ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อ *Candida albicans* สายพันธุ์ก่อโรค

The Effect of Lemongrass Volatile Oil on Pathogenic *Candida albicans*

เอนก ภู่ทอง*, จริย์สร สำอางค์ศรี, นุสรา ทรงมะลิลา, อรฤดี ขันติสิทธิพร และสุวรรณา โควะวินทวีวัฒน์

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Anek Pootong*, Jarishorn Sam-angsri, Nusara Thongmalila, Onruedee Khantisitiporn and Suwanna Cowawintaweewat

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเจริญและปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคของ *Candida albicans* สายพันธุ์ก่อโรค จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ต่อ *C. albicans* H303 เท่ากับ 0.5 mg/ml และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถฆ่า *C. albicans* H303 ได้อย่างรวดเร็วภายใน 4 ชั่วโมง นอกจากนี้การใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ sub-inhibitory concentration สามารถยับยั้งการสร้างท่องอกและ phospholipase activity ของ *C. albicans* H 303 ได้ โดยฤทธิ์ในการยับยั้งแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (dose-dependent manner) จากการวิเคราะห์ด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มี (z)-citral เป็นองค์ประกอบหลักถึงร้อยละ 89 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างท่องอกและ phospholipase activity ที่เป็นปัจจัยสำคัญในก่อโรคของ *C. albicans* ได้

คำสำคัญ : น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้, *Candida albicans*, ปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรค

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** TAE0047@hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to investigate the antifungal activity of lemongrass volatile oil against pathogenic *Candida albicans*. The results revealed that the lemongrass volatile oil possessed antifungal activity against *C. albicans* H303 with the same levels of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) at 0.5 mg/ml. At this level, lemongrass volatile oil could kill *C. albicans* within 4 hours. In addition, the sub-inhibitory concentration of lemongrass volatile oil could reduce germ tube formation and phospholipase activity of *C. albicans* in dose-dependent manner. Analysis of lemongrass volatile oil using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) demonstrated that its major component was (z)-citral consisting about 89% of the mixtures. This study showed that lemongrass volatile oil has a potent *in vitro* anticandidal activity and can inhibit virulence factors in terms of germ-tube formation and phospholipase activity of *C. albicans*.

Keywords: lemongrass volatile oil, *Candida albicans*, virulence factors

1. บทนำ

Candida albicans เป็นยีสต์ที่พบเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ตามส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ เช่น การติดเชื้อบริเวณเยื่อเมือกในช่องปากและลำคอ (oropharyngeal candidiasis) ช่องคลอด (vaginal candidiasis) และหลอดอาหาร (esophageal candidiasis) ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้ ยังสามารถแพร่กระจายสู่ระบบหมุนเวียนเลือดก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต (candidiamia) และเข้าสู่อวัยวะภายใน ก่อให้เกิด systemic candidiasis ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ป่วยได้

ในปัจจุบันการรักษาโรค systemic candidiasis มักใช้ยาปฏิชีวนะชนิด amphotericin B และยาในกลุ่ม azole แม้ว่า amphotericin B เป็นยารักษาโรคติดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพ แต่มีผลข้างเคียง (side effect) ต่อไตและระบบเลือด โดยอาจทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ และเกิดอาการแพ้อย่างรุนแรงได้ สำหรับยาในกลุ่ม azole โดยเฉพาะ fluconazole พบว่ามีรายงานอุบัติการณ์การดื้อยาของ *Candida albicans* สูงมากยิ่งขึ้น [1] ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าสารต้าน *C. albicans* ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาได้จึงมีความสำคัญ

ตะไคร้ (lemongrass หรือ *Cymbopogon citratus*) เป็นพืชล้มลุก ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทั้งใช้ในการประกอบอาหารและใช้เป็นพืชสมุนไพร จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพชนิดต่างๆ ได้ เช่น *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุของโรคในระบบทางเดินอาหาร [2] หรือเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum gypseum* ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง [3] นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida* spp. [4] และการเกิด biofilm ของ *C. dubliniensis* ได้ [5] งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมัน

หอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเจริญและปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรค (virulence factor) ซึ่ง ได้แก่ การสร้างท่องอก (germ tube formation) และ phosphor-lipase ของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์ก่อโรค รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยดังกล่าว

2. วัสดุและวิธีการ

2.1 *C. albicans*

C. albicans H303 ที่ใช้ในการศึกษาเป็นสายพันธุ์ก่อโรคที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานี โดยเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -70°C ณ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Saboraud dextrose agar (SDA, 2% peptone, 4% dextrose, 1.5% agar) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำเชื้อมาใช้ในการทดสอบ โดยการทดสอบในแต่ละครั้งทำการทดสอบแบบควบคู่ (duplicate) และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

2.2 น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ใช้ในการศึกษาเป็นน้ำมันหอมระเหยสกัดจากใบของตะไคร้บ้านไทย (*Cymbopogon citratus*) ด้วยไอน้ำ (steam distillation) (Tropicalife, Thailand) มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอมน้ำตาล (brownish-yellow liquid) เก็บรักษาในที่มืดที่อุณหภูมิ 4°C

2.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* H303 ด้วยวิธี agar disc diffusion

กระจาย *C. albicans* H303 ที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 (1×10^6 cfu/ml) ลงบนอาหารแข็ง SDA ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ รอประมาณ 5 นาที เพื่อให้หน้าอาหารแข็งแห้ง จากนั้นวางแผ่น sterilized paper disc เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 mm ที่มีน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 5 µl และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลความสามารถในการต้านเชื้อโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (inhibition zone)

2.4 การวิเคราะห์ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

เจือจางน้ำมันหอมระเหยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Saboraud dextrose broth-Tween 80 (SDB-T, 2% peptone, 4% dextrose, 0.02% Tween 80) ปริมาตร 0.5 ml ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.0078 mg/ml จนถึง 4 mg/mlด้วยวิธี serial two-fold dilution เติม *C. albicans* H303 ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^4 cfu/ml ปริมาตร 0.5 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำ cell control และ media control เพื่อเปรียบเทียบความขุ่นและทดสอบความปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ (sterility) ตามลำดับ จากนั้น อ่านค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหย (mg/ml) จากหลอดที่มีความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่ำที่สุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังใสอยู่ และหาค่า MFC ของน้ำมันหอมระเหย โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังใสอยู่ในทุกหลอดมาปั่นตกตะกอนที่ 2,000 *x g* เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น กระจายตะกอนลงบนอาหารแข็ง SDA ด้วย sterile spreader บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านค่า MFC ได้จากหลอดที่มีความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ

2.5 การทดสอบ antifungal killing time

เติม *C. albicans* H303 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 cfu/ml ปริมาตร 0.5 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB-T ปริมาตร 0.5 ml ที่มีน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.25, 0.5 และ 1.0 mg/ml) จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 µl ที่ชั่วโมง 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 แล้วกระจายอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวบนอาหารแข็ง SDA จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวน colony ที่เกิดขึ้นและนำค่าไปคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อในหน่วย cfu/ml

2.6 การทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการสร้างท่องอกของ *C. albicans* H303

เติม *C. albicans* H303 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^3 cfu/ml ปริมาตร 125 µl ลงใน NSS-T (NSS-T, 0.85% NaCl, 0.02% Tween 80) ปริมาตร 125 µl ซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเติม heat inactivated serum ปริมาตร 250 µl โดยความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีค่าเท่ากับ 0.25 และ 0.5×MIC และทำการทดสอบการสร้างท่องอกของเชื้อในภาวะที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นการทดสอบควบคุม (cell control) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สังเกตและนับจำนวนเซลล์ที่สร้างท่องอก (germ tube) จากจำนวนทั้งหมด 200 เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการนับเซลล์มีหลักเกณฑ์ดังนี้ 1) นับเซลล์ที่มีท่องอกยาวมากกว่าหรือเท่ากับความยาวของ blastoconidia 2) นับเฉพาะเซลล์ที่อยู่เดี่ยวๆ เท่านั้น และ 3) ไม่นับเซลล์ที่เป็น hyphae หรือ pseudohyphae [8] จากนั้นคำนวณค่าการยับยั้งการสร้างท่องอกได้ ดังนี้

$$\text{reduction (\%)} = (A-B) \times 100/A$$

โดย A คือ germ tube positive (%) ของหลอดควบคุม

B คือ germ tube positive (%) ของหลอดทดสอบ

2.7 การทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อ phospholipase activity

หยด *C. albicans* H303 ที่ความเข้มข้น 5×10^5 cfu/ml ปริมาตร 5 µl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง egg yolk agar ที่มี 0.02% Tween-80 เป็นส่วนประกอบ (EYA-T, 2% peptone, 4% dextrose, 1.5% agar, 5.85% NaCl, 0.05% $CaCl_2$, 10% egg yolk, 0.02% Tween-80) [7] และมีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.25 และ 0.5×MIC นำไปบ่มใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 วัน อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และเส้นผ่าศูนย์กลางของวงฝ้ารอบโคโลนี (opaque zone) จากนั้นคำนวณค่า enzyme activity (1-Pz) เมื่อ precipitation zone (Pz) คืออัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของวงฝ้ารอบโคโลนี [9]

2.8 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ทำการวิเคราะห์โดย บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ด้วยวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ (statistical analysis)

ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการสร้างท่องอกและ phospholipase activity ของ *C. albicans* H303 ในภาวะที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5×MIC เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 mg/ml) ด้วย Mann-Whitney

U test โดยกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.05$

3. ผลการวิจัย

3.1 ความสามารถของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและการฆ่า *C. albicans* H303

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* H303 ด้วย agar disc diffusion method พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญ ของเชื้อได้ โดย clear zone ที่เกิดขึ้นรอบ disc ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีขนาดผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 57.17±7.6 mm

เมื่อทดสอบหาค่า MIC และ MFC โดยเพาะเลี้ยง *C. albicans* H303 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^3 cfu/ml ใน SDB-T ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันหอมตั้งแต่ 0.0039 mg/ml จนถึง 2 mg/ml พบว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีค่าเท่ากับ 0.5 mg/ml และเมื่อนำตะกอนจากหลอดทดลองที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังใสอยู่มาเพาะลงบนอาหารแข็ง SDA พบว่าหลอดทดลองที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดไม่พบการเจริญการเจริญของเชื้อคือ 0.5 mg/ml แสดงว่าค่า MIC และ MFC ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีค่าเท่ากันซึ่งกับ 0.5 mg/ml

3.2 antifungal killing time ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *C. albicans* H303 ที่ความเข้มข้น 5×10^5 cfu/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB-T ที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0, 0.125, 0.25 และ 0.5 mg/ml แล้วนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง SDA พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 mg/ml น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถฆ่า *C. albicans* H303 ได้ภายใน 4 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 1

3.3 ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อการสร้างท่องอกของ *C. albicans* H303

การสร้างท่องอกของเชื้อใน heat inactivated serum พบว่าในภาวะที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหย (cell control) มีค่าเท่ากับ 67.9% ขณะที่ในภาวะที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5×MIC เชื้อสามารถสร้างท่องอกได้ 18.5% และ 12.2% ตามลำดับ ($p<0.01$) โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5×MIC สามารถยับยั้งการสร้างท่องอกได้ 72.8% และ 82.0% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างท่องอกแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (dose-dependent manner)

ตารางที่ 1 การยับยั้งการสร้างท่องอก (germ tube formation) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

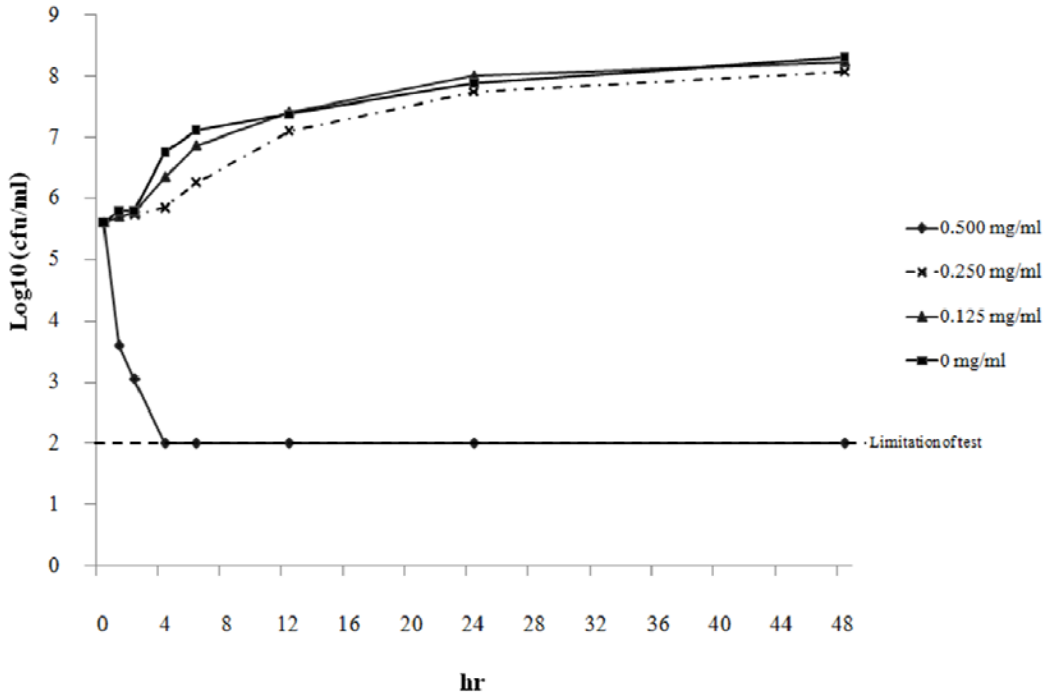
Lemongrass oil (mg/ml)	Germ tube formation (%)	Reduction (%)
0	67.9 ± 4.2	-
0.125	18.5 ± 3.9*	72.8
0.25	12.2 ± 1.8*	82.0

* $p<0.01$

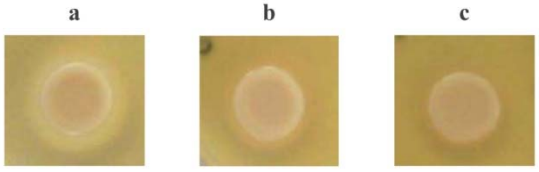
3.4 ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อ phospholipase activity

การทดสอบ Phospholipase activity ของเชื้อ *C. albicans* H303 บนอาหารแข็ง EYA-T ที่มีและไม่

มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (รูปที่ 2) พบว่า *C. albicans* ที่เพาะบนอาหารแข็ง EYA-T ที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มี Opaque zones เกิดขึ้นรอบโคโลนี โดยมี Phospholipase activity (1-Pz) เท่ากับ 0.386 ในขณะที่ *C. albicans* ที่เพาะบนอาหารที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25 mg/ml มี Phospholipase activity เท่ากับ 0.308 และ 0.228 ตามลำดับ ซึ่งมี Activity ลดลงประมาณ 20.2 และ 40.9 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2)



รูปที่ 1 การเจริญของ *C. albicans* ($5x10^5$ cfu/ml) ใน SDB-T ที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 2 opaque zones รอบโคโลนีของ *C. albicans* H303 ที่เพาะบน EYA-T ที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ (a) 0 mg/ml (b) 0.125 mg/ml และ (c) 0.25 mg/ml

ตารางที่ 2 phospholipase activity ของ *C. albicans* H303 ที่เพาะบน EYA-T ที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Lemongrass oil (mg/ml)	Phospholipase activity (1-Pz)	Decrease (%)
0	0.386 ± 0.021	-
0.125	0.308 ± 0.037*	20.2
0.25	0.228 ± 0.071*	40.9

* $p<0.01$

3.5 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า (z)-citral เป็นสารประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้โดยมีปริมาณสูงถึง 89% สำหรับสารประกอบชนิดอื่นๆ ตรวจพบได้ในปริมาณน้อย ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

Compound	Retention time	% Area
β-myrcene	7.93	3.42
Linalool L	13.14	0.38
(Z)-Citral	**21.14**	**37.55**
Geraniol	22.03	0.70
(Z)-Citral	**22.91**	**51.65**
trans-β-caryophyllene	30.99	0.38

4. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษา พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและฆ่า *C. albicans* H303 ได้ โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.5 mg/ml และจากการทดสอบ antifungal killing time พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml สามารถฆ่า *C. albicans* H303 ได้อย่างรวดเร็วภายใน 4 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นแบบ fungicidal ขณะที่ยาในกลุ่ม azole มีการออกฤทธิ์แบบ fungistatic ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญแต่ไม่สามารถฆ่า *C. albicans* ได้ [9] ดังนั้นอาจมีผลทำให้เชื้อที่ยังมีชีวิตสามารถพัฒนากลไกการดื้อยาทั้งแบบจำเพาะต่อยาชนิดนั้นๆ และแบบไม่จำเพาะ (specific and cross-resistance) ได้ในที่สุด [10]

การสร้างท่องอกและเอนไซม์ phospholipase เป็น virulence factor ที่สำคัญของ *C. albicans* เนื่องจากการสร้างท่องอกเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อจากเซลล์ยีสต์เดี่ยว (unicellular yeast form) เป็นสายรา (filamentous form) หรือที่เรียกว่า morphogenesis มีความสำคัญต่อความสามารถในการเกาะติดเยื่อบุ (adhesion) [11] และการลุกลามของเชื้อเข้าไปในเนื้อเยื่อ (mechanical invasion) และสำหรับ phospholipase ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถสลาย (hydrolyze) พันธะเอสเทอร์ (ester bond) ในโมเลกุลของ glycerophospholipid ที่พบได้ใน cell membrane จึงมีบทบาทสำคัญในการลุกลามของเชื้อ โดยทำลายผนังเซลล์เยื่อบุส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหาย [12] ในการศึกษานี้ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ sub-inhibitory concentration สามารถยับยั้งการสร้างท่องอกและลด phospholipase activity ของ *C. albicans* ในหลอดทดลองได้ ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้อาจช่วยลดโอกาสการติดเชื้อและการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าวไปสู่อวัยวะหรือระบบต่างๆ ในผู้ติดเชื้อได้

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ด้วย GC-MS พบสารประกอบ (z)-citral มีปริมาณสูงสุด ประมาณ 89% ซึ่งประกอบด้วย (z)-citral ที่มี retention time 21.14 และ 22.91 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ silva และคณะ [4] ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีสารประกอบหลักคือ (z)-citral หรือ 3,7-dimethyl-2,6-octadienal ซึ่งเป็น acyclic monoterpene aldehydes

ที่พบได้ 2 isomer คือ geranial (*trans*-citral) และ neral (*cis*-citral) นอกจากนี้ พบว่า citral สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida* spp. รวมทั้งแบคทีเรียและราชนิดต่างๆ ได้ [4,13] จากการศึกษาของ Hawser และคณะ [9] พบว่า amphotericin B, mulundocandin และ aculeacin ออกฤทธิ์โดยการทำลาย plasma membrane หรือ cell wall ของรา [14,15] สามารถยับยั้งการสร้างท่องอกของ *C. albicans* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ในขณะที่ azoles, terbinafine และ flucytosine ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 demethylase และ squalene epoxidase และยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และ DNA ตามลำดับ สามารถยับยั้งการสร้างท่องอกของเชื้อได้ก็ต่อเมื่อมีความเข้มข้นสูงกว่า MIC [9] จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยจากตระไคร้ที่ sub-inhibitory concentration ก็สามารถยับยั้งการสร้างท่องอกและลด phospholipase activity ของ *C. albicans* ได้ และเมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากับ MIC น้ำมันหอมระเหยจากตระไคร้สามารถฆ่า *C. albicans* ได้อย่างรวดเร็ว สารออกฤทธิ์ที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้น่าจะเป็น (z)-citral ที่มีผลต่อการสร้างท่องอก และ เอนไซม์ phospholipase และสามารถทำลาย *C. albicans* [4,13] อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์และสารที่ออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (MRG 5280131) และคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Boken, D.J., Swindells, S. and Rinaldi, M.G., 1993, Fluconazole-resistant *Candida albicans*, Clin. Infect. Dis. 7: 1018-1021.

[2] Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L. and Vlietinck, A.J., 2002, Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, J. Ethnopharmacol. 79: 213-220.

[3] Wannissorn, B., Jarikasem, S. and Soontornta-nasart, T., 1996, Antifungal activity of lemongrass oil and lemongrass oil cream, Phytother Res. 10: 551-554.

[4] Silva Cde, B., Guterres, S.S., Weisheimer, V. and Schapoval, E.E., 2008, Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp., Braz. J. Infect. Dis. 12: 63-66.

[5] Taweechaisupapong, W., Ngaonee, P., Patsuk, P., Pitiphat, W. and Khunkitti, W., 2012, Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate, S. Afr. J. Bot. 78: 37-43.

[6] Taweechaisuppong, S., Choopan, T., Singhara, S., Chatrchaiwiwatana, S. and Wongkham, S., 2005, *In vitro* inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida*

albicans to human buccal epithelial, J. Ethnopharmacol. 96: 221-226.

[7] Kantarcioglu, A.S. and Yucel, A., 2002, Phospholipase and protease activities in clinical candida isolates with reference to the sources of strains, Mycoses 45: 160-165.

[8] Baboni, F.B., Barp, D., Izidoro, A.C., Samaranayake, L.P. and Rosa, E.A., 2009, Enhancement of *Candida albicans* virulence after exposition to cigarette mainstream smoke, Mycopathologia 168: 227-235.

[9] Hawser, S. and Islam, K., 1999, Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*, J. Antimicrob. Chemother. 43: 411-413.

[10] Parks, L.W. and Casey, W.M., 1996, Fungal sterols, pp. 63-82, In Prasad, R., Ghannoum, M.A., Lipids of Pathogenic Fungi, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

[11] Kimura, L.H. and Pearsall, N.N., 1980, Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells, Infect. Immun. 28: 464-468.

[12] Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. and Ghannoum, M.A., 1998, Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*, J. Biol. Chem. 273: 26078-26086.

[13] อัจฉรา เหมทานนท์, สุมาลี เหลืองสกุล และธารารัตน์ ศุภศิริ, 2532, ฤทธิ์ของสารสกัดจากตะไคร้ในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังบางชนิด, ว.วิทยาศาสตร์ มศว 5(2): 115-123.

[14] Kerridge, D., 1986, Mode of action of clinically important antifungal drugs, Adv. Microb. Physiol. 27: 1-72.

[15] Kurtz, M.B., Heath, I.B., Marrinan, J., Dreikhorn, S., Onishi, J. and Douglas, C., 1994, Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-β-D-glucan synthase, Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1480-1489.