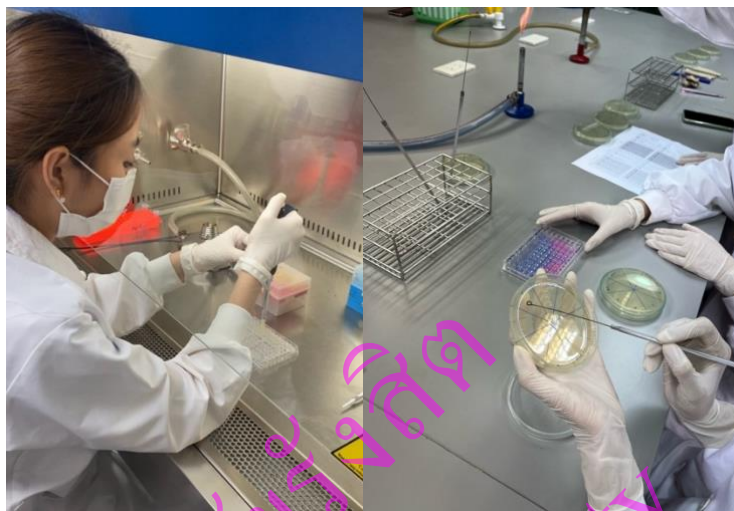


รูปภาพผล Inhibition zone ของเชื้อ *A. baumannii* และ *K. pneumoniae*

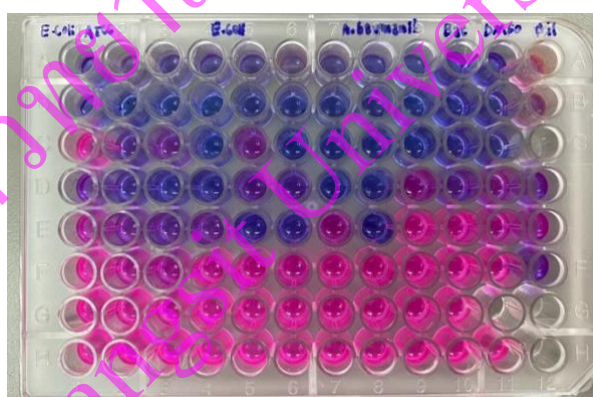


รูปภาพผล Inhibition zone ของเชื้อ *V. cholerae* และ *S. Typhi*

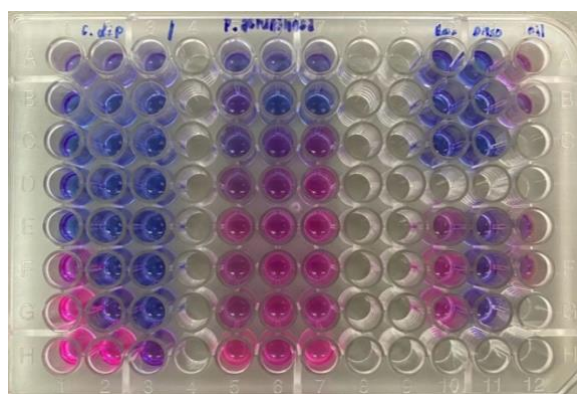
รูปภาพการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution



รูปภาพประกอบการทำ broth microdilution

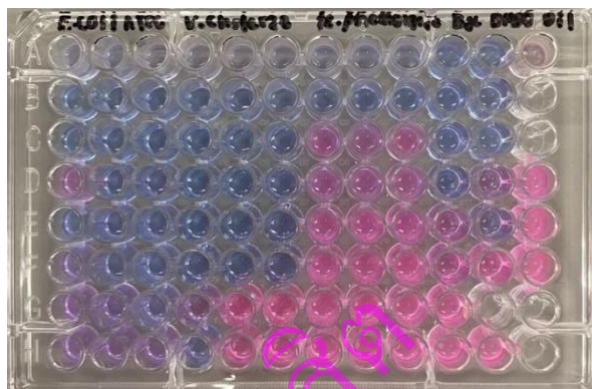


รูปภาพผล MIC ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922, เชื้อ *E. coli* และ *A. baumannii*

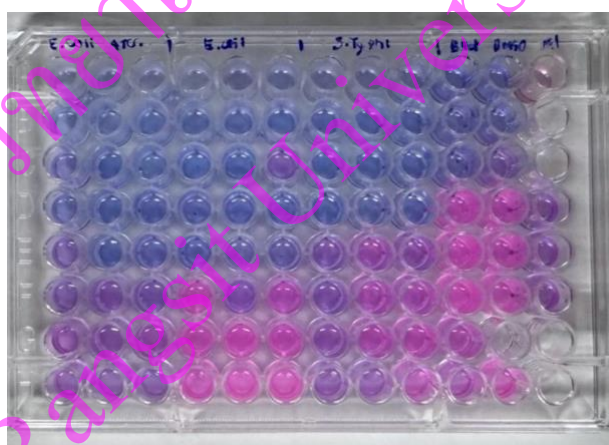


รูปภาพผล MIC ของเชื้อ *P. aeruginosa*

รูปภาพการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution (ต่อ)

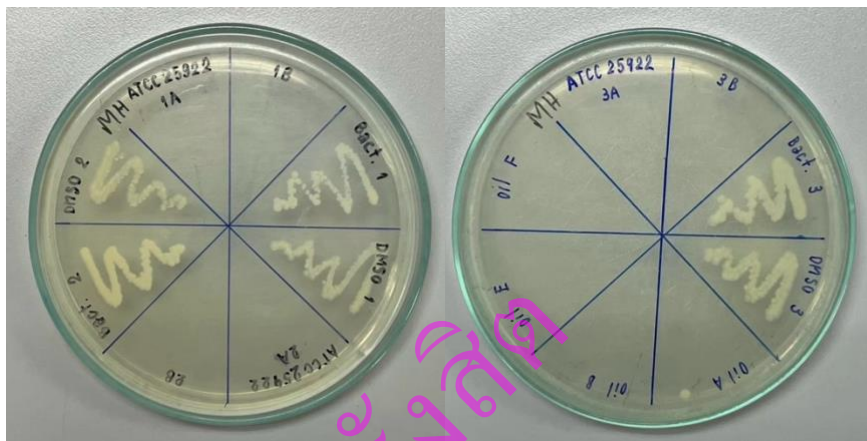


รูปภาพผล MIC ของเชื้อ *V. cholerae* และ *K. pneumoniae*

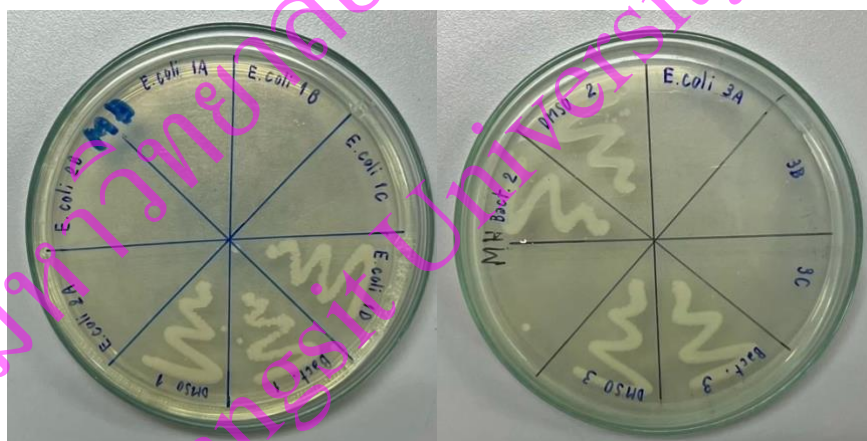


รูปภาพผล MIC ของเชื้อ *S. Typhi*

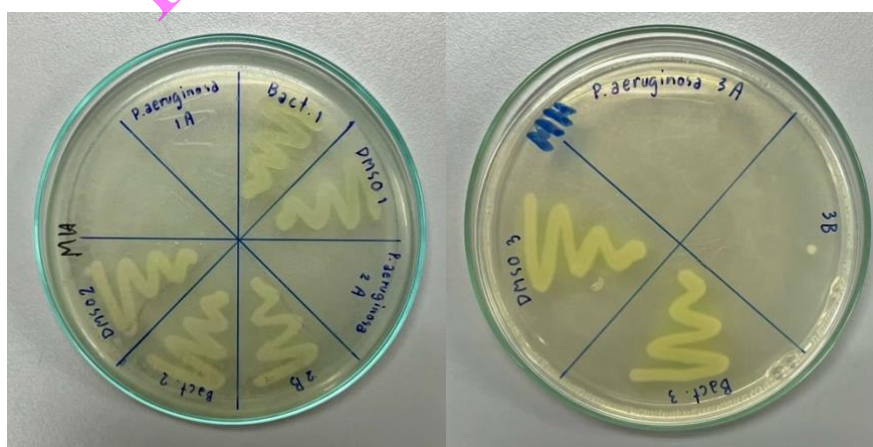
รูปภาพการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution (ต่อ)



รูปภาพผล MBC ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922



รูปภาพผล MBC ของเชื้อ *E. coli*



รูปภาพผล MBC ของเชื้อ *P. aeruginosa*

รูปภาพการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution (ต่อ)



รูปภาพผล MBC ของเชื้อ *A. baumannii*



รูปภาพผล MBC ของเชื้อ *K. pneumoniae*



รูปภาพผล MBC ของเชื้อ *V. cholerae*

รูปภาพการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution (ต่อ)



รูปภาพผล MBC ของเชื้อ *S. Typhi*

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ชนกานต์ แสงหาญ
วัน เดือน ปีเกิด	14 พฤษภาคม พ.ศ.2547
สถานที่เกิด	พิษณุโลก
ที่อยู่ปัจจุบัน	11/1 หมู่ 2 ตำบลนาเกาะ อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 จากโรงเรียนหล่มสักวิทยาคม จังหวัดเพชรบูรณ์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 จากโรงเรียนหล่มสักวิทยาคม จังหวัดเพชรบูรณ์
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ณิชาดา เอี่ยมสุกใส
วัน เดือน ปีเกิด	21 พฤษภาคม พ.ศ.2547
สถานที่เกิด	นนทบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	123/13 หมู่บ้านบริพาณีย์ ดิวนนท์ - ราชพฤกษ์ ตำบลบางชะแยง อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 จากโรงเรียนสารสาสน์วิเทศราชพฤกษ์ จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 จากโรงเรียนสารสาสน์วิเทศราชพฤกษ์ จังหวัดนนทบุรี
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นิสารัตน์ ใจเที่ยง
วัน เดือน ปีเกิด	17 พฤษภาคม พ.ศ.2547
สถานที่เกิด	สมุทรปราการ
ที่อยู่ปัจจุบัน	1/108 หมู่ 20 หมู่บ้านมณทิรา ตำบลบางพลีใหญ่ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 จากโรงเรียนบางพลีราษฎร์บำรุง จังหวัดสมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 จากโรงเรียนบางพลีราษฎร์บำรุง จังหวัดสมุทรปราการ
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	บัณฑิตา แจ่มศรี
วัน เดือน ปีเกิด	5 สิงหาคม พ.ศ.2545
สถานที่เกิด	ราชบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	515/94 หมู่ 6 หมู่บ้านแสนสุข ตำบลบ้านหม้อ อำเภอเมืองเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2560 จากโรงเรียนเบญจมเทพอุทิศ จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2563 จากโรงเรียนเบญจมเทพอุทิศ จังหวัดเพชรบุรี
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	พนัสนิศา แจ่มศรี
วัน เดือน ปีเกิด	7 พฤศจิกายน พ.ศ.2546
สถานที่เกิด	ประจวบคีรีขันธ์
ที่อยู่ปัจจุบัน	515/94 หมู่ 6 หมู่บ้านแสนสุข ตำบลบ้านหม้อ อำเภอเมืองเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2561 จากโรงเรียนพรหมานุสรณ์ จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2564 จากโรงเรียนพรหมานุสรณ์ จังหวัดเพชรบุรี
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ภัทรกร ฐเนศภัทรกุล
วัน เดือน ปีเกิด	7 มกราคม พ.ศ.2546
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	61 ซอยพหลโยธิน 48 ถนนพหลโยธิน แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10220
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2560 จากโรงเรียนมัธยมสาธิตวัดพระศรีมหาธาตุ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2563 จากโรงเรียนมัธยมสาธิตวัดพระศรีมหาธาตุ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพมหานคร
ปัจจุบัน	นักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University