Original article

Antimicrobial Activity of Crofton Weed (*Eupatorium Adenophorum* Spreng) Oil against Caries-Related Bacteria and Oral *Candida* Species

Panida Thanyasrisung[1], Piyachat Chuysinuan[2], Krittika Koolkaew[3], Jindanuch Brahmsakha Na Sakolnakorn[3] and Pitt Supaphol[4]

[1]Department of Microbiology and DRU on Oral Microbiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, Thailand

[2]Laboratory of Organic Synthesis, Chulabhorn Research Institute (CRI), Lak Si, Bangkok, Thailand

[3]Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, Thailand

[4]The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, Thailand

Correspondence to:

Panida Thanyasrisung. Department of Microbiology and DRU on Oral Microbiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Pathumwan, Bangkok 10330 Thailand Tel: 02-2188680 Fax: 02-2188680 E-mail: tpanida@gmail.com

Abstract

This study aimed to demonstrate the antimicrobial activity of crofton weed oil against cariogenic bacteria and oral *Candida* species. The antimicrobial sensitivity testing was determined by a disk diffusion method against *Streptococcus mutans, Actinomyces viscosus, Lactobacillus casei* and oral *Candida* species: *Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei, Candida tropicalis, Candida parapsilosis* and *Candida dubliniensis*. Additionally, scanning electron microscopy (SEM) was used to investigate microbial ultra-structure alteration after the oil treatment. The oil exhibited similar antibacterial activity as 0.2 % chlorhexidine gluconate (0.2 % CHX) against all tested bacterial strains. The zones of inhibition produced by the oil against *S. mutans, A. viscosus and L. casei* were 11.1 ± 1.05 mm 18.7 ± 1.81 mm and 10.4 ± 1.55, respectively. However, 0.2 % CHX had greater antifungal activity against *C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis* and *C. dubliniensis* than the oil. Neither reagent demonstrated antifungal effect on *C. albicans.* Unexpectedly, the antifungal effect on *C. tropicalis* of the oil (19.0 ± 1.00 mm) was nearly two folds higher than that of 0.2 % CHX (11.0 ± 0.0 mm). SEM of microbial cells treated with the oil showed perforations on the cell surface or alteration of cells shape. Crofton weed oil exhibited antimicrobial activities against caries-related bacteria and most oral *Candida* species, especially *C. tropicalis,* by affecting microbial cell surface.

Key words: Antimicrobial activity; Essential oil; *Eupatorium adenophorum* Spreng; Cariogenic bacteria; Oral *Candida* species

Received Date: Feb 27, 2014, Accepted Date: Apr 21, 2014

บทวิทยาการ

ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาต่อเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ และเชื้อราแคนดิดาที่พบในช่องปาก

พนิดา ธัญญศรีสังข์[1] ปิยฉัฏร ช่วยสืนวล[2] กฤติกา กูลแก้ว[3] จินดานุช พรหมสาขา ณ สกลนคร[3] และพิชญ์ ศุภผล[4]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา และโครงการพัฒนาหน่วยวิจัยจุลชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

[2]ห้องปฏิบัติการอินทรีย์เคมีสังเคราะห์ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ

[3]คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

[4]วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:

พนิดา ธัญญศรีสังข์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และโครงการพัฒนาหน่วยวิจัยจุลชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์: 02-2188680 โทรสาร: 02-2188680 อีเมล: tpanida@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาต่อเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ และเชื้อราแคนดิดาที่พบในช่องปาก โดยทำการทดสอบความไวของสเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ แอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส แล็คโทบาซิลลัส คาเซอิ แคนดิดา แอลบิแคนส์ แคนดิดา กลาบราตา แคนดิดา ครูซีไอ แคนดิดา ทรอปิคาลิส แคนดิดา พาราไซโลสิส และแคนดิดา ดับลิเนียนสิสต่อน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชัน รวมถึงการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เพื่อสำรวจการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์เชื้อจุลชีพเหล่านี้หลังการอบด้วยน้ำมันหอมระเหย จากการทดสอบพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากสาบหมามีฤทธิ์ต้านเชื้อที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคฟันผุทั้งสามชนิดใกล้เคียงกับฤทธิ์ของคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยมีขนาดของโซนยับยั้งจากน้ำมันหอมระเหยต่อสเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ แอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส และแล็คโทบาซิลลัส คาเซอิเท่ากับ 11.1 ± 1.05 มิลลิเมตร 18.7 ± 1.81 มิลลิเมตร และ 10.4 ± 1.55 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่คลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ออกฤทธิ์ต้านต่อแคนดิดา กลาบราตา แคนดิดา ครูซีไอ แคนดิดา พาราไซโลสิส และแคนดิดา ดับลิเนียนสิสได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหย และไม่มีสารต้านจุลชีพตัวใดเลยที่สามารถออกฤทธิ์ต้านต่อแคนดิดา แอลบิแคนส์ได้ แต่น้ำมันหอมระเหยกลับมีฤทธิ์ต้านต่อแคนดิดา ทรอปิคาลิส (19.0 ± 1.00 มิลลิเมตร) ได้ดีกว่าคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (11.0 ± 0.00 มิลลิเมตร) เกือบ 2 เท่า ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดแสดงให้เห็นรูทะลุที่ผิวเซลล์ หรือการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ หลังการอบด้วยน้ำมันหอมระเหย การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุ และเชื้อราแคนดิดาในช่องปากเกือบทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะแคนดิดา ทรอปิคาลิส โดยไปมีผลต่อผิวเซลล์ของเชื้อจุลชีพ

คำสำคัญ: ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ; น้ำมันหอมระเหย; สาบหมา; เชื้อก่อโรคฟันผุ; เชื้อราแคนดิดา

บทนำ

การเพิ่มขึ้นของประชากรผู้สูงอายุซึ่งมักจะมีความบกพร่องของปัจจัยทางระบบ (systemic factor) ส่งผลให้โรคฟันผุ และโรคเชื้อราแคนดิดาในช่องปากพบได้บ่อยมากขึ้น รอยโรคเหล่านี้มักก่อให้เกิดอาการเจ็บปวด รับประทานอาหารได้ลำบาก ส่งผลกระทบต่อสุขภาพโดยรวม และคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุเป็นอย่างมาก และจากการสำรวจทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ประจำปี พ.ศ. 2555[1] พบว่า กลุ่มผู้สูงอายุมีพฤติกรรมทางทันตสุขภาพไม่ค่อยดี เช่น การแปรงฟันเพียงวันละครั้งในตอนเช้า และคุณภาพของการแปรงฟันที่มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ นอกจากนี้ การเข้าถึงบริการก็อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ ดังนั้น การส่งเสริมการป้องกันโรคในช่องปากให้กับผู้สูงอายุจึงเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยลดอัตราการเกิดโรค ลดค่าใช้จ่ายในการรักษา และยังส่งผลให้ผู้สูงอายุมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

โรคฟันผุเป็นโรคเรื้อรังที่ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศ รวมถึงในประเทศไทย จากผลการสำรวจทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ประจำปี พ.ศ. 2555 แสดงให้เห็นว่า ประเทศไทยยังคงมีอัตราการเกิดโรคฟันผุอยู่ในระดับสูงโดยพบรอยโรคได้มากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากร[1] ถึงแม้โรคนี้จะไม่ได้มีความรุนแรงถึงแก่ชีวิต แต่ก็เป็นสาเหตุหลักของอาการปวดในช่องปาก รวมถึงการสูญเสียฟันอันส่งผลกระทบต่อสุขภาพโดยรวม และคุณภาพชีวิตของบุคคลนั้น[1-4] เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า โรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัย (multi-factorial disease) ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ คือ แผ่นคราบจุลินทรีย์ หรือไบโอฟิลม์ (biofilm)[2] มีการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตค็อคไค *(*Mutans streptococci*)* แล็คโทบาซิลลัส *(Lactobacillus* species*)* และแอ็คติโนมัยเซส *(Actinomyces* species*)* ที่อยู่ในไบโอฟิลม์ กับกระบวนการเกิดโรคฟันผุในระยะต่าง ๆ โดยระยะเริ่มต้นของการเกิดโรคฟันผุ รวมถึงในรอยโรคจุดขาว (white spot lesion) พบเชื้อกลุ่มแอ็คติโนมัยเซส และกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ สเตร็ปโตค็อคไค *(*Non-mutans streptococci*)* โดดเด่นกว่าเชื้ออื่น ๆ ในระยะที่มีการดำเนินของรอยโรค (progressive stage) มักพบกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตค็อคไค เชื้อที่พบมักจะอยู่ในกลุ่มแล็คโทบาซิไล (Lactobacilli) พรีโวเทลลา *(Prevotella)* และไบฟิโดแบคทีเรียม *(Bifidobacterium)* สำหรับโรครากฟันผุ (root caries) van Houte และคณะรายงานการพบเชื้อกลุ่มแอ็คติโนมัยเซส และกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ สเตร็ปโตค็อคไค เป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อกลุ่มแอ็คติโนมัยเซสที่แยกได้จากรอยโรครากฟันผุนี้มักเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดได้ดีกว่าเชื้อกลุ่มเดียวกันที่พบบนรากฟันปกติ[5]

โรคติดเชื้อราแคนดิดาในช่องปากเกิดจากเชื้อราจีนัสแคนดิดาซึ่งมีหลายสายพันธุ์ สายพันธุ์ที่มักแยกได้บ่อยจากรอยโรคคือ แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) โดยปกติแล้วเชื้อราแคนดิดาเป็นเชื้อที่พบได้เสมอในช่องปากโดยไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เมื่อใดที่มีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ในผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ติดเชื้อเอชไอวี และในผู้ป่วยโรคร้ายแรงต่าง ๆ นอกจากปัจจัยทางระบบแล้ว ปัจจัยเฉพาะที่ (local factors) ก็มีส่วนในการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคได้ด้วย เช่น การมีน้ำลายน้อย (Xerostomia) การใส่ฟันปลอม การสูบบุหรี่ การใช้ยาบางชนิด เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้ส่งเสริมให้เกิดโรคติดเชื้อราแคนดิดาในช่องปากได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้แล้ว เชื้อราแคนดิดายังสามารถสร้างไบโอฟิล์มโดยไปยึดเกาะกับผิวฟัน หรือเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) และยังสามารถเกาะกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียจีนัสสเตร็ปโตค็อคคัสที่พบในช่องปากได้ด้วย ซึ่งการที่เชื้อรวมกลุ่มเป็นไบโอฟิล์มนี้ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น[6]

แม้ว่าการกำจัดเชื้อจุลชีพทางกล เช่น การแปรงฟันอย่างถูกวิธี การใช้ไหมขัดฟัน และการใช้อุปกรณ์เสริมอื่น ๆ ยังคงเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่า สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ดี แต่ประสิทธิภาพในการกำจัดก็ขึ้น กับทักษะการใช้มือของแต่ละบุคคล[7] ทำให้ประสิทธิภาพในการทำความสะอาดช่องปากลดลง ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้สารต้านจุลชีพในรูปแบบของส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมมาเสริมประสิทธิภาพ แต่ผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนี้ก็ยังมีข้อจำกัด ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อ กลิ่น และรสที่ไม่พึงประสงค์ รวมถึงผลข้างเคียงที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ ดังนั้น การศึกษาค้นคว้า และพัฒนาสารชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น และมีผลข้างเคียงน้อยลง

จึงยังมีความสำคัญอยู่มาก พืชสมุนไพรเป็นหนึ่งแนวทางที่ได้รับความสนใจ เนื่องด้วยคุณสมบัติในการรักษาโรค มีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน และเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย[8]

สาบหมา (*Eupatorium adenophorum* Spreng หรือ *Ageratina adenophora* Spreng) เป็นพืชรุกรานที่สามารถพบได้ทางภาคเหนือของประเทศไทย มักเติบโตในพื้นที่รกร้าง ที่ระดับความสูง 800 เมตร จากการสำรวจของพิทยา สรวมศิริ และคณะแสดงให้เห็นว่า ชาวเขาหลายเผ่าใช้ประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ของสาบหมามาเป็นยาพื้นบ้าน เช่น ใช้ส่วนรากมาต้มดื่มแก้ร้อนใน ใช้ส่วนใบมาเคี้ยวแล้วพอกเพื่อทำการห้ามเลือด[9] และจากการศึกษาของ Nabin Bhattarati และ Geeta Shrestha ในปี ค.ศ. 2009 พบว่า สาบหมามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราได้หลายชนิด[10] แต่ไม่มีข้อมูลถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคในช่องปาก ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาต่อเชื้อที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุ และเชื้อราแคนดิดาที่พบในช่องปาก

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้จากการสกัดใบสาบหมา (*Eupatorium adenophorum* Spreng) โดยการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation) และเติมสารโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (sodium sulfate anhydrous; Na_2SO_4) เพื่อดึงน้ำออกจากสารสกัด หลังจากนั้นทำการกรองสาร Na_2SO_4 ออกเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ (pure essential oil) ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำมันหอมระเหยที่ได้นี้ถูกเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบต่อไป

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 แอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส ATCC 15987 และแล็คโทบาซิลลัส คาเซอิ IFO 3533 ถูกนำมาเพาะลงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain Heart Infusion agar; BHI agar) โดยอบในตู้อบ (ยี่ห้อ Forma scientific) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 สำหรับเชื้อราแคนดิดาทุกสายพันธุ์ (*C. albicans* ATCC90028, *C. glabrata* TIMM1098, *C. krusei* ATCC6258, *C. tropicalis* ATCC750, *C. parapsilosis* ATCC20019 และ *C. dubliniensis* 16F) ถูกเพาะเลี้ยงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อซาโบโรด์ เด็กซ์โทรส (sabouraud dextrose agar) โดยอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการถ่ายโคโลนีเดี่ยว (single colony) มาเพาะต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว (Brain Heart Infusion broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการทดลองจะปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับค่าความขุ่นมาตรฐาน 0.5 แม็คฟาร์แลนด์ (McFarland) หรือมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1

การทดสอบด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน (Disk diffusion test)

นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (sterile cotton swap) จุ่มเชื้อที่ปรับค่าความขุ่นแล้ว กดไม้พันสำลีให้หมาด ๆ กับข้างหลอด แล้วนำมาป้ายบนวุ้นเลี้ยงเชื้อ มูลเลอร์-ฮินตัน (Müller-Hinton agar) โดยลากเส้นผ่านกึ่งกลางจานเพาะเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากให้ถี่ ๆ ทั่วผิวหน้า หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 60 องศา แล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง ก่อนจะใช้ไม้พันสำลีปาดขอบด้านในโดยรอบของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเตรียมแผ่นดิสก์ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีน ที่ปราศจากเชื้อ (sterile Phosphate Buffer Saline; PBS) หรือน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) หรือน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาความเข้มข้นร้อยละ 100 หรือคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (0.2 % chlorhexidine gluconate; 0.2 % CHX) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนดิสก์ ใช้ปากคีบ (forceps) ที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นดิสก์วาง และกดเบา ๆ บนวุ้นเลี้ยงเชื้อให้ส่วนที่แบนแนบสนิทกับผิวหน้าวุ้นเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเข้าตู้อบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แล้วจึงอ่านค่าความกว้างของโซนยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง ในหน่วยมิลลิเมตร ทำการทดลองนี้ซ้ำกัน 3 ครั้ง การทดสอบนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ในหนังสือแบคทีเรีย และโรคติดเชื้อที่พบบ่อยในช่องปาก[11]

การตรวจสอบลักษณะของเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

อบเชื้อที่ต้องการจะทดสอบกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีนที่ปราศจากเชื้อ หรือน้ำมันถั่วเหลือง หรือน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาความเข้มข้นร้อยละ 100 หรือคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีนที่ปราศจากเชื้อ เซลล์ถูกนำไปแช่ในกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (2.5 % glutaraldehyde) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีน อีกครั้ง ก่อนนำไปแผ่บนกระจกปิดสไลด์ (cover slip) หลังจากนั้นนำมาทำให้แห้งในเครื่องทำแห้งตัวอย่างแบบวิกฤต (critical point dryer) และเคลือบด้วยทองบริสุทธิ์ รูปร่างของเชื้อ จะถูกตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (JSM 5410 LV; JEOL, Tokyo, Japan)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ความไวของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ต่อสารทดสอบนำเสนอโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) โดยรายงานเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD)

ผล

น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาที่ความเข้มข้นร้อยละ 100 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ไม่เท่ากัน โดยเชื้อแอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส (*A. viscosus*) มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition zone) กว้างที่สุด คือ 18.7 ± 1.81 มิลลิเมตร รองลงมา ได้แก่ เชื้อสเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) คือ 11.1 ± 1.05 มิลลิเมตร และน้อยที่สุดในเชื้อแล็คโทบาซิลลัส คาเซอิ (*L. casei*) คือ 10.4 ± 1.55 มิลลิเมตร ซึ่งเมื่อนำผลมาเปรียบเทียบกับคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (0.2 % CHX) พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส (*A. viscosus*) เชื้อสเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) และเชื้อแล็คโทบาซิลลัส คาเซอิ (*L. casei*) ใกล้เคียงกับน้ำมันหอมระเหย โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งการเจริญเติบโตเป็น 18.9 ± 1.94 มิลลิเมตร 13.4 ± 1.12 มิลลิเมตร และ 12.1 ± 2.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบว่า น้ำมันถั่วเหลืองมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส (*A. viscosus*) โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งการเจริญเติบโตเป็น 12.67 ± 0.71 มิลลิเมตร ซึ่งน้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา และคลอร์เฮ็กซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 แต่ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งกับเชื้อสเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ (*S. mutans*) และเชื้อแล็คโทบาซิลลัส คาเซอิ (*L. casei*) (ตารางที่ 1)

การตรวจสอบลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด หลังอบเชื้อกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีนที่ปราศจากเชื้อ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา และคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 พบเซลล์ของเชื้อสเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ถูกทำลายในลักษณะเป็นรูทะลุเข้าไปในเซลล์ ในขณะที่เชื้อแอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส และเชื้อแล็คโทบาซิลลัส คาเซอิ พบลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนรูปไป และเซลล์บางส่วนมีลักษณะเป็นรอยหว่าหรือเป็นรูเมื่ออบพร้อมกับน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา หรือคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในการอบกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีน หรือน้ำมันถั่วเหลือง (รูปที่ 1)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาต่อเชื้อราแคนดิดาในช่องปาก พบว่า น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้ง การเจริญของแคนดิดา ทรอปิคาลิสได้ดีกว่าคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนต ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เกือบสองเท่าโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 19.0 ± 1.00 มิลลิเมตร และ 11.0 ± 0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่การออกฤทธิ์ต้านต่อเชื้อราแคนดิดา กลาบราตา

แคนดิดา ครูซิไอ แคนดิดา พาราไซโลสิส และแคนดิดา ดับลิเนียนสิสนั้น คลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ให้ผลที่ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition zone) แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา แต่สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแคนดิดา แอลบิแคนส์ ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และพบว่า น้ำมันถั่วเหลืองมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแคนดิดา ครูซิไอ และแคนดิดา ทรอปิคาลิส เล็กน้อยโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง เท่ากับ 7.56 ± 0.53 มิลลิเมตร และ 7.78 ± 0.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 *การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุต่อน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา โดยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน*
Table 1 *Sensitivity testing of caries-related bacteria to crofton weed oil using a disk diffusion method*

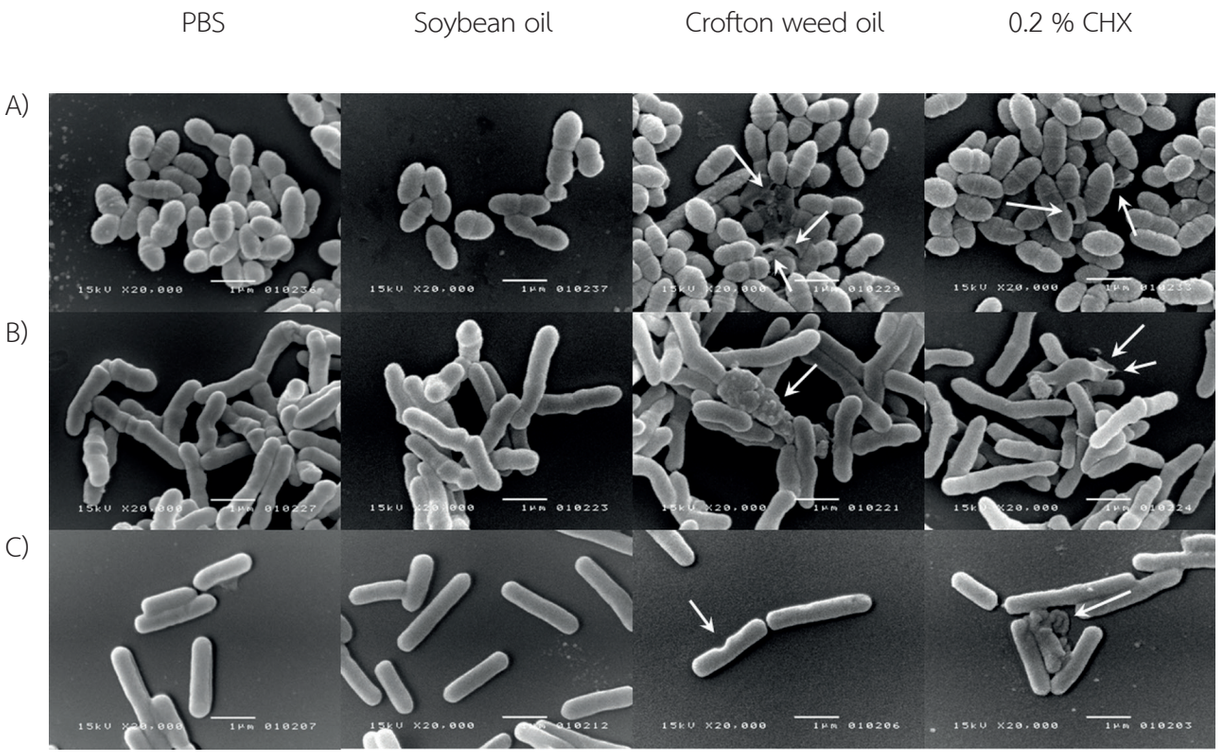
Bacterial strain	Inhibition zone diameter[a] (mean (mm) ± SD)			
	PBS[b]	Soybean oil	Crofton weed oil	0.2 % CHX[c]
S. mutans ATCC25175	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	11.1 ± 1.05	13.4 ± 1.12
A. viscosus ATCC15987	6.00 ± 0.00	12.67 ± 0.71	18.7 ± 1.81	18.9 ± 1.94
L. casei IFO3533	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	10.4 ± 1.55	12.1 ± 2.15

[a]The diameter of disks was included (6 mm).
[b]PBS = sterile Phosphate Buffer Saline
[c]0.2 % CHX = 0.2 % chlorhexidine gluconate

ตารางที่ 2 *การทดสอบความไวของเชื้อราแคนดิดาที่พบในช่องปากต่อน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาโดยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน*
Table 2 *Sensitivity testing of oral Candida species to crofton weed oil using a disk diffusion method*

Candida species	Inhibition zone diameter[a] (mean (mm) ± SD)			
	PBS[b]	Soybean oil	Crofton weed oil	0.2 % CHX[c]
***C. albicans* ATCC90028**	**6.00 ± 0.00**	**6.00 ± 0.00**	**6.3 ± 0.58**	**7.00 ± 1.00**
C. glabrata TIMM1098	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	9.7 ± 1.53	17.7 ± 1.97
C. krusei ATCC6258	6.00 ± 0.00	7.56 ± 0.53	9.7 ± 0.58	11.8 ± 0.41
***C. tropicalis* ATCC750**	**6.00 ± 0.00**	**7.78 ± 0.67**	**19.0 ± 1.00**	**11.0 ± 0.00**
C. parapsilosis ATCC20019	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.7 ± 1.16	15.3 ± 2.01
C. dubliniensis 16F	ND	ND	9.7 ± 0.58	17.8 ± 2.32

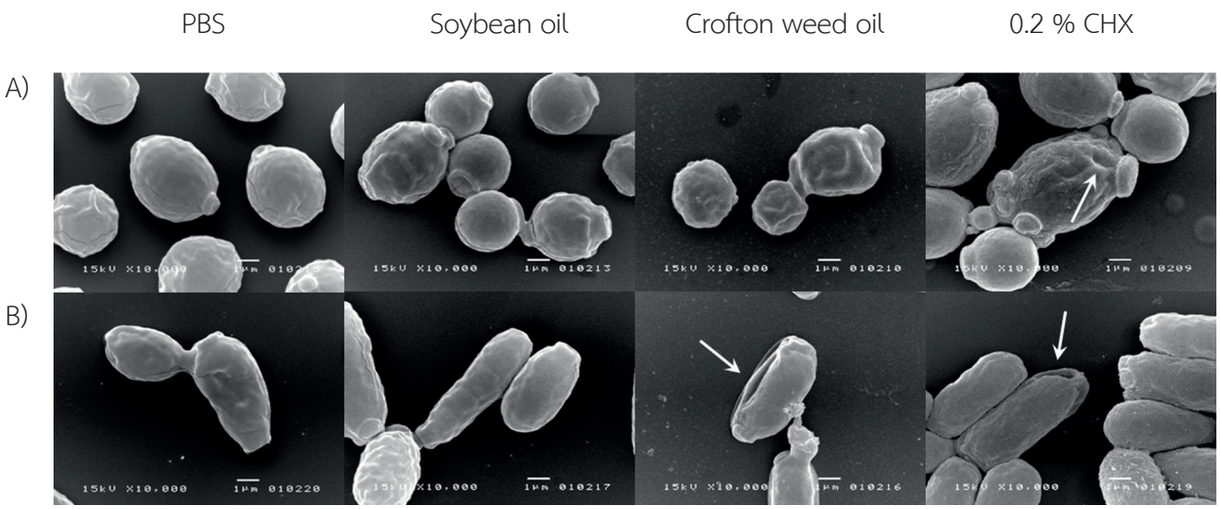
[a]The diameter of disks was included (6 mm).
[b]PBS = sterile Phosphate Buffer Saline
[c]0.2 % CHX = 0.2 % chlorhexidine gluconate
Bold = The strains were represented by SEM.
ND = Not determined



รูปที่ 1 *ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดแสดงลักษณะผิวเซลล์ของ A) สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ B) แอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส และ C) แล็คโทบาซิลลัส คาเซอิ หลังอบกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา และคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ลูกศรสีขาวชี้ให้เห็นรูทะลุ หรือรอยหว่ำบนผิวเซลล์ หรือการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์หลังอบกับน้ำมัน หอมระเหยจากใบสาบหมา หรือคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2*

Figure 1 *SEM images showed cell surface of A) S. mutans B) A. viscosus and C) L. casei after incubation with Phosphate Buffer Saline, soybean oil, crofton weed oil and 0.2 % chlorhexidine gluconate White arrows denoted the regions of perforation or concavity on cell surface or alteration of cell shape after incubation with crofton weed oil or 0.2 % chlorhexidine gluconate.*

จากผลในตารางที่ 2 เชื้อราแคนดิดา แอลบิแคนส์ และแคนดิดา ทรอปิคาลิส ถูกเลือกขึ้น มาเป็นตัวแทนของกลุ่มที่มีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาในระดับต่ำ และสูง ตามลำดับ เพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยต่อเซลล์ของเชื้อราทั้งสองชนิดนี้ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดในรูปที่ 2 แสดงให้เห็นถึงลักษณะเซลล์ที่ทะลุเป็นรูของเชื้อราแคนดิดา ทรอปิคาลิส หลังอบกับน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา หรือคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในขณะที่เซลล์ของแคนดิดา แอลบิแคนส์ มีลักษณะผิวเซลล์เป็นรอยหว่ำซึ่งเห็นได้ชัดเจนในเซลล์ที่อบกับคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2



รูปที่ 2 *ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดแสดงลักษณะผิวเซลล์ของ A) แคนดิดา แอลบิแคนส์ และ B) แคนดิดา ทรอปิคาลิส หลังอบกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา และคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ลูกศรสีขาวชี้ให้เห็นรูทะลุ หรือรอยหว่ำบนผิวเซลล์หลังอบกับน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา หรือคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2*

Figure 2 *SEM images showed cell surface of A) C. albicans and B) C. tropicalis after incubation with Phosphate Buffer Saline, soybean oil, crofton weed oil and 0.2 % chlorhexidine gluconate. White arrows denoted the regions of perforation or concavity on cell surface after incubation with crofton weed oil or 0.2 % chlorhexidine gluconate.*

บทวิจารณ์

น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมามีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ และเชื้อราแคนดิดาที่พบในช่องปากในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งกลไกการทำงานของน้ำมันหอมระเหยนี้ต่อเชื้อจุลชีพทั้งสองกลุ่มนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงให้เห็นผลของน้ำมันหอมระเหยกับเซลล์ของเชื้อทั้งสองกลุ่มในลักษณะเดียวกัน และเหมือนกับการอบด้วยคลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า มีกลไกการออกฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา[12] และเมื่อพิจารณาการศึกษาในอดีตเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อจุลชีพ พบการทำลายของผนังเซลล์ (cell wall) และเยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อรา ซึ่งเป็นผลมาจากคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของน้ำมันหอมระเหย[13,14] นอกจากนี้ การศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดโดย Fei และคณะ แสดงให้เห็นลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลชีพที่แตก (cell lysis) หรือเปลี่ยนรูปร่างไป หลังอบกับน้ำมันหอมระเหยของพืชบางชนิด อันเป็นผลจากการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์[13] ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับการอบเชื้อด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา

ดังนั้น ความไวของเชื้อจุลชีพแต่ละชนิดต่อน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาที่แตกต่างกัน อาจมาจากโครงสร้างของผนังเซลล์ หรือเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างกัน

ในหลายปีมานี้ ความชุกของเชื้อราแคนดิดากลุ่มที่ไม่ใช่แอลบิแคนส์ (*Candida* non-*albicans* species) ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากมักพบเชื้อในกลุ่มนี้สัมพันธ์กับการดื้อยาปฏิชีวนะ แคนดิดา ทรอปิคาลิสเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่มักแยกได้จากผู้ป่วยอยู่เสมอ และมีรายงานการดื้อต่อยาในกลุ่มเอโซล (azole) เช่น ฟลูโคนาโซล (fluconazole) ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้แพร่หลาย[15,16] ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาซึ่งให้ผลการยับยั้ง แคนดิดา ทรอปิคาลิสได้ดีกว่า คลอร์เฮ็กซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแคนดิดา ทรอปิคาลิสที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา นอกจากจะทำการทดสอบด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชันแล้ว ผู้วิจัยได้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal inhibitory concentration; MIC) และการฆ่าเชื้อ (Minimal bactericidal concentration; MBC) ของน้ำมันหอมระเหยด้วยเช่นกัน แต่ผลที่ได้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กว้างมาก จึงไม่ได้นำมาแสดงในผลการทดลองนี้ การที่ผลการทดลองมีค่าแตกต่างกันมากมีข้อสันนิษฐานว่า อาจเกิดขึ้นจากปัญหาการละลายตัวของน้ำมันหอมระเหยที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลาย ทำให้การสัมผัสของเชื้อกับน้ำมันหอมระเหยเกิดขึ้น ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยได้ ในการศึกษานี้ ได้ทดสอบตัวทำละลายหลายชนิด แต่ก็พบลักษณะการแยกชั้นของน้ำมันหอมระเหย ยกเว้นในตัวทำละลายคาร์โบพอล (carbopol) ซึ่งเป็นสารโพลิเมอร์ (polymer) ของกรดอะคริลิก (acrylic acid) นิยมใช้เป็นสารยึดติดทางชีวภาพ (bioadhesive agent) ตัวทำอิมัลชัน (emulsifying agent) สารควบคุมการปลดปล่อย (release modifying agent) สารแขวนตะกอน (suspending agent) สารช่วยยึดเกาะสำหรับยาเม็ด (tablet binder) และสารเพิ่มความหนืด (viscosity-increasing agent)[17] เมื่อนำมาผสมกับน้ำมันหอมระเหย พบว่า มีลักษณะเป็นอิมัลชัน (emulsion) แต่ในการทดสอบ หาค่า MIC และ MBC นั้น จะต้องทำการอบสารทดสอบกับเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหอมระเหยได้อีก ทำให้ไม่เกิดการสัมผัสโดยตรงระหว่างน้ำมันหอมระเหยกับเชื้อ อย่างไรก็ตาม ข้อสันนิษฐานดังกล่าวยังคงต้องทำการพิสูจน์เพิ่มเติมต่อไป

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยนอกจากเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับเชื้อแล้ว สารที่ระเหยออกมาก็อาจส่งผลต่อการกำจัดเชื้อได้ด้วย[18] จากการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา โดยการวางแผ่นดิสก์ที่หยดน้ำมันหอมระเหยไว้ที่ฝาของจานเพาะเชื้อที่เพาะเลี้ยงเชื้อไว้ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้เต็มพื้นที่บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมา สารที่ระเหยออกมาไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบนี้

จากการศึกษาของ Nabin Bhattarati และ Geeta Shrestha ได้แสดงว่า ใบสาบหมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำ (water solvent extract) หรือตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ (organic solvent extract) มีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อจุลชีพทางการแพทย์หลายชนิดแตกต่างกันขึ้นกับวิธีการสกัด[10] นอกจากฤทธิ์ต้านต่อเชื้อจุลชีพแล้ว สารสกัดเอทานอลจากใบสาบหมายังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ได้เช่นกัน[19] แต่ก็ยังไม่มีการศึกษาถึงองค์ประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ทั้งในการต้านต่อเชื้อจุลชีพ หรือต้านการอักเสบ รวมถึงกลไกในการออกฤทธิ์ด้วย จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม หากจะพัฒนาสารสกัดจากใบสาบหมาให้สามารถนำมาใช้ได้จริงในการรักษา

บทสรุป

จากการศึกษานี้พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคฟันผุ ได้แก่ สเตร็ปโตค็อคคัส มิวแทนส์ แอ็คติโนมัยเซส วิสโคซัส แล็คโทบาซิลลัส คาเซอิ และเชื้อราแคนดิดาในช่องปากเกือบทั้งหมด โดยให้ผลดีกับเชื้อราแคนดิดา ทรอปิคาลิส

นอกจากนี้ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดแสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยไปมีผลทำลายผิวเซลล์ของเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการขับเคลื่อนการวิจัย (STAR) ในแผนพัฒนาวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (จุฬาฯ 100 ปี) และทุนวิจัยจากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ด็อกเตอร์ สุพรรณา เตชะสกุล หัวหน้าห้องปฏิบัติการอินทรีย์เคมีสังเคราะห์ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และคุณนิติรัตน์ ฉิมน้อย นักวิจัยห้องปฏิบัติการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ในความอนุเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากใบสาบหมาที่ใช้ตลอดการศึกษา และศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ด็อกเตอร์ ประสิทธิ์ ภวสันต์ ในความอนุเคราะห์เครื่องมือต่าง ๆ และให้การสนับสนุนในการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. The 7th national oral health survey in Thailand (A.D. 2012). Bangkok: Dental Health Division, Department of Health, Ministry of Public Health, 2013.
2. Selwitz R H, Ismail A I, Pitts N B. Dental caries. ***Lancet*** 2007;369:51-9.
3. Oral health in America: a report of the surgeon general. ***J Calif Dent Assoc*** 2000;28:685-95.
4. Fejerskov O, Kidd E, editors. Dental Caries: The disease and its clinical management. 1st ed. Oxford: Blackwell Munksgaard Ltd; 2003.
5. van Houte J, Lopman J, Kent R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. ***J Dent Res*** 1996;75:1008-14.
6. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. ***Odontology*** 2010;98:15-25.
7. Iacono VJ, Aldredge WA, Lucks H, *et al.* Modern supragingival plaque control. ***Int Dent J*** 1998;48:290-7.
8. Sanghabhuttra S. Medicinal properties of 200 herbs. 1st ed. Bangkok: Kun 39; 1992.
9. Sruamsiri P, Trisonthi C, Trisonthi P, *et al.* Herbs of The Thai Royal Project Foundation. Bangkok: Sirivatana Interprint Public Co., Ltd.; 2003. p. 69.
10. Bhattarai N., Shrestha G. Antibacterial and antifungal effect of Eupatorium adenophorum Spreng against bacterial and fungal isolates. ***Nepal Journal of Science and Technology*** 2009;10:91-5.
11. Teanpaisan R. Bacteria and common infectious diseases in the oral cavity. 1st ed. Songkhla: IQ media; 2009.
12. Jeske AH. Mosby's dental drug reference. 10th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby; 2012.
13. Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. ***In vitro*** antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. ***Food Res Int*** 2011;44:3057-64.
14. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. ***Curr Med Chem*** 2003;10:813-29.
15. Forastiero A, Mesa-Arango AC, Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Bernal-Martinez L, Pelaez T, *et al. Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2013;57:4769-81.

16. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis:* its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. ***J Med Microbiol*** 2010;59:873-80.
17. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. London: Greyslake, IL and Washington, DC: Pharmaceutical Press; American Pharmacists Association; 2006.
18. Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. ***J Agric Food Chem*** 2005;53:6939-46.
19. Chakravarty AK, Mazumder T, Chatterjee SN, "Anti-inflammatory potential of ethanolic leaf extract of Eupatorium adenophorum Spreng through alteration in production of TNF-α, ROS and expression of certain genes. ***Evid Based Complement Alternat Med*** 2011;2011:471074. doi: 10.1093/ecam/neq033.