สัญญาเลขที่ R2559B067

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจาก *Cumminum cyminum* Linn. และ *Heracleum siamicum* Craib ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจากอาหาร

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. รศ.ดร.ดลฤดี สงวนเสริมศรี ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. ผศ.ดร.นลิน วงศ์ชัตติยะ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

3. ผศ. น.สพ. ดร.พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน
เลขทะเบียน 104907
เลขเรียกหนังสือ ว QD
455
ด44ร
2560

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2560

Executive summary

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากเมล็ดยี่หร่าในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากอาหาร พบว่าน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากอาหารได้หลายชนิด การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยยี่หร่า มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus, S. aureus, E. coli* และ *S.* Typhi น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดีที่สุด องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยซึ่งวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS และ TLC-bioautograph แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยยี่หร่ามีองค์ประกอบของ cuminaldyhyde เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งทำหน้าที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด 4 ชนิด น้ำมันหอมระเหยยี่หร่ามีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นสารต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และสามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการถนอมอาหาร เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร การศึกษาต่อไป น่าจะมุ่งเน้นถึงกลไกการต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย และการเสริมฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียระหว่างองค์ประกอบต่างๆ ที่พบในน้ำมันหอมระเหย

มหาวิทยาลัยนเรศวร

Abstract

Background: *Cuminum cyminum* L., commonly known as cumin, has been traditionally used in Thai traditional medicine and traditional food flavoring. The present study investigated the chemical composition, antimicrobial activity against all tested major food-borne pathogenic bacteria, and bioactive components of essential oil extracted from *Cuminum cyminum* L. collected in Thailand.

Methods: The main components of the essential oil were investigated by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique. Antibacterial activities against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Typhi were investigated by disc diffusion and microdilution method. The presence of the biologically active antibacterial components was also confirmed by the Thin-layer chromatography (TLC)-bioautography.

Results: The main components of the essential oil investigated by GC-MS were cuminaldehyde (27.10%), beta-pinene (25.04%) and gamma-terpinene (15.68%). The essential oil exhibited antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhi. The essential oil showed the strongest antimicrobial activity against *B. cereus* with a comparable inhibition zone to tetracycline. Thin-layer chromatography (TLC) confirmed the presence of biologically active antibacterial component in the essential oil against all tested food-borne bacteria. It is further demonstrated that cuminaldehyde was the most active compound in TLC-bioautography which inhibited all of tested bacteria.

Conclusions: Essential oil extracted from *Cuminum cyminum* L. exhibited antibacterial activity against all tested major food-borne pathogenic bacteria. Cuminaldehyde is a major bioactive component. Our results suggest that the essential oil extracted from *Cuminum cyminum* L. could be applied as an alternative natural preservative to control food-borne disease and have the potential for further development of new antibacterial agents.

บทคัดย่อ

ยี่หร่า (*Cuminum cyminum* L.) เป็นพืชที่นิยมใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในประเทศไทยมาช้านาน ในการวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของยี่หร่าจากประเทศไทย องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากยี่หร่านำมาวิเคราะห์โดยวิธี chromatography-mass spectrometry (GC-MS) แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการต้านฤทธิ์ได้แก่ *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhi โดยวิธีที่ใช้ทดสอบได้แก่ disc diffusion และ microdilution method และองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทดสอบยืนยันโดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)-bioautography ผลการศึกษาพบว่า องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยของยี่หร่าได้แก่ cuminaldehyde (27.10%), beta-pinene (25.04%) และ gamma-terpinene (15.68%). น้ำมันหอมระเหยยี่หร่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhi ได้ โดยมียับยั้งฤทธิ์เชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุด และการทดสอบโดยใช้ TLC แสดงให้เห็นว่ามีน้ำมันหอมระเหยยี่หร่ามีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทุกชนิด และพบว่า cuminaldehyde เป็นสารออกฤทธิ์ที่แรงที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ สรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากยี่หร่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ทุกชนิด และมี cuminaldehyde เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยจากยี่หร่าจึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาต่อยอดให้เป็น สารกันเสียทางเลือกที่มาจากธรรมชาติ และอาจพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ได้ต่อไป

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

ภูมิปัญญาท้องถิ่นในแต่ละแหล่ง มีกำเนิดจากการสั่งสมความรู้และความเข้าใจฝังอยู่ในวิถีชีวิตมาเป็นเวลาช้านานและถ่ายทอดสืบต่อกันเรื่อยมา ตัวอย่างเช่นภูมิปัญญาท้องถิ่นทางภาคเหนือของไทยที่มักผนวกความรู้ในเรื่องทางด้านอาหารและการแพทย์เข้าด้วยกันอย่างเด่นชัด ความรู้เหล่านี้ยังคงต้องการคำอธิบายโดยอาศัยวิธีทางวิทยาศาสตร์สมัยปัจจุบัน

ในอดีตเมื่อการแพทย์ยังไม่เจริญนัก จึงมีอุบัติการณ์การเกิดโรคที่เกิดจากการติดเชื้อต่าง ๆ มากมาย แต่ได้มีการใช้สมุนไพรจากธรรมชาติในการบำบัดโรคต่างๆเท่าที่จะหาได้ในท้องถิ่นนั้น ๆ โรคที่เกี่ยวกับอาหารมักพบเป็นประจำ และผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความปลอดภัยมากขึ้น การรับประทานอาหารที่สะอาดปลอดภัยและยังต้องปราศจากเชื้อก่อโรคปนเปื้อนอีกด้วย การรู้จักเครื่องเทศหรือสมุนไพรจากตำราอาหารต่างๆมีมาช้านาน นอกจากจะใช้เพื่อปรุงกลิ่นและรสแล้ว ยังมีคุณสรรพคุณอื่น ๆ มากมายที่ควรจะศึกษา

แบคทีเรียก่อโรคจากอาหาร หมายถึง กลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนซึ่งติดต่อมาสู่คนผ่านทางอาหารเป็นหลัก ทำให้เกิดโรคติดเชื้อจากอาหารและโรคอาหารเป็นพิษ สามารถพบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อม เนื้อสัตว์ที่ใช้บริโภค และจากการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตอาหาร เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคที่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคในอาหารและการเน่าเสียของอาหารได้แก่ การปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหาร (bacterial contamination) และ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอาหาร แบคทีเรียก่อโรคในอาหารพบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella sp. Shigella sp., Escheriachia coli, Pseudomonas sp., Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter jejuni* และ *Clostridium botulinum* หากพบหรือมีการปนเปื้อนของเชื้อเหล่านี้ในอาหาร อาจทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย มีไข้ อาเจียน และปวดศีรษะ นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตสารพิษได้ เช่น *S. aureus* และ *Clostridium botulinum* ก็จะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพ กระทบต่อการเรียนและการทำงาน และต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษา บางรายอาจถึงแก่ชีวิตได้ โดยเฉพาะในเด็กเล็ก ผู้สูงอายุ ผู้ที่มีโรคประจำตัว เจ็บป่วย และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันที่อ่อนแออยู่ก่อนแล้ว

การป้องกันการเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียของแบคทีเรียและการเกิดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอาหารนิยมใช้วัตถุกันเสียที่เป็นสารสังเคราะห์ โดยวัตถุกันเสียที่เป็นสารสังเคราะห์ถูกจัดเป็นสองประเภทได้แก่ยาต้านจุลชีพซึ่งมีบทบาทยับยั้งการเจริญของเชื้อ และสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งทำหน้าที่ชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในอาหาร แต่วัตถุกันเสียที่เป็นสารสังเคราะห์เหล่านี้มีอันตรายต่อสุขภาพและยังทำให้เกิดผลข้างเคียงหลายประการเช่น ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน อ่อนแรง ชัก และมะเร็ง และนอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิด

เชื้อยาหลายขนานได้อีกด้วย อีกทั้งปัจจุบันผู้บริโภคส่วนใหญ่ได้ให้ความสำคัญในการบริโภคอาหารที่มีคุณภาพและปลอดภัย ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการนำพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในการปรุงอาหารอย่างเช่น ยี่หร่าและมะแหลบ ซึ่งได้รับการพิสูจน์มายาวนานจากรุ่นสู่รุ่นว่าไม่มีผลข้างเคียง และราคาถูก มาพัฒนาใช้ในการถนอมอาหาร เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพ ลดโอกาสการเกิดเชื้อดื้อยา และยังเป็นการพึ่งพาตัวเองของประเทศอีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศที่ใช้ในการปรุงอาหารไทยอย่างเช่น ยี่หร่า และ มะแหลบ ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารและผลการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ของพืชสองชนิดนี้ด้วย เพื่อสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ต่อยอดในการถนอมอาหารหรือใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป

แบคทีเรียก่อโรคจากอาหาร หมายถึง กลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนซึ่งติดต่อมาสู่คนผ่านทางอาหารเป็นหลัก ทำให้เกิดโรคติดเชื้อจากอาหารและโรคอาหารเป็นพิษ สามารถพบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อม เนื้อสัตว์ที่ใช้บริโภค และจากการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตอาหาร แบคทีเรียที่ก่อโรคจากอาหารมีหลายชนิด พบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella sp. Shigella sp., Escheriachia coli, Pseudomonas sp., Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter jejuni, และ Clostridium botulinum ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคที่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคในอาหารและการเน่าเสียของอาหารได้แก่ การปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหาร (bacterial contamination) และ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอาหาร หากพบหรือมีการปนเปื้อนของเชื้อเหล่านี้ในอาหาร อาจทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย มีไข้ อาเจียน และปวดศีรษะ นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตสารพิษได้ เช่น S. aureus และ Clostridium botulinum ก็จะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ การป้องกันการเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียของแบคทีเรียและการเกิดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอาหารนิยมใช้วัตถุกันเสียที่เป็นสารสังเคราะห์ โดยวัตถุกันเสียที่เป็นสารสังเคราะห์ถูกจัดเป็นสองประเภทได้แก่ ยาต้านจุลชีพซึ่งมีบทบาทยับยั้งการเจริญของเชื้อ และสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งทำหน้าที่ชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในอาหาร

พืชสมุนไพรและเครื่องเทศเป็นวัฒนธรรมการบริโภคที่ถูกนำมาใช้กันอย่างยาวนานและมีเอกลักษณ์ของแต่ละเชื้อชาติ ไม่เพียงแต่ประโยชน์ในด้านรสสัมผัสและกลิ่นเท่านั้น แต่หากยังประโยชน์ทางด้านการถนอมอาหารอีกด้วย นอกจากนี้พืชสมุนไพรและเครื่องเทศถือว่าเป็น 'สารที่ระบุว่าปลอดภัยสำหรับการใช้ในอาหาร' หรือ generally recognised as safe: GRAS ตามข้อกำหนดของสำนักงานอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา หรือ US Food and Drug Administration (USFDA) ที่ออกประกาศคำแนะนำในการพิจารณาเกี่ยวกับสาร ที่จะเติมลงในอาหารและเครื่องดื่มให้ใช้สารต่างๆ ในอาหารต้องคำนึงถึงหลักเกณฑ์ตามกฎหมาย Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (The FD&C Act) (FDA, 2013) นอกจากนี้ในปัจจุบันพืชสมุนไพรและเครื่องเทศมีบทบาทสำคัญเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีศักยภาพในการเป็นวัตถุกันเสียตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการใช้พืชสมุนไพรและเครื่องเทศในการเป็นวัตถุกันเสียคืออาจต้องใช้ในปริมาณที่มากเพื่อให้เกิดผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการใช้พืชสมุนไพรและเครื่องเทศในปริมาณที่มากอาจส่งผลทำให้ผลการรับคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส เช่น รสชาด สี กลิ่น เนื้อสัมผัส มีการเปลี่ยนแปลงไป (Burt,

2004) ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการใช้พืชสมุนไพรและเครื่องเทศในการถนอมอาหารเนื่องจากจะได้นำไปพัฒนาต่อไปให้มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยยิ่งขึ้น มีการศึกษาอย่างกว้างขวางจากนักวิจัยทั่วโลกเกี่ยวกับเกี่ยวกับผลของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารและผลการต้านอนุมูลอิสระ(Hara-Kudo et al., 2004; Smith-Palmer et al., 1998; Szaboa et al., 2010) รวมทั้งพืชสมุนไพรและเครื่องเทศของไทยด้วยได้แก่ Garcinia cowa (ชะมวง) (Sakunpaka and Panichayupakaranant, 2011) Garcinia mangostana (มังคุด) (Chomnawang et al., 2009) Zingiber cassumuna (ไพล), Cinnamomum bejolghota (อบเชยไทย), Mentha arvensis var. piperacens (peppermint), Cymbopogon citrates (ตะไคร้) และ Ocimum basilicum var. citratum (basil) (Wannissorn et al., 2005) เป็นต้น

Cumminum cyminum Linn. (cumin หรือ เทียนขาว หรือ ยี่หร่า) จัดอยู่ในวงศ์ Apiaceae (Umbelliferae) มีถิ่นกำเนิดในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอินเดีย และประเทศจีน ยี่หร่าชนิดนี้จะเป็นผลแห้งที่นำมาใช้เป็นเครื่องเทศและยาหอม ในเครื่องแกงกะหรี่ พะแนง มัสมั่น แต่ถ้ากล่าวถึงยี่หร่า ตามพจนานุกรมสัตว์และพืชในเมืองเมืองไทย (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม) ระบุไว้ว่า ยี่หร่าจะมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิดชนิดแรกคือ ยี่หร่า (Cumminum cyminum Linn.) ชนิดที่สองคือยี่หร่าชนิดที่มีชื่อไทยหลายชื่อ เช่น จันทร์หอม เนียมต้น เนียม กะเพราญวน โหระพาช้าง เป็นต้น ชื่อภาษาอังกฤษ ก็คือ Shrubby Basil มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Ocimum gratissimum Linn. และจัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae ซึ่งเป็นยี่หร่าแบบกินใบที่ นิยมใช้ผัดกับเนื้อสัตว์เพื่อดับกลิ่นคาว ในที่นี้จะกล่าวถึง Cumminum cyminum Linn. มีงานวิจัยเกี่ยวกับผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ของยี่หร่าพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens และ Streptococcus pyogenes (Tavakoli et al., 2015) และมีฤทธิ์ต่อ Salmonella typhimurium และ Staphylococcus aureus (Awan et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า Ocimum gratissimum Linn. สามารถยับยั้งเชื้อ The extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) -producing Escherichia coli หรือ E. coli ดื้อยาหลายขนานที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะอีกด้วย (Saeidi et al., 2015) อย่างไรก็ตามการศึกษายังไม่มีการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ที่ทำให้มีมีผลการยับยั้งแบคทีเรียอย่างชัดเจน

Heracleum siamicum Craib ทางภาคเหนือเรียก มะแหลบ กาญจนบุรีเรียก เทียนต๊กแตน หรือเทียนตาตั๊กแตน จัดอยู่ในวงศ์ Apiaceae หรือในวงศ์เดียวกับแครอต จัดเป็นพืชล้มลุก ลักษณะที่โดดเด่นของพืชตระกูลนี้อยู่ที่รากนั้นเป็นหัวยาวใต้ดินขนานกับพื้นผิว ลำต้นเป็นสันเหลี่ยม ตั้งตรงสูง 40-100 เซนติเมตร ใบประกอบมี 3 ใบย่อย ปลายแหลมก้านใบยาว ดอกเป็นช่อแบบซี่ร่ม ขนาดของดอกเล็กสีขาวถึงสีเหลืองจางอมเขียว ผลเป็นรูปรีคล้ายรูปไข่ ส่วนของเมล็ดใช้เป็นเครื่องเทศแต่งกลิ่นอาหาร มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว คนเหนือนำมาส่วนผสมของน้ำพริกลาบ ปัจจุบันเท่าที่มีรายงานวิจัยในฐานข้อมูลสากลเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของมะแหลบ พบเพียงงานวิจัยของ Kuljanabhagavad และคณะเท่านั้น(Kuljanabhagavad et al., 2011) พบว่าน้ำมันหอมระเหยของผลมะแหลบมีฤทธิ์ยับยั้ง Bacillus subtilis, Ecsherichia coli, Streptococcus faecalis, Streptococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa และเชื้อราอีกสองชนิดคือ Microsporum gypseum และ Candida albicans และวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยโดย CG และ GC-MS และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยพบว่ามี n-octyl acetate, o-cymene, limonene และ 2-carene สำหรับพืชอื่น ๆ ในจีนัส Heracleum พบรายงานว่ารากของ Heracleum anisactis มีฤทธิ์ต้าน Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis และ Escherichia coli โดยองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยของพืชนี้คือ Myristicin นอกจากนี้ยังพลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Torbati et al., 2014) นอกจากนี้แล้วยังมี Heracleum sphondylium L. subsp. ternatum (Velen.) Brummitt หรือ hogweed มีฤทธิ์กยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด ได้แก่ A375 (human malignant melanoma) และ HCT116 (human colon carcinoma) โดยองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยของพืชชนิดนี้คือ aliphatic esters หรือแม้แต่เชื้อที่มีความทนทานสูงอย่างเช่นเชื้อ Mycobacterium tuberculosis ก็ยังพบว่ารากของ Heracleum maximum หรือ cow parsnip ก็สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้และพบว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียนี้คือ Falcarindiol และ 6-isopentenyloxyisobergapten (O'Neill et al., 2013)

จากข้อมูลงานวิจัยต่างๆจะเห็นได้ว่าพืชสมุนไพรและเครื่องเทศที่ใช้ในการปรุงอาหารไทยนั้น น่าสนใจ และยังไม่เป็นที่รู้จักดีพอโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสำคัญ และสารออกฤทธิ์ของพืช ดังนั้นพืชทั้งสองชนิดนี้มีศักยภาพที่จะให้ศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม และสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดองค์ความรู้ได้อีกมาก

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสกัดน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดจากยี่หร่า และ มะแหลบ

2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

3. เพื่อทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดจากยี่หร่า กานพลู และตะไคร้

4. พิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.1 อุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

1) ชุดสกัดน้ำมันหอมระเหย

- Heating mantle ยี่ห้อ LabHEAT
- Condenser
- Clevenger apparatus
- Round bottom flask ขนาด 5,000 ml ยี่ห้อ SCHOTT DURAN
- เครื่องทำความเย็น ยี่ห้อ Bosstech

2) ชุดสกัด Soxhlet

- Heating mantle ยี่ห้อ LabHEAT
- Soxhlet
- Condenser
- Round bottom flask
- เครื่องทำความเย็น Bosstech

3) ชุดกลั่นระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator)

- BUCHI Rotavapor R-205
- BUCHI Vacuum Controller V-800
- BUCHI Heating Bath B- 490
- BUCHI Recirculating Chiller B-740

4) Autoclave ยี่ห้อ Daihan Scientifie

5) Advanced bio Safety Cabinet- Class II

6) Incubator ยี่ห้อ Termaks

7) ตู้อบ 50° C ยี่ห้อ Termaks

8) Autopipette

ขนาด 20-200 µl ยี่ห้อ Elnripipette รุ่น 140550083 Made in Finland

ขนาด 100-1000 µl ยี่ห้อ Discovery comfort รุ่น 040561623

9) Multi Channel Pipette (8 channels) ขนาด 30-300 µl ยี่ห้อ Thermo scientific บริษัท Finnpipette

10) Microtiter platte 96 well ยี่ห้อ Thermo scientific, Denmark

11) Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

12) Tube ยี่ห้อ NEST ขนาด 15 ml

13) Vortex ยี่ห้อ MS1 Minisshaker IKA®

14) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง METTLER TOLEDO รุ่น AG 285

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ METTLER TOLEDO รุ่น PG802-S

15) Waterbath, Memmert

16) Cork borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 mm

17) Cotton swab

18) Loop

19) Tip

10) Forceps

21) Weighing boat

22) Vernier caliper

23) จานเพาะเชื้อพลาสติก

24) หลอดทดลอง ขนาด 16x150 ml

25) ตะเกียงแอลกอฮอล์

26) McFarland Standard No. 0.5 ยี่ห้อ BioMerieux® SA, France

27) กระดาษกรอง Whatman® เบอร์1 ขนาด 90 mm, English

28) Glass slides Made in China

29) Syringe Filter ขนาด 0.45 µm ยี่ห้อ Whatman®

30) Syringe

31) กล้องจุลทรรศน์ OLYMPUS, Japan

32) Immersion oil

33) กระดาษเช็ดเลนส์

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) Mueller Hinton Agar (MHA) ยี่ห้อ TMMEDIA

2) Mueller Hinton Broth (MHB) ยี่ห้อ TMMEDIA

3) Trypticase Soy Agar (TSA) ยี่ห้อ TMMEDIA

4) Brain Heart Infusion broth (BHB)

5) Motility-Indole-Lysine medium (MIL)

6) MacConkey broth ยี่ห้อ MERCK

7) TCBS agar

8) Starch agar

9) Triple sugar iron agar (TSI), MERCK

10) Simmon's Citrate Agar

11) p-Iodonitrotetrazolium chloride

12) Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydro-chloride

13) Ethanol

1.3 แบคทีเรียทดสอบ

Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella sp. Shigella sp., Escheriachia coli

2. พืชสมุนไพร

ผลยี่หร่า เก็บตัวอย่าง จากอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือน พฤศจิกายน 2559

ผลมะแหลบ เก็บตัวอย่าง จากอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือน พฤศจิกายน 2559

3. วิธีการสกัดพืชสมุนไพร

แบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การสกัดน้ำมันหอมระเหย และ สารสกัดด้วยเฮกเซน เอธานอล และน้ำ

3.1 วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย

บดตัวอย่างพืชให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหาร ใส่ใน round bottom flask เติมน้ำกลั่น ลงไปให้ท่วม ประกอบ Clevenger apparatus เข้ากับ round bottom flask เพื่อใช้เก็บน้ำมัน และประกอบ Condenser บริเวณด้านบนของ Clevenger apparatus สำหรับการควบแน่น ต่อท่อน้ำเย็นเข้ากับ Condenser เพื่อให้เกิดการควบแน่น หลังจากนั้นเปิดเครื่องทำน้ำเย็นเพื่อให้ระบบทำน้ำเย็นไหลเวียนใน Condenser และเปิดเครื่อง Heating Mantle เพื่อต้มตัวอย่างพืช ต้มไว้เป็นระยะเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง น้ำที่กลั่นออกมา จะแยกชั้นกับน้ำมันที่ Clevenger น้ำมันจะอยู่ด้านบนและน้ำอยู่ด้านล่าง ทำการเปิดวาล์วให้น้ำไหลออกจนหมดจนเหลือแต่น้ำมัน เก็บน้ำมันใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C

3.2 วิธีการสกัดสารสกัดด้วยตัวทำละลาย

ติดตั้งชุดสกัดซึ่งประกอบไปด้วย round bottom flask, soxhlet และ condenser นำตัวอย่างสมุนไพรที่เตรียมไว้มาชั่งน้ำหนัก ใส่ลงใน soxhlet เติมเฮกเซนลงใน round bottom flask ทำการสกัดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้เรียกว่า สารสกัดชั้นเฮกเซน

เปลี่ยน round bottom flask อันใหม่และเติม absolute ethanol ลงไป สกัดตัวอย่างเดิมต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้ส่วนนี้ เรียกว่า สารสกัดชั้นเอธานอล

เปลี่ยน round bottom flask อันใหม่และเติมน้ำกลั่นลงไป สกัดตัวอย่างเดิมต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้ส่วนนี้ เรียกว่า สารสกัดชั้นน้ำ

เมื่อได้สารสกัดแต่ละส่วนแล้ว ระเหยเฮกเซนและเอธานอลออกภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ส่วนสารสกัดชั้นน้ำให้เอาน้ำออกโดยเครื่อง freeze dryer (lyophilizer)

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทอสอบจะถูกทำการเพาะเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการทดลอง

5. วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc และ agar well diffusion assay

การทดสอบเริ่มจากการเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร MHA โดยการใช้เชื้อแบคทีเรียมาปรับให้มีความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 แล้วนำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วมาป้ายลงบนอาหาร MHA ด้วย sterile cotton swab

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย ใช้วิธี disc diffusion assay โดยหยดน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 10 µl ลงบนแผ่น paper disc จากนั้นวางแผ่น paper disc ลงบนอาหาร MHA

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใช้วิธี agar well diffusion assay โดยเมื่อเพาะเชื้อลงบนอาหาร MHA ตามวิธีข้างต้นแล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm เจาะลงลงไปในอาหารทำให้มีหลุม ใส่สารสกัดจากตัวทำละลายต่างๆ ปริมาตร 50 µl ลงไป ใช้ Ethanol เป็นตัวควบคุม

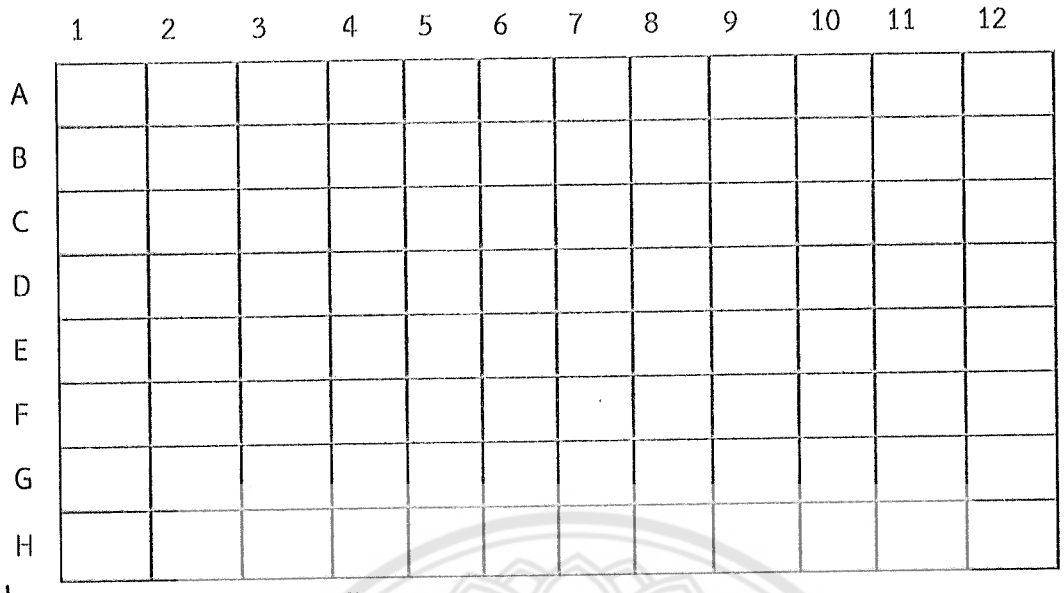
นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (Inhibition zone)

6. วิธีการทดสอบค่า MIC และ MBC

วิธีการทดสอบ MIC เป็นการหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ทำโดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 50 µl ลงใน microtiter plate ตั้งแต่หลุมที่ 2 (รูปที่ 4) ไปจนถึงหลุมที่ 12 เติมตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้น 512 mg/ml ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมที่ 1 จากนั้นทำการเจือจางด้วยวิธี Two-fold dilution ไปจนถึงหลุมที่ 11 แล้วทิ้งไป

นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ปรับให้มีความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 แล้วเจือจางต่ออีก 100 เท่า โดยดูดสารละลายเชื้อที่ปรับให้มีความขุ่นแล้วปริมาตร 100 µl ลงในอาหาร MHB 10 ml เติมเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 50 µl ลงในทุกหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ Ethanol เป็นตัวควบคุม หลังจากบ่มเชื้อแล้วเติม p-iodonitrotetrazolium chloride ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/mL ปริมาตร 40 µl ลงไปใน microtiter plate ทุกหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ถ้าหากมีเชื้อแบคทีเรียเจริญสารสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู สังเกตและบันทึกผลค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Ma Cristina De Las Llagas, 2014)

จากนั้นทำการทดสอบค่า MBC (ให้ทำก่อนการเติมสารละลาย เติม p-iodonitrotetrazolium chloride) โดยนำสารละลายจากหลุมที่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อปริมาตร 10 µl ไปเพาะลงบนอาหาร MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลอง โดยความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ จะไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA จึงถือว่าค่าความเข้มข้นนั้นจะเป็นค่า MBC



รูปที่ 1 microtiter plate 96 well

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาพบว่า องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยของยี่หร่าได้แก่ cuminaldehyde (27.10%), beta-pinene (25.04%) และ gamma-terpinene (15.68%). น้ำมันหอมระเหยยี่หร่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli และ Salmonella Typhi ได้ โดยมียับยั้งฤทธิ์เชื้อ B. cereus ได้ดีที่สุด และการทดสอบโดยใช้ TLC แสดงให้เห็นว่ามีน้ำมันหอมระเหยยี่หร่ามีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทุกชนิด และพบว่า cuminaldehyde เป็นสารออกฤทธิ์ที่แรงที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

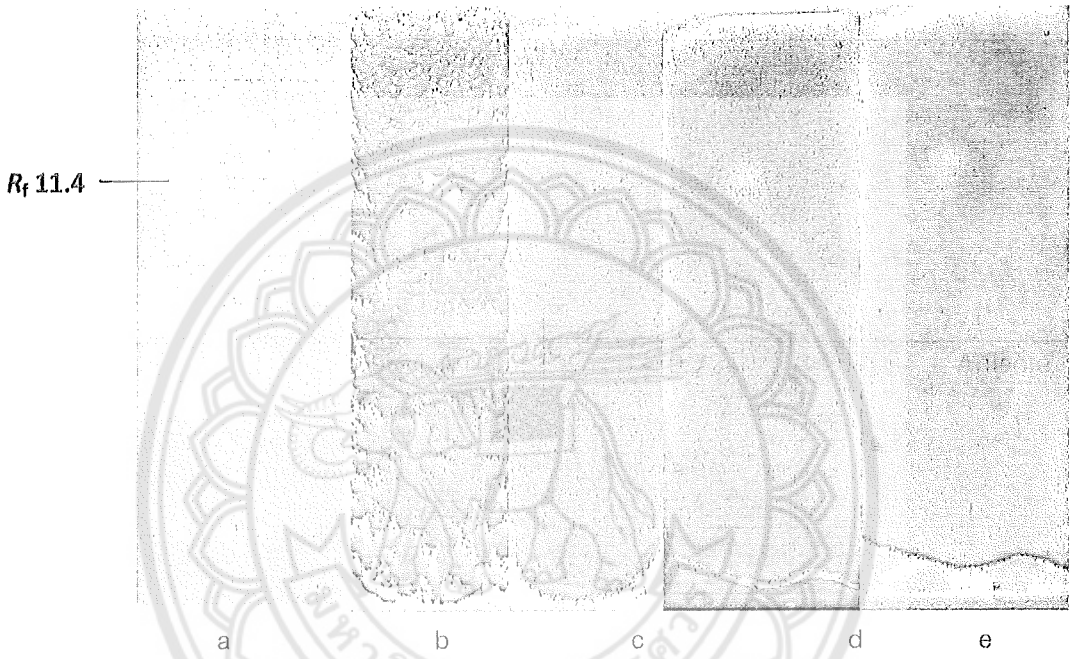
ตารางที่ 1. Bacterial susceptibility tests of cumin essential oil by agar disc diffusion assay, MIC and MBC

Bacteria	Inhibition zone (mm)		MIC/MBC (mg/ml)	
	EO *C. cyminum* L.	Tetracycline	EO *C. cyminum* L.	Tetracycline
Bacillus cereus DMST 5040	28 ± 1	26.8±0.6	128/128	0.003
Staphylococcus aureus DMST 8840	16.2 ± 0.3	29.0±0.4	128/128	0.006
Escherichia coli DMST 4212	10.6 ± 0.2	22.3±0.9	128/128	0.006
Salmonella Typhi DMST 5784	12.4 ± 0.9	21.0±0.4	128/128	0.012

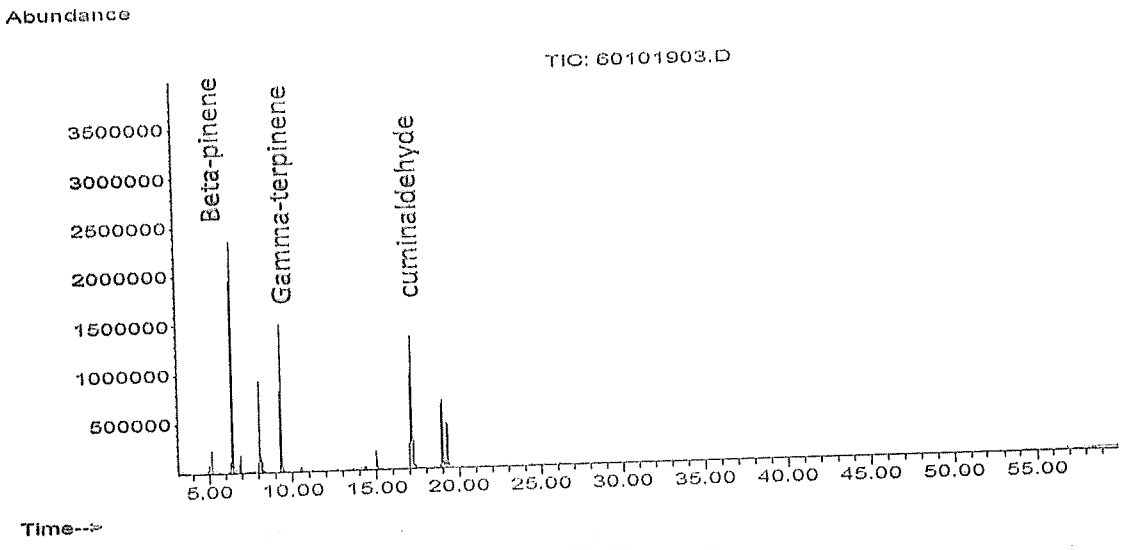
ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย Cuminum cyminum L. essential oil วิเคราะห์โดย GC-MS

Peak	Retention time	Area (%)	Compounds
1	49.7	0.51	Alpha thujene
2	5.15	1.51	Alpha-pinene
3	6.33	0.86	Sabinene
4	6.43	25.04	Beta-pinene
5	6.90	1.34	Beta-myrcene
6	8.08	8.01	Cymene
7	8.19	0.95	Alpha-limonene
8	8.29	0.33	1,8-cineole
9	9.38	15.68	Gamma-terpinene
10	10.51	0.39	Alpha-thujone

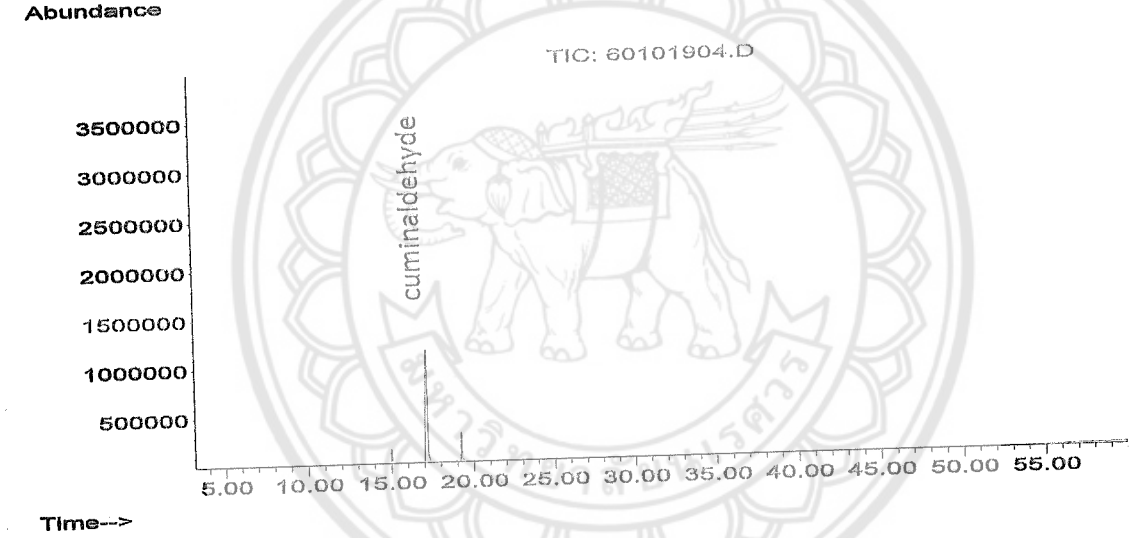
11	14.34	0.30	Terpineol
12	15.00	1.91	Pulegone
13	17.17	27.10	Cuminaldehyde
14	18.98	9.50	1-Phenyl-1-butanol
15	19.14	0.72	Anisole
16	19.27	5.84	Benzenemethanol



รูปที่ 1 Separation of Cuminum cyminum L. essential oil on TLC and its antibacterial effects against Bacillus cereus DMST 5040 (b), Staphylococcus aureus DMST 8840 (c) and Escherichia coli DMST 4212 (d) Salmonella Typhi DMST 5784 (e)



A



B

รูปที่ 2 chromatogram obtained by GC-MS of antibacterial active component of Cuminum cyminum L. essential oil; A: *Cuminum cyminum* L. essential oil B: Cuminaldehyde, antibacterial active component of *Cuminum cyminum* L. essential oil

วิจารณ์ผลการวิจัย

เชื้อก่อโรคที่ปะปนมากับอาหารยังคงเป็นปัญหาที่พบได้ทั่วโลก หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนให้ความสำคัญต่อการปนเปื้อนเชื้อในอาหารเป็นอย่างมาก เนื่องจากทำให้เกิดความเสียหายทางด้านสุขภาพ เศรษฐกิจ และสังคมในวงกว้าง ปัญหาเชื้อที่ก่อโรคจากอาหารนั้นเกิดจากหลายปัจจัย จึงมีการศึกษาหาวิธีป้องกันและกำจัดเชื้อเหล่านี้ อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันและกำจัดเชื้อที่ก่อโรคจากอาหารนั้นจะต้องเป็นวิธีไม่ก่อให้เกิดอันตราย ดังนั้นการเลือกใช้สารหรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในการยับยั้งเชื้อเหล่านี้จึงเป็นแนวทางที่จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้

วงใสของการยับยั้งแบคทีเรียจากน้ำมันหอมระเหยยี่หร่าสามารถนำมาใช้ต้านแบคทีเรียได้โดยฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียมักออกฤทธิ์โดยองค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยยี่หร่า อย่างไรก็ตามองค์ประกอบอื่นๆ อาจการเสริมฤทธิ์ด้วยก็เป็นได้ สำหรับฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยยี่หร่า เป็นผลมาจาก cuminaldyhyde เนื่องจากสารนี้เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหย และเป็นที่ทราบกันว่า cuminaldehyde มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียอยู่แล้ว นอกจากนี้ beta-pinene และองค์ประกอบอื่นๆที่พบในน้ำมันหอมระเหยยี่หร่าก็พบว่ามีสมบัติในการต้านแบคทีเรียเช่นกัน

Cuminaldehyde เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยยี่หร่า เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแบบออกฤทธิ์ในวงกว้าง (broad spectrum) สารประกอบนี้จัดอยู่ในกลุ่ม monoterpiene ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักๆ ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืช มีการศึกษายืนยันว่า น้ำมันหอมระเหย ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของเซลเมมเบรนและไซโทพลาสซึม มีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิด พบว่า สารประกอบเหล่านี้สามารถเพิ่ม membrane permeability ของแบคทีเรียได้ โดยน้ำมันหอมระเหยสามารถละลายเมมเบรน ทำให้เซลล์บวมและลดการทำหน้าที่ของเมมเบรนลง นอกจากนี้ยังทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์ตายในที่สุด มีการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจากน้ำมันหอมระเหยยี่ร่าในประเทศอิหร่าน ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยยี่หร่าทำให้ *Bacillus cereus* และ *B. subtilis* มีการเปลี่ยนแปลงในไซโตพลาสซึม โดยการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิลคตรอน (Transmitted electron microscope) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยยี่หร่าสามารถลด quorum regulated phenotype ของแบคทีเรียได้ โดยพบว่าแบคทีเรียมีการลดการสร้าง exopolysaccharide และทำให้มีการเคลื่อนที่น้อยลงรวมทั้งลดการสร้างไบโอฟิลม์ ไม่นานมานี้มีการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยยี่หร่ายับยั้งการเจริญ methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ในรูปแบบ doses dependent นอกจากนี้พบว่ายี่หร่าและสารออกฤทธิ์ของยี่หร่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยอาศัยกลไก Lmrs multidrug efflux pump ถึงแม้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากยี่หร่าจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด แต่กลไกในการออกฤทธิ์ของสาร cuminaldehyde ยังไม่ได้มีการศึกษามากนัก จึงยังไม่มีรายละเอียดถึงกลไกที่ชัดเจนในการต้านแบคทีเรีย ในการศึกษาต่อไปควรศึกษาถึงกลไกในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจาก cuminaldehyde และองค์ประกอบที่สำคัญอื่นๆ ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยยี่หร่า มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* และ *S.* Typhi น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดีที่สุด องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยซึ่งวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS และ TLC-bioautograph แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยยี่หร่ามีองค์ประกอบของ cuminaldyhyde เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด 4 ชนิด น้ำมันหอมระเหยยี่หร่ามีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นสารต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และสามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการถนอมอาหาร เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร การศึกษาต่อไป น่าจะมุ่งเน้นถึงกลไกการต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย และการเสริมฤทธิ์ในการต้านแบคทีรียระหว่างองค์ประกอบต่างๆ ที่พบในน้ำมันหอมระเหย

มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

[1] Bielecki J. Emerging food pathogens and bacterial toxins. Acta Microbiol Pol. 2003;52 Suppl:17-22.

[2] Gutierrez-Del-Rio I, Fernandez J, Lombo F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. Int J Antimicrob Agents. 2018;52:309-15.

[3] Leporatti ML, Ghedira K. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. J Ethnobiol Ethnomed. 2009;5:31.

[4] Petretto GL, Fancello F, Bakhy K, Faiz CA, Sibawayh Z, Chessa M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Cuminum cyminum* L. collected in different areas of Morocco. Food Biosci. 2018;22:50-8.

[5] Hassanien MF, Assiri AM, Alzohairy AM, Oraby HF. Health-promoting value and food applications of black cumin essential oil: an overview. J Food Sci Technol. 2015;52:6136-42.

[6] Naveed R, Hussain I, Tawab A, Tariq M, Rahman M, Hameed S, et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against Salmonella and other multi-drug resistant bacteria. BMC Complement Altern Med. 2013;13:265.

[7] Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi J Biol Sci. 2018;25:361-6.

[8] Allahghadri T, Rasooli I, Owlia P, Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, et al. Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. J Food Sci. 2010;75:H54-61.

[9] Utegenova GA, Pallister KB, Kushnarenko SV, Ozek G, Ozek T, Abidkulova KT, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Ferula* L. Species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Molecules. 2018;23:1-18.

[10] Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol. 2012;3:12.

[11] Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 2005;22:273-92.

[12] Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals (Basel). 2013;6:1451-74.

[13] Pajohi MR, Tajik H, Farshid AA, Hadian M. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of Cuminum cyminum L. seed and nisin in a food model. J Appl Microbiol. 2011;110:943-51.

[14] Amrutha B, Sundar K, Shetty PH. Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic E. coli and Salmonella spp. from fresh fruits and vegetables. LWT Food Sci Technol. 2017;79:152-9.

[15] Kakarla P, Floyd J, Mukherjee M, Devireddy AR, Inupakutika MA, Ranweera I, et al. Inhibition of the multidrug efflux pump LmrS from Staphylococcus aureus by cumin spice Cuminum cyminum. Arch Microbiol. 2017;199:465-74.

ภาคผนวก

1. บทความสำหรับการเผยแพร่

Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from Cuminum cyminum L. collected in Thailand. Journal of Complementary and Integrative Medicine. (Q2)

ดังเอกสารแนบ

DE GRUYTER

Journal of Complementary and Integrative Medicine

Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from Cuminum cyminum L. collected in Thailand

Journal:	*Journal of Complementary and Integrative Medicine*
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Wongkattiya, Nalin; Maejo University, Program in Biotechnology Sanguansermsri, Phanchana; Naresuan University Faculty of Medical Science, Biochemistry Fraser, Ian; Monash University, School of Chemistry Sanguansermsri, Donruedee; Naresuan University Faculty of Medical Science, Microbiology and Parasitology
Classifications:	alternative medicine, antimicrobial agents, medicinal herbs
Keywords:	cumin, cuminaldehyde, antibacterial activity, TLC-autobiography, GC-MS
Abstract:	Essential oil from Cuminum cyminum L. collected in Thailand was investigated for its chemical composition, antimicrobial activity and bioactive components. The main components of the essential oil of Cuminum cyminum L. investigated by gas chromatography-mass spectrometry technique were cuminaldehyde (27.10%), beta-pinene (25.04%) and gamma-terpinene (15.68%). The essential oil extracted from Cuminum cyminum L. exhibited antibacterial activity against all tested major food-borne pathogenic bacteria, Bacillus cereus, Staphylococcus. aureus, Escherichia coli and Salmonella Typhi. The essential oil showed the strongest antimicrobial activity against B. cereus with a comparable inhibition zone to tetracycline. Thin layer chromatography (TLC) confirmed the presence of biologically active antibacterial component in the essential oil from Cuminum cyminum L. against all tested food-borne bacteria. It is further demonstrated that cuminaldehyde was the most active compound in TLC-bioautography which inhibited all of tested bacteria. Our result suggests that the essential oil from Cuminum cyminum L. could be applied as an alternative natural preservative to control food-borne disease and have the potential for further development of new antibacterial agents.

SCHOLARONE™
Manuscripts

Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from *Cuminum cyminum* L. collected in Thailand

Nalin Wongkattiya[1], Phanchana Sanguansermsri[2], Ian Hamilton Fraser[3], Donruedee Sanguansermsri*[4]

[1]Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University , Chiang Mai 50290, Thailand

[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

[3]School of Chemistry, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia

[4]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

*** Corresponding author:**

Donruedee Sanguansermsri

donruedees@nu.ac.th, donruedees@hotmail.com

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Telephone: +66-897055105

Abstract

Essential oil from *Cuminum cyminum* L. collected in Thailand was investigated for its chemical composition, antimicrobial activity and bioactive components. The main components of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. investigated by gas chromatography-mass spectrometry technique were cuminaldehyde (27.10%), beta-pinene (25.04%) and gamma-terpinene (15.68%). The essential oil extracted from *Cuminum cyminum* L. exhibited antibacterial activity against all tested major food-borne pathogenic bacteria, *Bacillus cereus, Staphylococcus. aureus, Escherichia coli* and *Salmonella* Typhi. The essential oil showed the strongest antimicrobial activity against *B. cereus* with a comparable inhibition zone to tetracycline. Thin layer chromatography (TLC) confirmed the presence of biologically active antibacterial component in the essential oil from *Cuminum cyminum* L. against all tested food-borne bacteria. It is further demonstrated that cuminaldehyde was the most active compound in TLC-bioautography which inhibited all of tested bacteria. Our result suggests that the essential oil from *Cuminum cyminum* L. could be applied as an alternative natural preservative to control food-borne disease and have the potential for further development of new antibacterial agents.

Keywords

cumin; cuminaldehyde; antibacterial activity; TLC-autobiography; GC-MS

1. Introduction

Food-borne pathogens are considered as one of most common cause of illness and death in developing countries where *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Yersinia* spp and *Clostridium* spp have been identified as the agents of food borne pathogenic bacteria (1). These bacteria cause food-borne outbreaks in various foods such as dairy products, vegetables, meat, and fish products. In this situation, herbal essential oils are attracting interest as natural food preservatives and antimicrobial agents (2).

Herbal medicine has been widely used over the decades with people relying on their local knowledge remedies. Therapies involving natural compounds have shown promising potential to use as antimicrobial products but the efficacy of many of natural compounds remains unclear. *C. cyminum* L. (cumin) is a common herb that belongs to the family of Umbelliferae. The seeds are one of the most popular spices which used in many curry pastes for food flavoring in Asia and other regions of the world. It is widely used in the traditional healthcare system for treatment of chronic diarrhea, hypertension, toothaches, scorpion bites, gastrointestinal disorders (3). Thai traditional medicine uses the seed as carminative for digestion, flatulence, gas, bloating and diarrhea. The *C. cyminum* L. essential oil has been reported as an interesting source for antioxidant, antifungal and antibacterial compound which can be used for food preservative and for medical treatment (4, 5).

The aim of the present study is to investigate the chemical composition and bioactive component of essential oil of *Cuminum cyminum* L., commonly used in Thai traditional

medicine and traditional food flavoring, by using thin layer chromatography (TLC)-bioautography. Their respective antibacterial activities against food-borne bacteria, namely *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhi were investigated by disc diffusion and microdilution method.

2. Materials and methods

2.1 Plant sample and essential oil extraction

Seeds of *Cuminum cyminum* L. were collected in Chiang Mai, Thailand in December 2017. The seeds were authenticated at Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand and deposited as a voucher No. 2560-01. The essential oil of the seeds was prepared by hydro-distillation. The dried seeds (1,000 g) were ground using domestic blender and placed in a distillation apparatus containing 3,000 mL of distilled water and hydro-distilled. The oil was collected after 6 hours of distillation and stored in an amber bottle at -20°C.

2.2 Bacterial strains

Bacillus cereus DMST 5040, *Staphylococcus aureus* DMST 8840, *Escherichia coli* DMST 4212 and *Salmonella* Typhi DMST 5784 were obtained from Department of Medical Sciences Thailand. The bacteria were subcultured onto Brain Heart Infusion agar (BHA) at 37°C for 24 h before further investigation.

2.3 Antibacterial susceptibility test

2.3.1 Disc diffusion agar

The bacterial suspension was adjusted to achieve the turbidity of 0.5 McFarland standard. The bacterial suspension was inoculated onto Mueller Hinton Agar (MHA) by using cotton swab. Ten microliters of undiluted essential oil was impregnated in a sterile disc (6 mm diameter) and placed the disc on the surface of the inoculated plate. Zone of inhibitions were observed after incubation at 37°C for 24 h.

2.3.2 Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) was applied for identification and evaluation of MIC. The test was performed in 96-well microtitre plate. Different concentrations of the essential oil ranged from 0.5 – 512 mg/ml. The plate was incubated at 37°C for 24 h. MIC was reported as the lowest concentration in which microbial growth did not occurred.

2.3.3 Determination of minimal bactericidal concentration (MBC)

In order to assess MBC, all wells with no visual growth of bacteria from MIC assay were cultured on MHA then incubated at 37°C for 24 h. The lowest essential oil concentration, in which bacteria did not grow, was reported as MBC.

2.4 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis

The chemical composition of the essential oil was analyzed using GC-MS. The analyses were performed on a Agilent Technology apparatus (GC 6890, USA) equipped with a Hewlett Packard mass selective detector (MS 5973, USA) and HP-5MS 30m x 0.25 ID x 0.25 µm film thickness column (HP-5MS, USA). Oven temperature program was set to the following conditions:

70°C (0-3 min)

70-188°C (3°C/min)

188-280°C (20°C/min)

280°C (3 min)

carrier gas: helium

gas flow rate: 1 ml/min

injection volume 1 µl (10 µL of essential oil was diluted with 490 µL dichloromethane)

MS was connected to GC through transfer line which set the temperature at 150°C, and ion source temperature was 230°C. Identification of compound was confirmed by Wiley 275 and NIST98 library.

2.5 Thin layer chromatographic (TLC) separation and bioautography for detection of antibacterial activity

TLC was performed on silica gel 60 F_{254} plate (Merck, Germany). The essential oil was loaded in duplicate onto the TLC plates and run with a mixture of toluene/ethyl acetate (97:3) solvent system. The TLC plates were then dried for 15 min and the bands were examined under ultra violet light (245 nm), the first plate was kept as a reference plate. The second TLC plate was overlaid with BHA containing the bacteria under investigation and incubated at 37°C for 24 h. Inhibition zone was observed by spraying 1% of nitrotetrazolium salt on the TLC plate. The plate was then incubated at 37°C for 5 min, clear zone of inhibition with purple background zone was presented. The spot on the first TLC plate, which showed the strongest antibacterial activity component, was marked and scraped off separately for GC-MS analysis. (3)

3. Results and discussion

The *in vitro* antibacterial activities of *Cuminum cyminum* L. essential oil were analyzed for susceptibility by agar disc diffusion and microdilution method against major bacterial food-borne pathogen. Antibacterial activities were expressed as MIC and MBC values (Table 1). The oil exhibited antibacterial activity against all the bacteria investigated. In addition, *B. cereus* was the most sensitive to essential oil with a comparable inhibition zone to tetracycline. Previous antimicrobial studies in cumin showed strong antibacterial activity of the plant. Naveed et al. (6) reported that cumin was active against *S.* Thyphi and *Bacillus licheniformis*. Mostafa *et al.* reported moderate antibacterial activity against *S. aureus* (7).

The chemical composition of *Cuminum cyminum* L. essential oil was analyzed by GC-MS. There were 16 identified components (Table 2), among which cuminaldehyde (27.10%) was major a component, followed by beta-pinene (25.04%) and gamma-terpinene (15.68%). Our finding was similar to a report (Bettaleb et al., 2010) that showed cuminaldehyde (22.29%) was the first major component from Indian cumin but Tunisian cumin showed a lower content of cuminaldehyde (15.31%). In contrast, cumin collected in Morocco, gamma-terpinen was the major component (4) and cumin collected in Iran was reported with alpha pinene as a main composition of the essential oil (8). This suggests that geographical origins with different climatic and geographic conditions such as temperature, rain fall and humidity may have some effect on differences in chemical profile, concentration of the essential oil and their biological activities.

TLC autobiography analysis showed that the Gram-positive bacteria (*B. cereus* DMST 5040 and *S. aureus* DMST 8840) and the Gram-negative bacteria (*E. coli* DMST 4212, *S.* Typhi DMST 5784) provided similar visible antibacterial inhibitory zones (figure 1b, c, d, e) at identical positions (R_f 11.4) (figure 1a). The bioactive band at R_f 11.4 was extracted from the TLC plate and analyzed by GC-MS. The chromatogram of the bioactive band showed a major peak of retention time at 17.17 min which was revealed as cuminaldehyde (figure 2). According to the GC-MS analysis, cuminaldehyde was the main component of the *Cuminum cyminum* L. essential oil. Presence of the zone of inhibition at the same R_f value in the extract showed antimicrobial activity against all bacteria investigated.

The zone of inhibition observed by this compound suggests that it may be used as an antibacterial agent. However, the effect of minor components should also be taken into consideration since synergistic antibacterial effects of components may have occurred. The antimicrobial activity of the essential oil is generally regarded to be the result of the main components. However, minor components may also contribute to the biological activity through a synergistic effect or an independent action. The antimicrobial activity of cumin essential oil is most likely attributable to the high level of cuminaldehyde (27.1%), a compound known for its antibacterial activities (6) and to beta pinene, the other main component (25.04%) of cumin essential oil, which is also known to inhibit the bacterial growth (9).

4. Conclusion

In conclusion, our study demonstrates that essential oil extracted from *Cuminum cyminum* L. exhibited antibacterial activity against all tested major food-borne pathogenic bacteria, B. *cereus, S. aureus, E. coli* and *S.* Typhi. The essential oil had the strongest antimicrobial activity against *B. cereus*. The oil components were investigated by GC-MS and the antibacterial active component was examined by TLC-bioautography. It is clearly demonstrated that, found present cuminaldehyde, found present in *Cuminum cyminum* L., is a major bioactive component that exhibits antibacterial activity against all bacteria tested.

The essential oil from *Cuminum cyminum* L. could be used for therapeutic purposes as the potential antibacterial agents against food-borne bacteria. It could be used as natural alternative preservative to control food poisoning diseases or to preserve food, thus avoiding health hazards of application of chemical preservatives. Further studies need to focus on the mode of antibacterial action of the oil components and potential synergism of the oil components should be further investigated. Although the essential oil is known to be safe, this cannot be assumed for individual components. Therefore, the cell cytotoxicity assay of all active components should also be subjected to further work.

TLC autobiography analysis showed that the Gram-positive bacteria (*B. cereus* DMST 5040 and *S. aureus* DMST 8840) and the Gram-negative bacteria (*E. coli* DMST 4212, *S.* Typhi DMST 5784) provided similar visible antibacterial inhibitory zones (figure 1b, c, d, e) at identical positions (R_f 11.4) (figure 1a). The bioactive band at R_f 11.4 was extracted from the TLC plate and analyzed by GC-MS. The chromatogram of the bioactive band showed a major peak of retention time at 17.17 min which was revealed as cuminaldehyde (figure 2). According to the GC-MS analysis, cuminaldehyde was the main component of the *Cuminum cyminum* L. essential oil. Presence of the zone of inhibition at the same R_f value in the extract showed antimicrobial activity against all bacteria investigated.

The zone of inhibition observed by this compound suggests that it may be used as an antibacterial agent. However, the effect of minor components should also be taken into consideration since synergistic antibacterial effects of components may have occurred. The antimicrobial activity of the essential oil is generally regarded to be the result of the main components. However, minor components may also contribute to the biological activity through a synergistic effect or an independent action. The antimicrobial activity of cumin essential oil is most likely attributable to the high level of cuminaldehyde (27.1%), a compound known for its antibacterial activities (6) and to beta pinene, the other main component (25.04%) of cumin essential oil, which is also known to inhibit the bacterial growth (9).

4. Conclusion

In conclusion, our study demonstrates that essential oil extracted from *Cuminum cyminum* L. exhibited antibacterial activity against all tested major food-borne pathogenic bacteria, B. *cereus, S. aureus, E. coli* and *S.* Typhi. The essential oil had the strongest antimicrobial activity against *B. cereus*. The oil components were investigated by GC-MS and the antibacterial active component was examined by TLC-bioautography. It is clearly demonstrated that, found present cuminaldehyde, found present in *Cuminum cyminum* L., is a major bioactive component that exhibits antibacterial activity against all bacteria tested.

The essential oil from *Cuminum cyminum* L. could be used for therapeutic purposes as the potential antibacterial agents against food-borne bacteria. It could be used as natural alternative preservative to control food poisoning diseases or to preserve food, thus avoiding health hazards of application of chemical preservatives. Further studies need to focus on the mode of antibacterial action of the oil components and potential synergism of the oil components should be further investigated. Although the essential oil is known to be safe, this cannot be assumed for individual components. Therefore, the cell cytotoxicity assay of all active components should also be subjected to further work.

Acknowledgments

This work was supported by Naresuan University research fund (Grant No. R2560B066).

References

1. Bielecki J. Emerging food pathogens and bacterial toxins. Acta microbiologica Polonica. 2003;52 Suppl:17-22.

2. Gutierrez-Del-Rio I, Fernandez J, Lombo F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. International journal of antimicrobial agents. 2018.

3. Leporatti ML, Ghedira K. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. Journal of ethnobiology and ethnomedicine. 2009;5:31.

4. Petretto GL, Fancello F, Bakhy K, Faiz CA, Sibawayh Z, Chessa M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Cuminum cyminum L. collected in different areas of Morocco. . Food Bioscience. 2018;22:50-8.

5. Hassanien MF, Assiri AM, Alzohairy AM, Oraby HF. Health-promoting value and food applications of black cumin essential oil: an overview. Journal of food science and technology. 2015;52(10):6136-42.

6. Naveed R, Hussain I, Tawab A, Tariq M, Rahman M, Hameed S, et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against Salmonella and other multi-drug resistant bacteria. BMC complementary and alternative medicine. 2013;13:265.

7. Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi journal of biological sciences. 2018;25(2):361-6.

8. Allahghadri T, Rasooli I, Owlia P, Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, et al. Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. Journal of food science. 2010;75(2):H54-61.

9. Utegenova GA, Pallister KB, Kushnarenko SV, Ozek G, Ozek T, Abidkulova KT, et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Ferula L. Species against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. 2018;23(7).

Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from *Cuminum cyminum* L. collected in Thailand

Nalin Wongkattiya[1], Phanchana Sanguansermsri[2], Ian Hamilton Fraser[3], Donruedee Sanguansermsri*[4]

[1]Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University , Chiang Mai 50290, Thailand

[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

[3]School of Chemistry, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia

[4]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

* Corresponding author:

Donruedee Sanguansermsri

donruedees@nu.ac.th, donruedees@hotmail.com

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Telephone: +66-897055105

Table 1. Bacterial susceptibility tests of cumin essential oil by agar disc diffusion assay, MIC and MBC

Bacteria	Inhibition zone (mm)		MIC/MBC (mg/ml)	
	EO *C. cyminum* L.	Tetracycline	EO *C. cyminum* L.	Tetracycline
Bacillus cereus DMST 5040	28 ± 1	26.8±0.6	128/128	0.003
Staphylococcus aureus DMST 8840	16.2 ± 0.3	29.0±0.4	128/128	0.006
Escherichia coli DMST 4212	10.6 ± 0.2	22.3±0.9	128/128	0.006
Salmonella Typhi DMST 5784	12.4 ± 0.9	21.0±0.4	128/128	0.012

Table 1. Chemical composition of *Cuminum cyminum* L. essential oil analyzed by GC-MS

Peak	Retention time	Area (%)	Compounds
1	49.7	0.51	Alpha thujene
2	5.15	1.51	Alpha-pinene
3	6.33	0.86	Sabinene
4	6.43	25.04	Beta-pinene
5	6.90	1.34	Beta-myrcene
6	8.08	8.01	Cymene
7	8.19	0.95	Alpha-limonene
8	8.29	0.33	1,8-cineole
9	9.38	15.68	Gamma-terpinene
10	10.51	0.39	Alpha-thujone
11	14.34	0.30	Terpineol
12	15.00	1.91	Pulegone
13	17.17	27.10	Cuminaldehyde
14	18.98	9.50	1-Phenyl-1-butanol

15	19.14	0.72	Anisole
16	19.27	5.84	Benzenemethanol

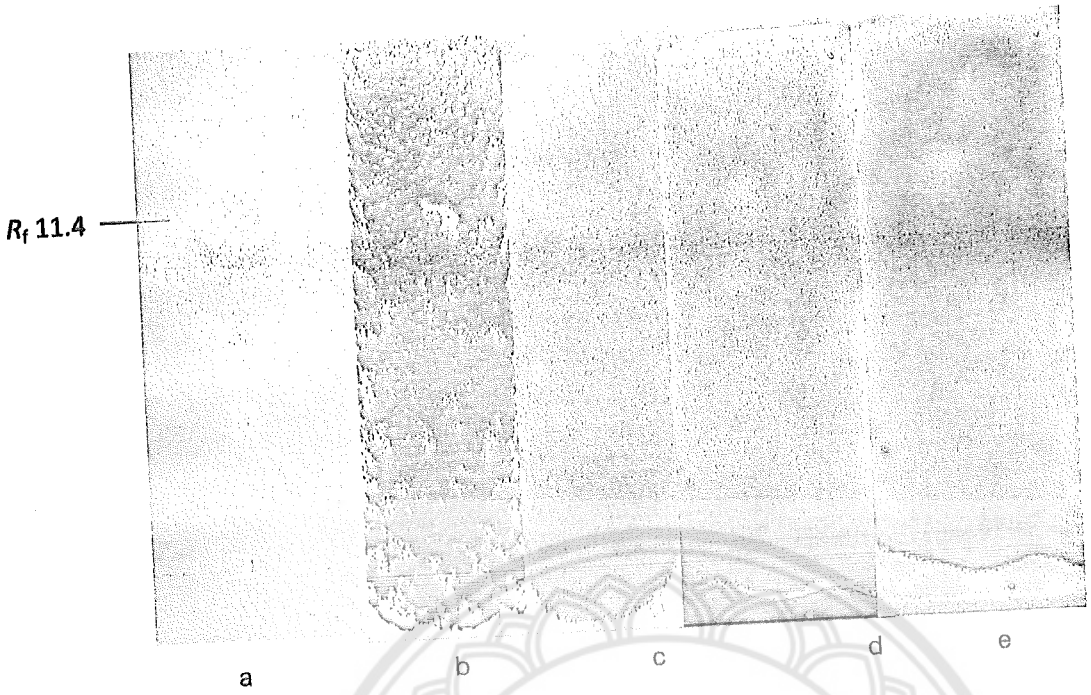
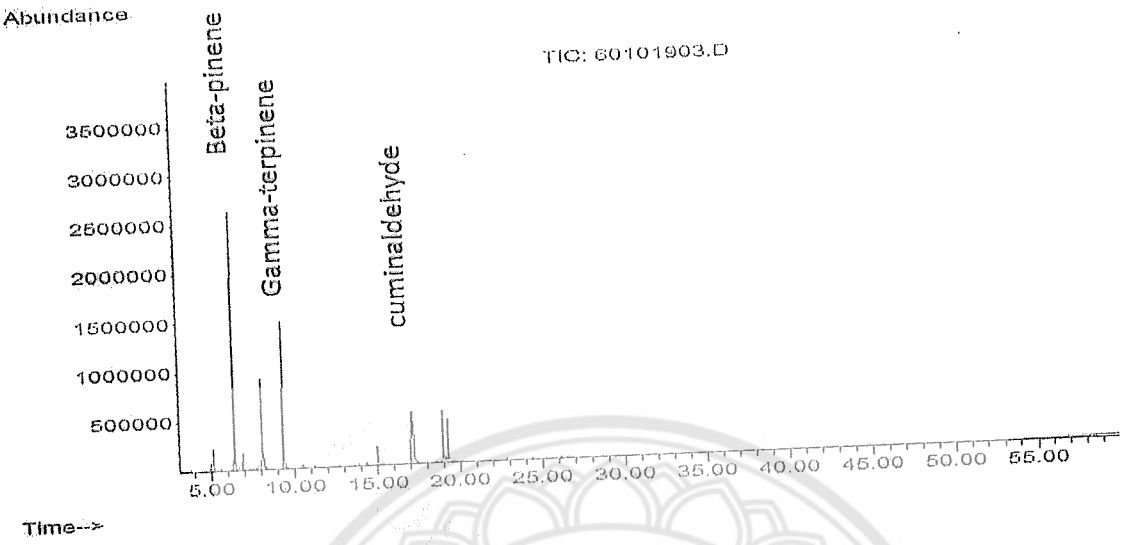
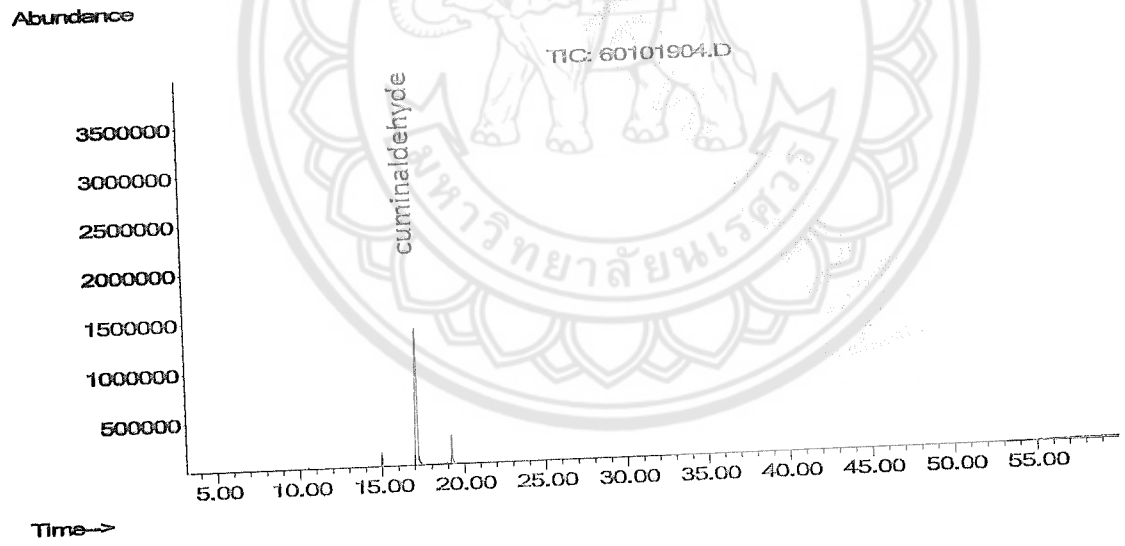


Figure 1. Separation of *Cuminum cyminum* L. essential oil on TLC and its antibacterial effects against *Bacillus cereus* DMST 5040 (b), *Staphylococcus aureus* DMST 8840 (c) and *Escherichia coli* DMST 4212 (d) *Salmonella* Typhi DMST 5784 (e)



A



B

Figure 2. TLC chromatogram obtained by GC-MS of antibacterial active component of *Cuminum cyminum* L. essential oil

A. *Cuminum cyminum* L. essential oil

B. Cuminaldehyde, antibacterial active component of *Cuminum cyminum* L. essential oil